



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

# СБОРНИК ТЕЗИСОВ

ОТЧЕТНОЙ КОНФЕРЕНЦИИ АСПИРАНТОВ

23 - 30 июня 2022 г.

Москва, 2022



ФЕДЕРАЛЬНОЕ  
ГОСУДАРСТВЕННОЕ  
УЧРЕЖДЕНИЕ «ФЕДЕРАЛЬНЫЙ  
ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР  
«ФУНДАМЕНТАЛЬНЫЕ  
ОСНОВЫ БИОТЕХНОЛОГИИ»  
РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ  
НАУК»

---

## **СБОРНИК ТЕЗИСОВ**

*отчетной конференции аспирантов*

Федерального государственного учреждения  
«Федеральный исследовательский центр  
«Фундаментальные основы биотехнологии»  
Российской академии наук»

23 – 30 июня 2022 г.

г. Москва

УДК 579  
ББК 28  
С 23

Сборник отчетной конференции аспирантов.

ISBN

**Общая редакция –**

Научный руководитель ФИЦ Биотехнологии РАН, академик РАН *В.О. Попов*  
Директор ФИЦ Биотехнологии РАН, д.б.н. *А.Н. Фёдоров*

Редакционная коллегия: к.б.н. *А.М. Камионская*; д.б.н., профессор *Е.З. Кочиева*; к.б.н. *Ю.А. Медведева*; д.б.н. *Н.В. Пименов*; д.б.н., профессор *М.С. Крицкий*

**Составители:** к.э.н. *Е.С. Титова*, *С.В. Соловьёва*

Сборник включает тезисы ежегодной отчетной конференции аспирантов Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук» (23-30 июня 2022 г.)

Материалы предназначены для аспирантов и молодых ученых, реализующих исследования в области биотехнологии, биохимии, молекулярной биологии, биоинформатики и микробиологии.

**Ключевые слова:** биотехнология, биохимия, молекулярная биология, биоинформатика, микробиология

Proceedings of the Federal State Institution “Federal Research Centre “Fundamentals of Biotechnology” of the Russian Academy of Sciences” Postgraduate Students’ Annual Reporting Conference  
(June 23-30, 2022)

The materials are intended for postgraduate students and young scientists researching biotechnology, biochemistry, molecular biology, bioinformatics, and microbiology.

**Keywords:** biotechnology, biochemistry, molecular biology, bioinformatics, microbiology

Материалы публикуются в авторской редакции.

УДК 579  
ББК 28

© Коллектив авторов

© Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук, 2022

## Оглавление

### ПРОФИЛЬ 1.5.3. МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ

<b>ГАЛЛЯМОВ А.А.</b> ПОЛУЧЕНИЕ И ОПИСАНИЕ ПРИОНОВ ДРОЖЖЕЙ [PSI <sup>+</sup> ], НЕЗАВИСИМЫХ ОТ ШАПЕРОНА HSP104.....	6
<b>КАЛИНИН Д.С.</b> КОНСТРУИРОВАНИЕ БЕЛКА ИММУНИТЕТА IM9, ПРИРОДНОГО ИНГИБИТОРА КОЛИЦИНА E9, ИНАКТИВИРУЕМОГО ПРОТЕАЗОЙ PS273R ВИРУСА АФРИКАНСКОЙ ЧУМЫ СВИНЕЙ.....	11
<b>БИДЮК В.А.</b> РОЛЬ ТРИПТОФАНА И ТИРОЗИНА В ТОКСИЧНОСТИ ФУНГИЦИДНЫХ НУКЛЕОЗИДОВ С ЛИПОФИЛЬНОЙ ГРУППОЙ.....	16
<b>ШИПКОВ Н.С.</b> СТРУКТУРА И СВОЙСТВА ТИОЦИАНАТДЕГИДРОГЕНАЗ ИЗ РАЗЛИЧНЫХ ИСТОЧНИКОВ.....	23
<b>ЕФРЕМОВ Г.И.</b> АНАЛИЗ СТРУКТУРНЫХ ГЕНОВ МЕТАБОЛИЗМА КАРОТИНОИДОВ У СОРТОВ И ДИКИХ ВИДОВ ТОМАТА.....	28
<b>АРМЯНИНОВА Д.К.</b> CRISPR/CAS КАК ИНСТРУМЕНТ ГЕННОЙ ИНЖЕНЕРИИ МИКОБАКТЕРИЙ .....	34
<b>СТАРШИН А.С.</b> ИЗУЧЕНИЕ ЭПИГЕНЕТИЧЕСКОЙ ГЕТЕРОГЕННОСТИ В МОДЕЛЬНОЙ СИСТЕМЕ <i>GASTEROSTEUS ACULEATUS</i> .....	39

### ПРОФИЛЬ 1.5.4. БИОХИМИЯ

<b>ЛАМЕРДОНОВА Ф.Х.</b> ИССЛЕДОВАНИЕ МЕХАНИЗМА ДЕЙСТВИЯ ГЕТЕРИЛТИОЦИАНАТА В КАЧЕСТВЕ ПЕРСПЕКТИВНОГО АНТИМИКОТИКА .....	45
<b>ШАБАЕВ А.В.</b> ЛИГНОЛИТИЧЕСКИЙ КОМПЛЕКС БАЗИДИАЛЬНЫХ ГРИБОВ БЕЛОЙ ГНИЛИ РАЗЛИЧНЫХ ЭКОЛОГИЧЕСКИХ НИШ.....	48
<b>БАКУНОВА А.К.</b> ХАРАКТЕРИСТИКА СТАБИЛЬНОСТИ ТРАНСАМИНАЗЫ D-АМИНОКИСЛОТ ИЗ <i>HALISCOMENOBACTER HYDROSSIS</i> .....	54
<b>ВАРФОЛОМЕЕВА Л.А.</b> ИЗУЧЕНИЕ МЕХАНИЗМА ДЕЙСТВИЯ ТИОЦИАНАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ МЕТОДОМ РЕНТГЕНОСТРУКТУРНОГО АНАЛИЗА.....	57
<b>КРИВИЦКАЯ А.В.</b> МЕХАНИЗМЫ РЕАКЦИИ ГИДРОЛИЗА ИМИПЕНЕМА МЕТАЛЛО- $\beta$ -ЛАКТАМАЗАМИ NDM-1 И L1.....	62
<b>СОЛОВЬЕВА А.Ю.</b> ИССЛЕДОВАНИЕ МЕХАНИЗМА АКТИВАЦИИ ТИОЦИАНАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ IN VITRO И IN VIVO.....	66

<b>БАРШЕВСКАЯ Л.В.</b> ВЫСОКОЧУВСТВИТЕЛЬНЫЙ ФОРМАТ ИММУНОХРОМАТОГРАФИИ С ДВОЙНОЙ КОНКУРЕНЦИЕЙ: РАЗРАБОТКА И АПРОБАЦИЯ.....	72
<b>КУЛАКОВА М.В.</b> ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ ПРОЯВЛЕНИЯ ПРОДУКЦИИ ГЕНЕТИЧЕСКИ КОДИРУЕМОГО ИНДИКАТОРА КАЛЬЦИЯ GEM-GECO В КЛЕТКАХ ДРОЖЖЕЙ <i>OGATAEA PARAPOLYMORPHA</i> .....	77
<b>МАРЫНИЧ Н.К.</b> СОЗДАНИЕ ПЕРВОГО БИФОТОХРОМНОГО БЕЛКА MOXSAASOTI, СТАБИЛИЗИРОВАННОГО К ОКИСЛИТЕЛЬНЫМ УСЛОВИЯМ КЛЕТКИ.....	82
<b>ОБУХОВ Ю.Н.</b> ВОДОРАСТВОРИМЫЕ ХЛОРОФИЛЛ-СВЯЗЫВАЮЩИЕ БЕЛКИ СЕМЕЙСТВА WSCP КАК СЕНСИБИЛИЗАТОРЫ ФОТОХИМИЧЕСКИХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ С ЭКЗОГЕННЫМИ ДОНОРАМИ И АКЦЕПТОРАМИ ЭЛЕКТРОНА.....	89
<b>ОСТРИК А.А.</b> РЕГУЛЯТОРНЫЕ МАЛЫЕ НЕКОДИРУЮЩИЕ РНК MCR11 И DRRS <i>MYSOBACTERIUM TUBERCULOSIS</i> КАК ФАКТОРЫ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ «ПАТОГЕН–ХОЗЯИН».....	99

#### **ПРОФИЛЬ 1.5.6. БИОТЕХНОЛОГИЯ**

<b>БУБНОВА А.Н.</b> ОЦЕНКА И ОТБОР ПОТЕНЦИАЛЬНО НОВЫХ ПРОМОТОРНЫХ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ В ГЕНОМЕ РИСА <i>ORYZA SATIVA</i> ИЗ БАЗЫ ДАННЫХ DATABASE OF POTENTIAL PROMOTER ДЛЯ ПОСЛЕДУЮЩЕЙ ПРОВЕРКИ IN VIVO.....	105
<b>КУЛАКОВА А.В.</b> СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА НОВЫХ ГЕНОВ-ГОМОЛОГОВ АЛЬФА- И БЕТА-АМИЛАЗ И ИХ ИНГИБИТОРОВ, ОПРЕДЕЛЯЮЩИХ УСТОЙЧИВОСТЬ КАРТОФЕЛЯ К ХОЛОДОВОМУ СТРЕССУ.....	108
<b>ТИМОФЕЕВА Т.А.</b> ИЗУЧЕНИЕ АКТИВНОСТИ ГИДРОЛИЗАТА ХИТОЗАНА В ОТНОШЕНИИ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ, УЧАСТВУЮЩИХ В СТРЕССОВЫХ РЕАКЦИЯХ У ТОМАТА.....	113
<b>НЕЖДАНОВА А.В.</b> CRISPR/CAS9 РЕДАКТИРОВАНИЕ ГЕНА <i>RHO1A</i> КРАХМАЛФОСФОРИЛАЗЫ КАРТОФЕЛЯ ИЗМЕНЯЕТ МЕТАБОЛИЗМ КРАХМАЛА.....	119
<b>ПЕЧЕНОВ П.Ю.</b> РАЗРАБОТКА ЭФФЕКТИВНОГО МЕТОДА РЕДАКТИРОВАНИЯ ГЕНОМА ПРОМЫШЛЕННО-ЦЕННЫХ МОЛОЧНОКИСЛЫХ БАКТЕРИЙ.....	124
<b>СИНЕГУБОВА М.В.</b> ПОЛУЧЕНИЕ КЛЕТОЧНОЙ ЛИНИИ-ПРОДУЦЕНТА ХОРИОНИЧЕСКОГО ГОНАДОТРОПИНА ЧЕЛОВЕКА.....	128

**ПРОФИЛЬ 1.5.8. МАТЕМАТИЧЕСКАЯ БИОЛОГИЯ,  
БИОИНФОРМАТИКА**

**МИХАЙЛОВ И.М.** СОЗДАНИЕ КОМПЛЕКСНОЙ СИСТЕМЫ ОЦЕНКИ  
ГЕНОТОКСИЧНОСТИ ХИМИЧЕСКИХ ВЕЩЕСТВ  
С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ВЫСОКОПРОИЗВОДИТЕЛЬНОГО  
СЕКВЕНИРОВАНИЯ.....134

**ПРОФИЛЬ 1.5.11. МИКРОБИОЛОГИЯ**

**ГАЛУЗА О.А.** ВЫЖИВАЕМОСТЬ МОЛОЧНОКИСЛЫХ БАКТЕРИЙ В  
ГЕЛЯХ ОРГАНИЧЕСКОГО И СМЕШАННОГО СОСТАВА.....140

**КУЗНЕЦОВ А.С.** ИНФЕКЦИЯ ЛЯМБДОИДНЫМ БАКТЕРИОФАГОМ  
Ф24В ШТАММОВ С НАРУШЕННЫМ СИНТЕЗОМ  
ЭКЗОПОЛИСАХАРИДА И ПОЛУЧЕНИЕ РЕКОМБИНАНТНЫХ ФОРМ  
ФАГОВОГО БЕЛКА-АДГЕЗИНА.....146

**ЗАХАРЫЧЕВА А.П.** ИЗУЧЕНИЕ ГИДРОЛИТИЧЕСКИХ ФЕРМЕНТОВ  
ЭКСТРЕМАЛЬНО ГАЛОАЛКАЛОФИЛЬНОЙ АРХЕИ *NATRONOBIFORMA*  
*CELLULOSITROPNA* .....153

**МАЛЬЦЕВА А.И.** ИЗУЧЕНИЕ РАЗНООБРАЗИЯ ПУТЕЙ АВТОТРОФНОЙ  
АССИМИЛЯЦИИ УГЛЕРОДА У ТЕРМОФИЛЬНЫХ ПРОКАРИОТ.....161

**СУЛЕЙМАНОВ Р.З.** ПОИСК И МЕТАБОЛИЧЕСКАЯ ИНЖЕНЕРИЯ  
НОВЫХ МЕТАНОТРОФНЫХ БАКТЕРИЙ КАК ПРОДУЦЕНТОВ  
КОРМОВОГО БЕЛКА ДЛЯ АКВАКУЛЬТУРЫ.....167

**ЕРШОВ А.П.** УГЛЕВОДОРОДОКИСЛЯЮЩИЕ БАКТЕРИИ ИЗ  
НЕФТЯНЫХ ПЛАСТОВ РОССИИ И КАЗАХСТАНА И ИХ  
БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИЙ ПОТЕНЦИАЛ.....173

**ПЕЛЕВИНА А.В.** ЗАКОНОМЕРНОСТИ ФОРМИРОВАНИЯ  
МИКРОБНОГО СООБЩЕСТВА ФОСФАТ-АККУМУЛИРУЮЩИХ  
БАКТЕРИЙ В ЛАБОРАТОРНОМ БИОРЕАКТОРЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНО-  
ПЕРИОДИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ.....181

**СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ**.....187

## ПРОФИЛЬ 1.5.3. МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ

**Галлямов Артур Альбертович**

аспирант ФИЦ Биотехнологии РАН 1 года обучения

профиль 1.5.3. Молекулярная биология

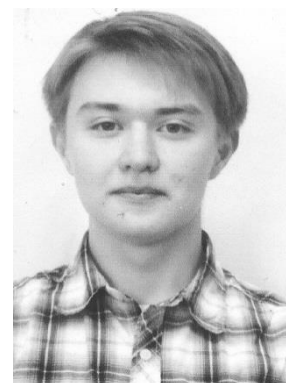
e-mail: arturens96@gmail.com

Научный руководитель

**Кушниров Виталий Владимирович**

доктор биологических наук,

в.н.с. лаборатории молекулярной генетики



### ПОЛУЧЕНИЕ И ОПИСАНИЕ ПРИОНОВ ДРОЖЖЕЙ [PSI<sup>+</sup>], НЕЗАВИСИМЫХ ОТ ШАПЕРОНА Hsp104

**Аннотация.** *Наследование всех «классических» прионов дрожжей, основанных на амилоидной структуре, зависит от шаперона Hsp104. Эта мощная молекулярная машина извлекает белковые молекулы из прионной фибриллы, чем делит ее на части (фрагментирует) и размножает, что необходимо для наследования. В клетках животных отсутствует аналог Hsp104, но прионный белок дрожжей Sup35 может поддерживаться там как прион, в ряду клеточных поколений. Также недавно (2016) был обнаружен большой класс прионов дрожжей, не зависящих от Hsp104. Природа этих прионов неизвестна, но вероятно она не амилоидная. Задачей данной работы является получение и изучение свойств Hsp104-независимых прионов на основе «классического» прионного белка дрожжей Sup35 и/или его вариантов с рандомизированным прионным доменом. Предположительно, при этом образуются более лабильные амилоидные укладки, не требующие Hsp104 для фрагментации. Целью работы является соотнесение свойств прионов, существующих в отсутствие и в присутствии Hsp104. Сейчас нам удалось получить Hsp104-независимые прионы на основе рандомизированного прионного домена Sup35.*

**Ключевые слова:** *прион, дрожжевой прион, амилоид, Sup35, [PSI<sup>+</sup>], Hsp104*

В настоящее время классической моделью изучения прионов стали прионы дрожжей. Наиболее изученный из них – это прионный детерминант [PSI<sup>+</sup>] дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* [1]. Он образован белком Sup35 (eRF3), участвующим в терминации трансляции. В Sup35 выделяют 3 домена: аминоконцевой N-домен, имеющий неупорядоченную структуру и

необходимый для прионного превращения, М-домен с неясной функцией и С-домен, играющий ключевую роль в терминации трансляции [2].

До недавнего времени были известны лишь прионы дрожжей, имеющие амилоидную природу [3], для размножения которых необходим шаперон Hsp104 [4]. Однако недавно были обнаружены прионы дрожжей, не зависящие от Hsp104 [5]. Такие прионы могли бы быть более корректной моделью для изучения прионных заболеваний млекопитающих, у которых отсутствует аналог Hsp104. Однако природа этих прионов неясна и вероятно отличается от амилоидной. В связи с этим была поставлена цель данной работы: определить возможность существования прионов [ $PSI^+$ ], размножающихся в отсутствие Hsp104, и, в случае обнаружения, изучить их свойства и соотнести механизмы поддержания прионов в присутствии и в отсутствие Hsp104.

Для этого штамм 74-D694 дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* с делетированным геном *HSP104* был трансформирован двумикронной плазмидой pYES2 (Рис.1). В плазмиде ген, находящийся под контролем сильного индуцируемого *GALI* промотора, кодирует белок Sup35NMG, где N- и М-домены Sup35 сшиты с GFP (зелёный флуоресцентный белок). Эта конструкция позволяет получать прионы [ $PSI^+$ ] при сверхпродукции Sup35NMG [6]. Именно так в полученных трансформантах индуцировали появление прионов. После индукции были отобраны клоны с прионным фенотипом Ade<sup>+</sup>. Однако дальнейшая проверка показала, что в этих клонах не возник прион [ $PSI^+$ ].

Вероятная причина может заключаться в том, что белок Sup35 дикого типа отселектирован природой на образование прионов в присутствии Hsp104 и поэтому не может образовать прион с мягкой структурой. Поэтому мы решили попробовать получить прионы на фоне делеции гена *HSP104* на основе вариантов Sup35 с рандомизированным прионным доменом [7]. Такие варианты Sup35 дают прионы с амилоидной структурой в присутствии Hsp104 [7].

Мы взяли 4 штамма, в которых Sup35 был заменен на его разные рандомизированные варианты [7]. В этих штаммах мы делетировали ген *HSP104* и затем индуцировали прионное состояние сверхпродукцией соответствующего варианта Sup35NMG. Затем клетки выселили на среду, не содержащую аденина, селективную для приона. Штаммы, с которыми мы работаем, содержат мутацию *ade2-1*. Переход Sup35 в прионное состояние снижает его терминирующую активность, что позволяет супрессировать мутацию *ade2-1*, и расти на среде без аденина. Также присутствие приона проявляется в цвете колоний. Мутация *ade2-1* придает колониям красный



цвет из-за накопления красного пигмента, являющегося промежуточным звеном в пути синтеза аденина. При супрессии этой мутации в присутствии приона [*PSI*<sup>+</sup>] колонии будут иметь белый или розовый цвет.

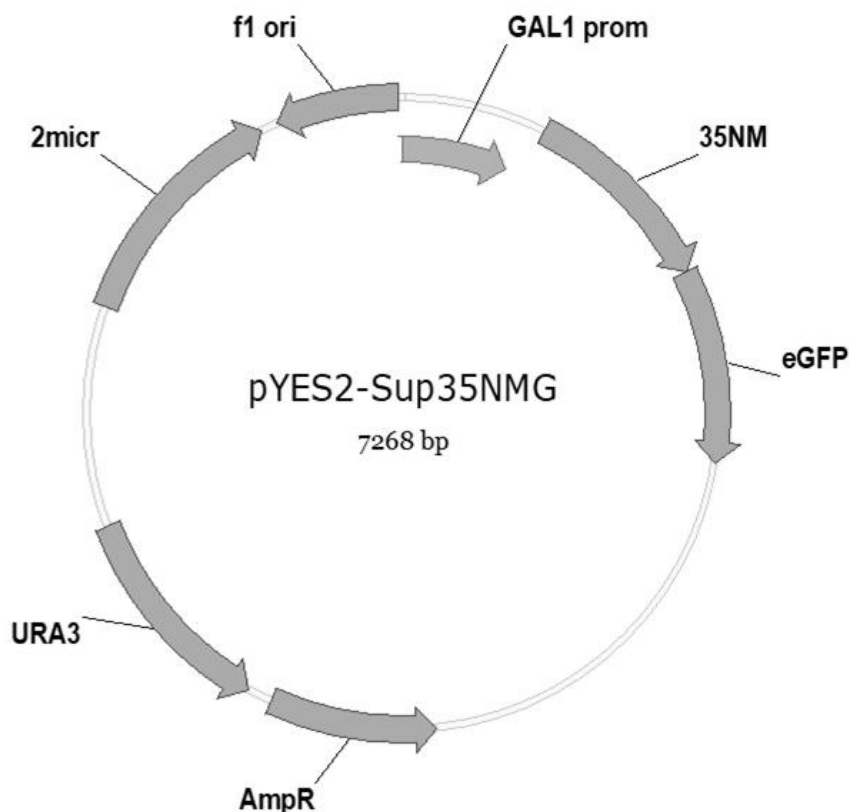


Рис. 1. Карта плазмиды pYES2-Sup35NMG

Чтобы подтвердить, что в отобранных колониях с фенотипом Ade<sup>+</sup> нарушена функция Sup35, мы ввели в них плазмиду pCM184 с геном, кодирующим С-домен Sup35. В случае если супрессорный фенотип связан с пониженной каталитической активностью Sup35, добавление его функционального домена должно снять супрессию нонсенс-мутаций. Два из четырёх штамма никак не изменились. Около 8% Ade<sup>+</sup> клонов третьего и 67% таких же клонов четвертого штамма отреагировали покраснением.

Далее мы изучили характер агрегации Sup35 в супрессорных клонах. Для этого культуру дрожжей инкубировали в течение суток в жидкой среде с галактозой для сверхпродукции Sup35NMG и наблюдали паттерны свечения GFP в микроскоп. В качестве контроля взяли клетки [*PSI*<sup>+</sup>], [*psi*<sup>-</sup>]  $\Delta$ *hsp104* и [*psi*<sup>-</sup>] с такой же плазмидой. Результаты наблюдения указаны на Рис. 2.

Клоны с супрессорным фенотипом были трансформированы плазмидой pRS316 с геном *HSP104* для проверки эффекта возвращения Hsp104. Предполагалось, что возвращение этого шаперона должно устранить супрессорный фенотип за счёт разборки агрегатов Sup35. Часть трансформантов отреагировали покраснением.

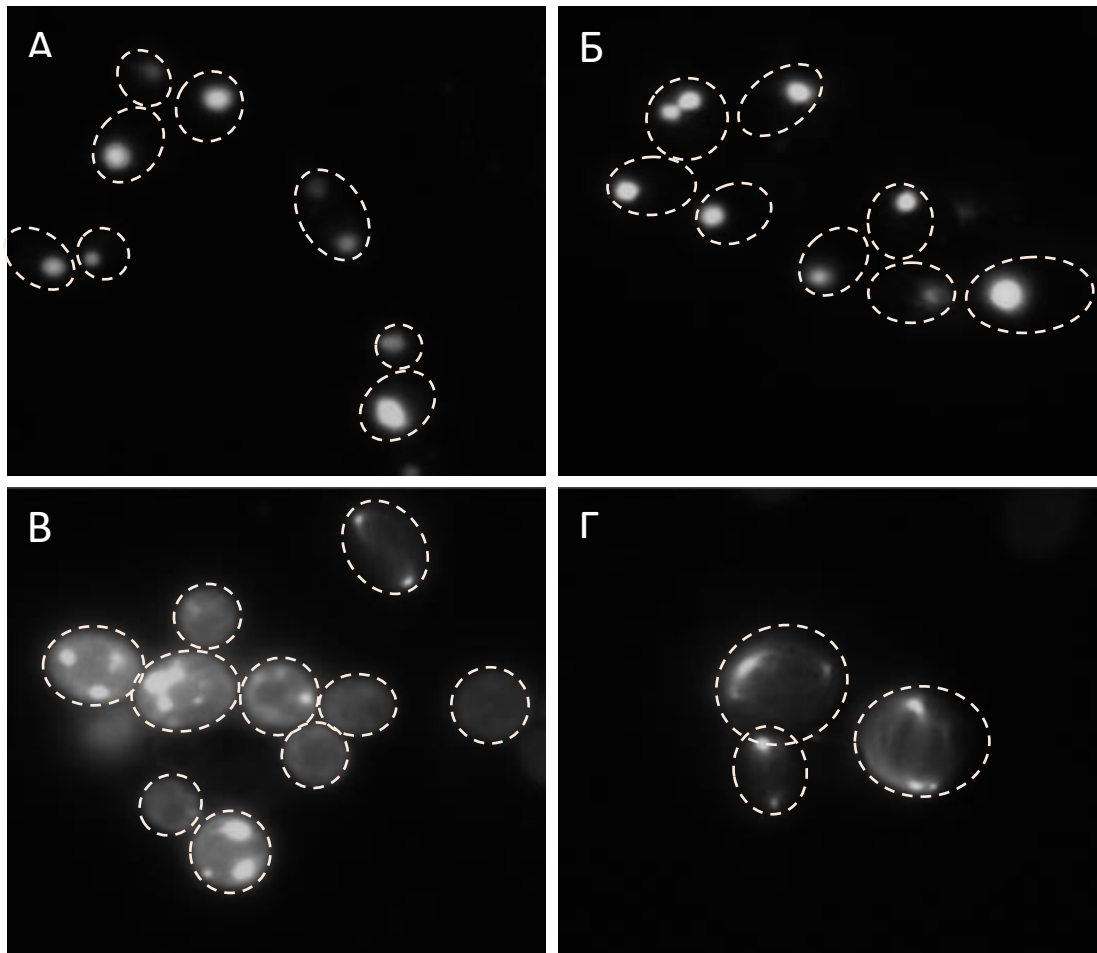


Рис. 2. Характер агрегации Sup35 после одного дня индукции на галактозе. А – исследуемые дрожжи с подтверждённым супрессорным фенотипом с рандомизированным Sup35 и  $\Delta hsp104$ ; Б –  $[PSI^+]$ ; В –  $[psi^-] \Delta hsp104$ ; Г –  $[psi^-]$

**Основные выводы.** Продемонстрирована неудачная попытка получить прионы на основе Sup35 дикого типа в отсутствие Hsp104. В ходе работы было выяснено, что в отсутствие Hsp104 в части группы Ade<sup>+</sup> клонов рандомизированный Sup35 способен к наследуемой агрегации, давая супрессорный фенотип, что характерно для прионного состояния Sup35. Возвращение Hsp104 в части дрожжевых линий снимало супрессорный фенотип. В дальнейшем мы планируем проверить другие прионные свойства этих изолятов: растворимость агрегатов Sup35 в ионных детергентах, их реакцию на некоторые мутации шаперона Ssa1 (Hsp70). Также предполагаем изучить физические свойства этих прионов: сравнить их термостабильность с обычными прионами Sup35 и картировать их прионные структуры, устойчивые к протеиназе К.

### Литература

1. Wickner R.B. [URE3] as an altered URE2 protein: evidence for a prion analog in *Saccharomyces cerevisiae* // *Science*. – 1994. – Vol. 264 (5158). – P. 566-569.

2. Ter-Avanesyan M.D. et al. The SUP35 omnipotent suppressor gene is involved in the maintenance of the non-Mendelian determinant [psi+] in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* // *Genetics*. – 1994. – Vol. 137. (3). – P. 671-676.
3. Wickner R.B. et al. Prion diseases of yeast: amyloid structure and biology // *Seminars in cell & developmental biology* // Academic Press. – 2011. – Vol. 22 (5). – P. 469-475.
4. Kushnirov V.V., Ter-Avanesyan M.D. Structure and replication of yeast prions // *Cell*. – 1998. – Vol. 94 (1). – P. 13-16.
5. Chakravarty A.K. et al. A non-amyloid prion particle that activates a heritable gene expression program // *Molecular cell*. – 2020. – Vol. 77 (2). – P. 251-265.
6. Derkatch I.L. et al. Genesis and variability of [PSI] prion factors in *Saccharomyces cerevisiae* // *Genetics*. – 1996. – Vol. 144 (4). – P. 1375-1386.
7. Ross E.D. et al. Primary sequence independence for prion formation // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2005. – Vol. 102 (36). – P. 12825-12830.

**Galliamov Artur Albertovich**  
**RESEARCH CENTER OF BIOTECHNOLOGY RAS**

**PRODUCTION AND CHARACTERIZATION**  
**OF HSP104 CHAPERONE-INDEPENDENT YEAST [PSI<sup>+</sup>] PRIONS**

**Abstract**

The inheritance of all “classical” yeast prions based on the amyloid structure depends on the Hsp104 chaperone. This powerful molecular machine extracts protein molecules from the prion fibril, then divides it into parts (fragments) and multiplies, which is necessary for inheritance. There is no Hsp104 analogue in animal cells, but the yeast prion protein Sup35 can be maintained there as a prion in a number of cell generations. Also recently (2016), a large class of yeast prions independent of Hsp104 was discovered. The nature of these prions is unknown, but probably not amyloid. The objective of this work is to obtain and study the properties of Hsp104-independent prions based on the “classical” yeast Sup35 prion protein and/or its variants with a randomized prion domain. Presumably, this results in the formation of more labile amyloid folds that do not require Hsp104 for fragmentation. The goal of this work is to correlate the properties of prions that exist in the absence and presence of Hsp104. We have now succeeded in obtaining Hsp104-independent prions based on the randomized Sup35 prion domain.

**Keywords:** prion, yeast prion, amyloid, Sup35, [PSI<sup>+</sup>], Hsp104

**Калинин Данил Сергеевич**

*аспирант ФИЦ Биотехнологии РАН 1 года обучения*

*профиль 1.5.3. Молекулярная биология*

*e-mail: 309163@gmail.com*

Научные руководители

**Федоров Алексей Николаевич**

*доктор биологических наук,*

*директор ФИЦ Биотехнологии РАН*

**Грановский Игорь Эдуардович**

*кандидат биологических наук,*

*с.н.с. лаборатории молекулярной биотехнологии*



## **КОНСТРУИРОВАНИЕ БЕЛКА ИММУНИТЕТА IM9, ПРИРОДНОГО ИНГИБИТОРА КОЛИЦИНА E9, ИНАКТИВИРУЕМОГО ПРОТЕАЗОЙ PS273R ВИРУСА АФРИКАНСКОЙ ЧУМЫ СВИНЕЙ**

**Аннотация.** Данная работа направлена на изучение возможности использования неспецифической нуклеазы колицина E9 для подавления репродукции вируса африканской чумы свиней в клетках млекопитающих. С этой целью был проведен дизайн и сконструированы модифицированные варианты природного ингибитора колицина E9, белка иммунитета Im9, содержащие сайт протеазы pS273R вируса АЧС. Была исследована способность протеазы pS273R расщеплять модифицированные белки иммунитета *in vitro*. Установлено, что внесенные модификации не нарушают ингибирующую активность белка иммунитета. Кроме того, модифицированные белки эффективно расщепляются вирусной протеазой сами по себе, но не расщепляются в составе комплекса с колицином E9. В результате исследования отобраны варианты модифицированных белков иммунитета для использования в культуре клеток свиней.

**Ключевые слова:** вирус африканской чумы свиней, протеаза pS273R, колицин E9, белок иммунитета Im9

Вирусные заболевания сельскохозяйственных животных являются одним из факторов, сдерживающих развитие животноводства. Они приводят к существенному экономическому ущербу, а также являются источником инфекций, опасных для человека. В связи с этим, в мировой науке активно развивается направление, связанное с получением пород сельскохозяйственных животных, обладающих устойчивостью к инфекционным заболеваниям на генетическом уровне [1].

Исследования проводятся на модели вируса африканской чумы свиней (АЧС). Вирус АЧС – это крупный, оболочечный вирус с икосаэдрической морфологией и двухцепочечным ДНК геномом размером от 170 до 190 т.п.н. Вирус АЧС вызывает контагиозную геморрагическую болезнь свиней с летальностью близкой к 100% [2].

Данная работа направлена на разработку нового подхода к получению пород сельскохозяйственных животных, устойчивых к вирусным инфекциям. Предлагаемый подход основывается на вовлечении в этот процесс вирус-кодируемых протеаз. Для этого предполагается провести такую модификацию клеток хозяина, чтобы вирус-кодируемые протеазы запускали каскад реакций, приводящий к деградации геномной ДНК вируса неспецифическими нуклеазами.

Колицины – это группа бактериоцинов пептидной и белковой природы, секретируемых некоторыми штаммами кишечной палочки в условиях стресса для подавления конкурирующих бактерий. Неспецифическая ДНКаза Col E9 является одним из наиболее изученных колицинов на сегодняшний день [3]. Белок иммунитета Im9 образует стабильный комплекс с колицином E9, тем самым ингибируя его активность и защищая клетку-производитель от токсического действия нуклеазы. Известна третичная структура комплекса «Col E9 – Im9». В структуре белка иммунитета имеются неструктурированные участки, не принимающие участие во взаимодействии с колицином, что позволяет вносить изменения в его последовательность, не нарушая при этом взаимодействие с Col E9. Предполагается, что вирус-кодируемая протеаза pS273R будет расщеплять рекомбинантный белок иммунитета (mIm9) и, тем самым, активировать колицин Col E9, что приведет к деградации ДНК вируса (Рис. 1).

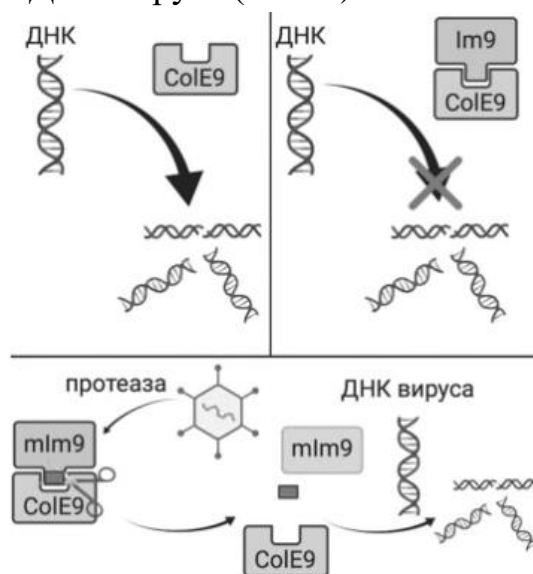


Рис. 1. Схема предполагаемого применения колицина E9 для подавления репродукции вируса африканской чумы свиней

Для реализации проекта на первой стадии был проведен анализ структуры белка иммунитета Im9. На основании анализа было принято решение в неструктурированную область P56-D60 белка иммунитета Im9 поместить сайт узнавания протеазы pS273R. Эти мутации могли позволить белку иммунитета mIm9 расщепляться протеазой pS273R. В дальнейшем, сайт узнавания протеазы pS273R, был внесен, независимо, в две другие неструктурированные области P47-S48 и T27-S28. Кроме того, были предложены дополнительные модификации сайта узнавания вирусной протеазы для его удлинения в целях улучшения стерической доступности сайта для вирусной протеазой. Таким образом нами были сконструированы модифицированные белки иммунитета mIm9, которые содержали сайт протеазы pS273R (Рис. 2, Табл. 1).

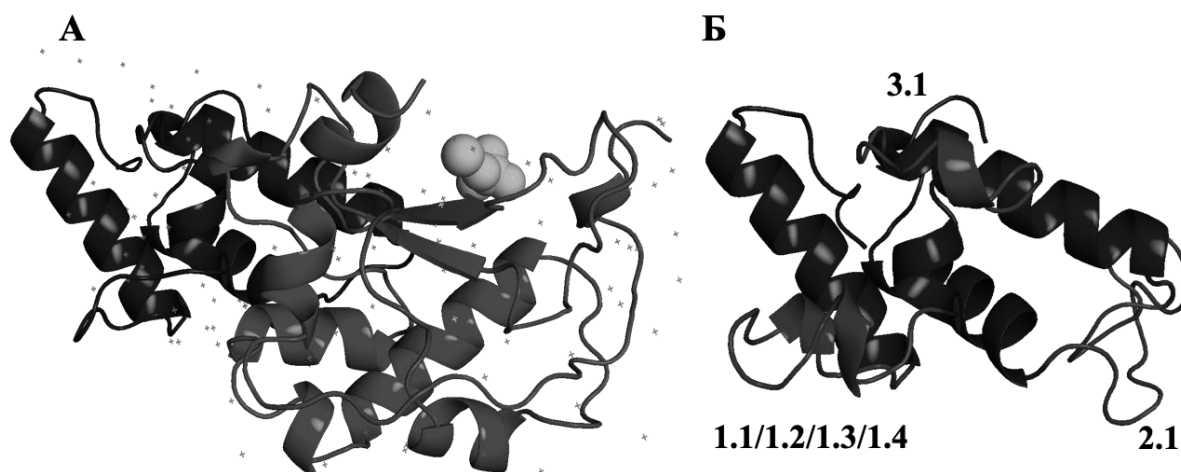


Рис. 2. (А) Структура комплекса белка иммунитета (темный цвет) и колицина Е9 (серый цвет); (Б) Модель модифицированного варианта белка иммунитета Im9: цифрами отмечены области внесения мутаций

Таблица 1

Аминокислотные последовательности с сайтом протеазы pS273R вируса АЧС (отмечено красным), введенные в различные участки белка иммунитета Im9

P56-D60	T27 – S28	P47-S48
<b>Im9 1</b> (YYPKEGDDD)	<b>Im9 2</b> (DTSS)	<b>Im9 3</b> (HPSG)
<b>Im9 1.1</b> (YYPAKKGGDEDD)	<b>Im9 2.1</b> (DTAKKGGDETS)	<b>Im9 3.1</b> (HPAKKGGDETSG)
<b>Im9 1.2</b> (YYPSSAKKGGDETSSDD)	-	-
<b>Im9 1.3</b> (YYPGSGAKKGGDETPDD)	-	-
<b>Im9 1.3</b> (YYPGGPGAkkGGDETPGPDD)	-	-

На начальных этапах работы была решена задача по конструированию экспрессионных плазмид и наработке препаратов природного и модифицированных вариантов белка иммунитета, колицина Е9 и вирусной протеазы pS273R в клетках *E. coli*. Анализ показал, что все

модифицированные варианты белка иммунитета также, как и природный белок, обладают способностью эффективно ингибировать активность колицина E9. Каждый модифицированный белок иммунитета специфически расщепляется протеазой pS273R *in vitro* и при этом теряет свои ингибирующие свойства. На основе химеры TagRFP-mIm9-TagYFP был сконструирован FRET-сенсор для детекции активности протеазы pS273R вируса АЧС, для дальнейшего анализа в клетках млекопитающих. Тем не менее, при формировании комплекса модифицированных белков иммунитета mIm9 с колицином E9 сайт, становится недоступен для гидролиза вирусной протеазой.

В результате проделанной работы отобраны варианты модифицированного белка иммунитета Im9, гидролизуемого протеазой вируса АЧС, для ко-экспрессии с колицином E9 в клетках млекопитающих.

**Основные выводы.** Проведен дизайн и предложены шесть вариантов модифицированных белков иммунитета Im9, содержащих сайт протеазы pS273R в положении P56 – D60 (Im1.1, Im1.2, Im1.3 Im1.4), T27 – S28 (Im2.1) или P47–S48 (Im3.1). Показано, что все модифицированные белки иммунитета способны ингибировать активность колицина E9 *in vitro* так же эффективно, как и их природный вариант. Показано, что все исследованные модифицированные белки иммунитета способны до образования комплекса с колицином E9 расщепляться протеазой pS273R вируса АЧС *in vitro* и при этом терять свои ингибирующие свойства. Показана возможность применения технологии FRET для анализа эффективности расщепления модифицированных белков иммунитета протеазой pS273R.

### Литература

1. Sang H. et al. Progress Toward Development of Effective and Safe African Swine Fever Virus Vaccines // *Frontiers in Veterinary Science*. Frontiers Media S.A. – 2020. – Vol. 7.
2. Alejo A. et al. A Proteomic Atlas of the African Swine Fever Virus Particle // *Journal of Virology*. American Society for Microbiology. – 2018. – Vol. 92 (23). – P. e01293-18.
3. Cascales E. et al. Colicin Biology // *American Society for Microbiology / Microbiology and Molecular Biology Reviews*. – 2007. – Vol. 71 (1). – P. 229.

### Список публикаций по теме работы

#### Тезисы докладов

1. Калинин Д.С., Ефимов А.В., Каява А.В., Шляпников М.Г., Соловьев И.Д., Грановский И.Э. Конструирование химерных белков иммунитета Im9, чувствительных к протеазе pS273R вируса африканской чумы свиней // VII

Пушинская конференция «Биохимия, физиология и биосферная роль микроорганизмов» (6-9 декабря 2021 г.) (устный доклад)

2. Калинин Д.С., Майоров С.Г., Латыпов О.Р., Грановский И.Э. Способ получения протеазы pS273R вируса африканской чумы свиней // 25-я международная Пушинская школа-конференция молодых ученых «Биология – наука XXI века» (18 – 22 апреля 2022 г.), г. Пушкино (постерный доклад).

#### **Основные достижения**

1. Диплом за II место конкурса научно-исследовательских работ студентов и аспирантов российских вузов science of the future, секция агро-, био- и продовольственные технологии, 2021 г.

2. III место школы-конференции для молодых ученых, аспирантов и студентов «Генетические технологии в микробиологии и микробное разнообразие», VII Пушинская конференция, 2021 г.

### **Kalinin Danil Sergeevich RESEARCH CENTER OF BIOTECHNOLOGY RAS**

#### **CONSTRUCTION OF IMMUNITY PROTEIN IM9, A NATURAL INHIBITOR OF COLICIN E9, INACTIVATED BY ASFV PROTEASE PS273R**

#### **Abstract**

This work aims to investigate the possibility of using the non-specific nuclease colicin E9 to inhibit the reproduction of the African swine fever virus in mammalian cells. For this purpose, a modified variant of the natural inhibitor of colicin E9, immunity protein Im9, containing site of ASFV protease pS273R, was designed and constructed. The ability of the pS273R protease to cleave the modified immunity proteins *in vitro* was investigated. It was found that introduced modifications did not impair the inhibitory activity of the immunity protein. Moreover, the modified proteins were efficiently cleaved by the viral protease alone but were not cleaved as part of a complex with colicin E9. As a result of the study, variants of the modified immunity proteins were selected for expression in porcine cell culture.

**Keywords:** African swine fever virus, pS273R protease, E9 colicin, Im9 immunity protein



**Бидюк Виктория Александровна**

*аспирант ФИЦ Биотехнологии РАН 2 года обучения*

*профиль 1.5.3. Молекулярная биология*

*e-mail: victoria.bidiuk@gmail.com*

Научный руководитель

**Александров Александр Иванович**

*кандидат биологических наук,*

*заместитель директора по научной работе,*

*зав. лабораторией молекулярной генетики*



## **РОЛЬ ТРИПТОФАНА И ТИРОЗИНА В ТОКСИЧНОСТИ ФУНГИЦИДНЫХ НУКЛЕОЗИДОВ С ЛИПОФИЛЬНОЙ ГРУППОЙ**

**Аннотация.** *Грибковые патогены способны вызывать серьезные заболевания у человека, а также наносят значительный экономический ущерб в области сельского хозяйства, техники и культуры. На данный момент существует проблема поиска новых эффективных противогрибковых средств. В данной работе проводилось исследование механизма действия модифицированных нуклеозидов, называемых SOV, и имеющих фунгицидную активность. Было выявлено, что недостаток ароматических аминокислот Trp и Tyr, но не Phe значительно усиливали чувствительность дрожжевых клеток к SOV. В результате обработки SOV клетки начинали гибнуть в течение первых нескольких минут после добавления вещества, что сопровождалось пермеабиллизацией клеточной мембраны и разрушением клеточных структур. При этом, токсический эффект SOV в значительной степени снимался добавлением антиоксиданта, что говорит о ключевой роли окислительного стресса в этом процессе. Эти результаты и анализ литературы позволяют предполагать ключевую роль остатков тирозина и триптофана в составе мембранных белков защите дрожжевых клеток от окислительного стресса.*

**Ключевые слова:** *противогрибковые вещества, клеточная гибель, окислительный стресс, пермеабиллизация мембраны, ароматические аминокислоты*

Целый ряд грибковых патогенов вызывают смертельно опасные заболевания человека [1], наносят ущерб сельскохозяйственным животным и растениям [2], а также индустриальным и культурным [3] объектам. При этом существует серьезный недостаток эффективных средств для борьбы с нежелательной грибной флорой. На данный момент наблюдается рост

заболеваемости полирезистентными грибковыми заболеваниями, которые плохо поддаются лечению классическими антимикотическими препаратами [4]. Для решения проблемы высокой заболеваемости грибковыми заболеваниями, особенно среди людей с пониженным иммунным статусом, необходимы создание и характеристика новых соединений, способных эффективно убивать патогенные грибы.

В данной работе проводилось исследование механизма действия нового потенциального антимикотического средства. Это вещество является производным пиридинового нуклеинового основания с присоединенными пентозой и длинным гидрофобным углеводородным хвостом. На данном этапе был исследован ряд сходных производных (SOV4, SOV5 и SOV8), которые отличались радикалом, присоединенным к пентозе (Рис. 1).

В качестве модельного организма были использованы дрожжи *Saccharomyces cerevisiae* штамм ВУ4742. Нами было показано, что данные вещества обладают сильным противогрибковым эффектом, причем минимальная ингибирующая концентрация (МИК) этих веществ примерно одинакова и составляет 0,02 мг/мл. В последующем также было обнаружено и сходство в характере их действия на дрожжевые клетки.

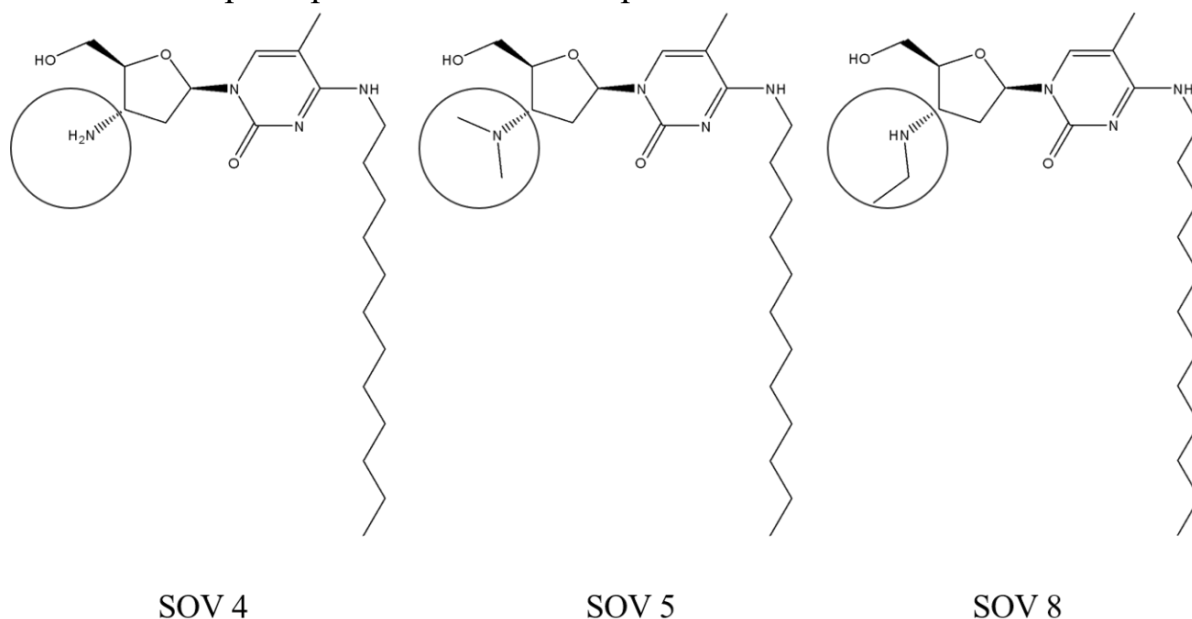


Рис. 1. Структурные формулы исследуемых веществ. Кругами отмечены радикалы, различные для трех видов SOV; остальная часть молекулы остается неизменной

В ходе предварительных исследований в нашей лаборатории был разработан и использован новый способ оценки клеточного ответа на различные стрессоры, в том числе и антимикотические вещества. Суть этого метода состоит в оценке изменения уровня различных клеточных белков за счет измерения интенсивности флуоресценции GFP, присоединенного к тем или иным белкам. Такой анализ проводится методом проточной цитометрии

с использованием выборки штаммов, у которых GFP присоединен к С-концу индивидуальных белков. Штаммы были выбраны из коммерчески доступной систематической коллекции и отбирались по 2 критериям: а) уровень белка должен быть достаточным для отслеживания, как увеличения, так и снижения количества; б) данные белки являются известными индикаторами состояния клетки, т.е. указывают на активацию различных клеточных систем, в том числе поддержания протеостаза, биосинтеза аминокислот, липидов, углеводов и т.д. [5]. В результате проведенного анализа нами было обнаружено, что в дрожжевых клетках повышается уровень белков, ответственных за биосинтез аминокислот, а также ряда других генов, в том числе, ответственных и за устойчивость клетки к окислительному стрессу. Это явление косвенно указывало на то, что аминокислоты играют определенную роль в механизме действия веществ SOV. Далее нами было изучено, влияет ли продукция данных белков роль в токсичности SOV. Было обнаружено, что чувствительностью обладают мутанты, у которых был делетированы гены, ответственные за синтез ароматических аминокислот, причем наибольшей чувствительностью обладали штаммы, неспособные синтезировать тирозин и триптофан ( $\Delta$ ARO7,  $\Delta$ ARO1,  $\Delta$ TRP5,  $\Delta$ TYR1). При этом штамм, несущий делецию гена  $\Delta$ PHA2 (ген, отвечающий на конечный этап синтеза фенилаланина) почти не отличался по чувствительности к SOV от дикого типа. Неспособность синтезировать другие аминокислоты не влияла на чувствительность к данному веществу.

Дополнительно роль именно ароматических аминокислот в устойчивости к SOV была подтверждена тем, что штаммы с делетированными генами TAT1 и TAT2, которые кодируют низкоафинный и высокоафинный транспортеры ароматических аминокислот соответственно, также обладали повышенной чувствительностью к SOV.

Таким образом, как собственная продукция, так и транспорт ароматических аминокислот извне играют важную роль в токсичности SOV.

Нами также была проверена возможность увеличения устойчивости к SOV путем добавления тирозина и триптофана в среду инкубации. Однако оказалось, что добавление этих аминокислот в количестве 0,5 мг/мл в среду инкубации никак не повлияло на чувствительность дикого типа к исследуемому веществу. Это косвенно указывает на то, что клетки, видимо, либо становятся неспособными к транспорту этих аминокислот, либо же не успевают ассимилироваться их до того, как SOV разрушит клетку.

Проведя тесты по оценке временной динамики гибели клеток при обработке SOV, мы обнаружили, что гибель наступает уже в течение 5-10 минут, что говорит о высокой вероятности влияния SOV на клеточную

мембрану, что согласуется с наличием протяженной гидрофобной группы. Поскольку при этом наблюдается появление большого (до 50% от общего числа клеток в популяции) количества пермеабиллизированных клеток при использовании вещества в МИК, можно сделать заключение, что клетка теряет жизнеспособность именно в результате потери целостности клеточной мембраны. При микроскопии в реальном времени можно было наблюдать, как клетки уже на седьмой минуте после внесения в среду SOV меняют внутреннюю морфологию и вскоре лопаются. При этом первой, судя по результатам микроскопии, страдает именно клеточная вакуоль (Рис. 2).

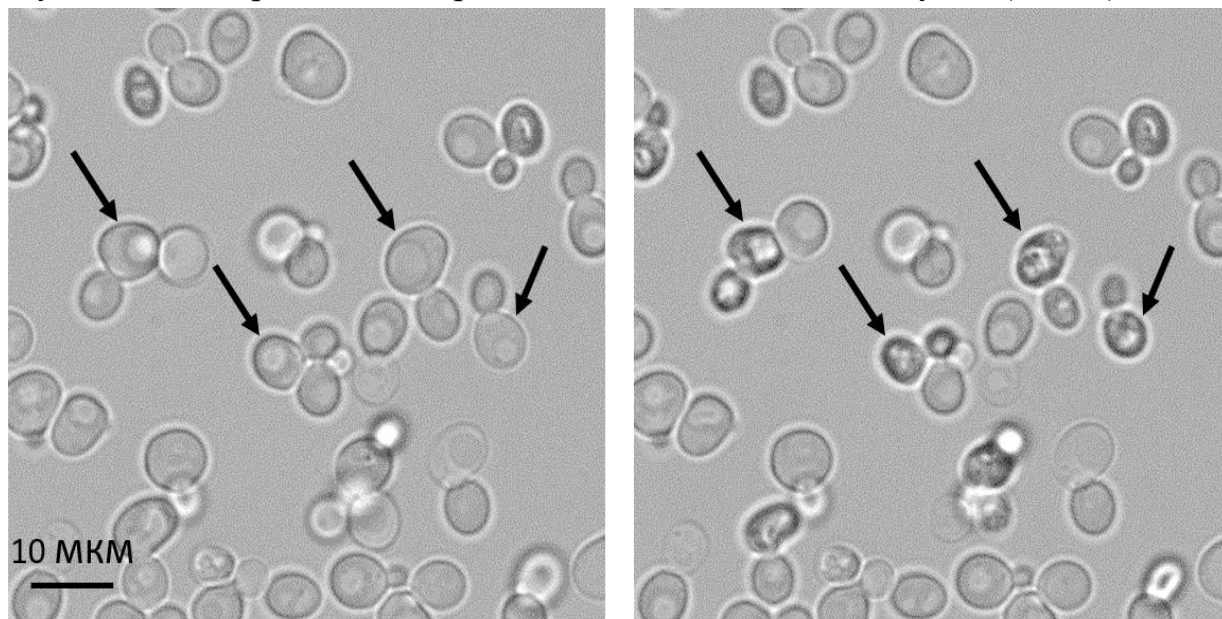


Рис. 2. Пермеабиллизация клеток и разрушение их структур в результате воздействия вещества SOV; стрелками обозначены погибшие клетки

Далее, поскольку мы наблюдали индукцию ответа на окислительный стресс в непрмеабиллизированных клетках, нами был проведен тест на роль окислительного стресса в механизме действия SOV. Было показано, что инкубация клеток в питательной среде с SOV и одновременным добавлением антиоксиданта N-ацетилцистеина в концентрации 25 мМ полностью снимает токсический эффект исследуемого вещества – снижается количество мертвых клеток, а также понижается уровень упомянутых выше белков. Все вышеперечисленное указывает на то, что возможной причиной гибели клеток является SOV-опосредованный окислительный стресс, который разрушает клеточные структуры.

**Основные выводы.** В данной работе исследовался механизм действия нового перспективного антимикотического вещества. Было показано, что вещество эффективно убивает дрожжевые клетки, причем эффект наступает уже в течении нескольких минут и приводит к пермеабиллизации клеточной мембраны и разрушению клеточных структур заметной части клеточной

популяции. Было обнаружено, что ароматические аминокислоты играют важную роль в защите клеток от действия исследуемого вещества SOV. Кроме того, было показано, что, SOV вызывает сильный окислительный стресс, который усугубляет токсический эффект SOV.

### **Литература**

1. Rodrigues M.L., Nosanchuk J.D. Fungal diseases as neglected pathogens: A wake-up call to public health officials // PLoS Neglected Tropical Diseases. Public Library of Science. – 2020. – Vol. 14 (2). – P. e0007964.
2. Fones H.N. et al. Threats to global food security from emerging fungal and oomycete crop pathogens // Nature Food. Springer Nature. – 2020. – Vol. 1 (6). – P. 332-342.
3. Tyagi P., Verma R.K., Jain N. Fungal degradation of cultural heritage monuments and management options // Current Science. – 2021. – Vol. 121 (12). – P. 1553-1560.
4. Fisher M.C. et al. Worldwide emergence of resistance to antifungal drugs challenges human health and food security // Science. – 2018. – Vol. 18 (360). – P. 739-742.
5. Levshin I.B. et al. Antifungal Thiazolidines: Synthesis and Biological Evaluation of Mycosidine Congeners // Pharmaceuticals. – 2022. – Vol. 15 (5). – P. 563.

### **Список публикаций по теме работы**

#### *Статьи*

1. Bidiuk V.A., Alexandrov A.I., Valiakhmetov A.Y. Extracellular pH and high concentration of potassium regulate the primary necrosis in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* // Archives Microbiology. – 2021. – Vol. 204 (1). – P. 35.
2. Grosfeld E.V., Bidiuk V.A., Mitkevich O.V., Ghazy E.S.M.O., Kushnirov V.V., Alexandrov A.I. A systematic survey of characteristic features of yeast cell death triggered by external factors // Journal of Fungi. – 2021. – Vol. 7 (11). – P. 886.
3. Bidiuk V.A., Agaphonov M.O., Alexandrov A.I. Modulation of green to red photoconversion of GFP during fluorescent microscopy by carbon source and oxygen availability // Yeast. – 2021. – Vol. 38 (5). – P. 295-301.

#### *Тезисы докладов*

1. Бидюк В.А., Александров А.И. Изучение механизмов клеточной гибели в ответ на инактивацию жизненно важных генов в состоянии покоя – Материалы III Российского микробиологического конгресса – Псков (26 сентября – 1 октября 2021 г.). – С. 148. (публикаций и стендовый доклад)

2. Александров А.И., Гросфельд Э.В., Бидюк В.А., Кухтевич И.В., Митькевич О.В., Дмитриев С.Е., Гладышев В.Н. Полногеномный поиск мутантов дрожжей с увеличенной вероятностью некроза – исследование нового типа клеточной гибели // Материалы III Российского микробиологического конгресса – Псков, 26 сентября – 1 октября 2021 г. - С. 125.
3. Бидюк В.А., Александров А.И. Изучение механизмов клеточной гибели в ответ на инактивацию жизненно важных генов в состоянии покоя и активного деления в клетках дрожжей // Механизмы адаптации микроорганизмов к различным условиям среды обитания: тезисы докладов Второй Всероссийской научной конференции с международным участием. Иркутск, Байкал, 28 февраля – 6 марта 2022 г. / СИФИБР СО РАН ; [отв. ред. Ю. А. Маркова]. – Иркутск: Издательство ИГУ, 2022. – С. 26-28
4. Бидюк В.А. Фотоконверсия GFP в результате окислительного стресса ассоциированного с гипоксией во время флуоресцентной микроскопии // Сборник тезисов отчётной конференции аспирантов ФИЦ Биотехнологии РАН: направление подготовки 06.06.01 Биологические науки (21-25 июня 2021 г.) / под ред. В.О. Попова, А.Н. Фёдорова; сост. Е.С. Титова. – М.: ВАШ ФОРМАТ, 2021. – С. 6-9. (тезисы и устный доклад)

### **Основные достижения**

Победитель конкурса молодых ученых 2021 г. Российского микробиологического конгресса (26 октября – 1 октября 2021 г, Псков).  
Диплом за стендовый доклад «Изучение механизмов клеточной гибели в ответ на инактивацию жизненно важных генов в состоянии покоя»

**Bidiuk Victoria Alexandrovna**  
**RESEARCH CENTER OF BIOTECHNOLOGY RAS**

### **ROLE OF TRYPTOPHAN AND TYROSINE IN THE TOXICITY OF FUNGICIDAL NUCLEOSIDES WITH A LIPOPHILIC GROUP**

#### **Abstract**

Fungal pathogens can cause serious disease in humans and also cause significant economic damage in the areas of agriculture, industry and cultural conservation. At the moment, there is a need for new effective antifungal agents. In this work, we studied the mechanism of action of modified nucleosides, termed SOV, which possess fungicidal activity. We found that deficiency in the amounts of aromatic amino acids Trp and Tyr, but not Phe, significantly increased the sensitivity of yeast to SOVs. During SOV treatment, cells died within the first few

minutes after exposure, which was accompanied by cell membrane permeabilization and destruction of cellular structures. Notably, the toxic effect of SOV was mostly abolished by the addition of an antioxidant, which demonstrates the importance of the role of oxidative stress in this process. These results and analysis of the literature indicate a key role of tyrosine and tryptophan residues in membrane proteins in protecting the yeast cell from oxidative stress.

**Keywords:** antifungal agents, cell death, oxidative stress, membrane permeabilization, aromatic amino acids

## **Шипков Николай Сергеевич**

аспирант ФИЦ Биотехнологии РАН 2 года обучения

профиль 1.5.3. Молекулярная биология

e-mail: [shipkov1995@yandex.ru](mailto:shipkov1995@yandex.ru)

Научный руководитель

## **Попов Владимир Олегович**

академик РАН,

доктор химических наук, профессор,

научный руководитель ФИЦ Биотехнологии РАН,

руководитель отдела метаболической инженерии,

зав. лабораторией инженерной энзимологии



## **СТРУКТУРА И СВОЙСТВА ТИОЦИАНАТДЕГИДРОГЕНАЗ ИЗ РАЗЛИЧНЫХ ИСТОЧНИКОВ**

**Аннотация.** Тиоцианатдегидрогеназа (TcDH), выделенная из галоалкалофильной бактерии *Thioalkalivibrio paradoxus* – медьсодержащий фермент, катализирующий окисление тиоцианата по цианатному пути. Активный центр TcDH содержит 10 консервативных аминокислотных остатков, которые вероятно определяют принадлежность белка к тиоцианатдегидрогеназам. Для подтверждения этого предположения были исследованы гомологи TcDH из бактерий *Hydrogenophila bacterium* и *Thiohalobacter thiocyanaticus*.

**Ключевые слова:** тиоцианат, тиоцианатдегидрогеназа, сероокисляющие бактерии, цианатный путь, медный кластер, селеноцианат

Тиоцианатдегидрогеназа – медь-содержащий фермент, катализирующий разложение тиоцианата по цианатному пути с образованием цианата, молекулярной серы и переносом двух электронов на внешний акцептор. Первая охарактеризованная тиоцианатдегидрогеназа (trTcDH) была выделена из галоалкалофильной сероокисляющей бактерии *Thioalkalivibrio paradoxus*, способной к росту на тиоцианате в качестве единственного источника азота и энергии [1]. Активный центр trTcDH содержит набор из 10 аминокислотных остатков, обеспечивающих поддержание структуры трехъядерного медного кластера и каталитические свойства TcDH. Гомологи trTcDH обнаружены в геномах более, чем 50 бактерий.



Было высказано предположение, что наличие в первичной структуре характерного шаблона из 10 каталитически важных аминокислот является маркером принадлежности белка к семейству тиоцианатдегидрогена [2; 3].

Для проверки этой гипотезы были выбраны гомологи *trTcDH* из бактерий *Thiohalobacter thiocyanaticus* HRh1 (*ttTcDH*) и *Hydrogenophilales bacterium* SM250 (*hbTcDH*), идентичность которых по аминокислотной последовательности с *trTcDH* составляет 33 и 65%, соответственно. Оба белка содержат консервативный шаблон из 10 аминокислотных остатков. Галофильная бактерия *T. thiocyanaticus* способна к росту с тиоцианатом ( $\text{SCN}^-$ ) в качестве единственного источника энергии и азота [4]. Ранее мной было показано, что *H. bacterium* также способна к росту с тиоцианатом в качестве источника азота. Белок из *H. bacterium* был получен с помощью гетерологичной экспрессии в штамме *E.coli* Rozzeta(DE3) Plyss. Полученный препарат не содержал ионов меди и не обладал тиоцианатдегидрогеназной активностью. Исследовано влияние концентрации и степени окисления ионов меди, а также pH на скорость активации и конечную активность *hbTcDH*. Оптимизированы условия определения активности *hbTcDH*. Активность образцов в реакции окисления тиоцианата с цитохромом c в качестве акцептора электронов, измеренная в pH-оптимуме реакции 9,5, составила активность 1,0 и 0,6 мкмоль/мин\*мг для образцов, активированных  $\text{Cu}^+$  и  $\text{Cu}^{2+}$ , соответственно. Содержание ионов меди в препаратах *hbTcDH* составляло от 3 до 3,5 на молекулу *hbTcDH*, что соответствует данным, полученным для *trTcDH*. Кинетические константы *hbTcDH*, измеренные в реакции окисления тиоцианата с двумя акцепторами электронов: высокомолекулярным - цитохромом C из сердца лошади и низкомолекулярным -  $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ , были близки, как и в случае *trTcDH*. Однако уровень активности *hbTcDH* был в 20-25 раз ниже, чем у *trTcDH*.

Методами гель-проникающей хроматографии и малоуглового рентгеновского рассеяния (SAXS) было показано, что *hbTcDH*, как и *trTcDH*, является гомодимером. Ранее было показано, что такие соединения как цианид, тиомочевина и продукт реакции – цианат, которые способны образовывать комплексы с ионами меди, являются ингибиторами для *trTcDH*. Проверка взаимодействия этих лигандов с *hbTcDH* показала, что они являются конкурентными ингибиторами реакции окисления тиоцианата, определены константы ингибирования. С помощью рентгеноструктурного анализа была получена структура *hbTcDH* с тиомочевинной.

Помимо ранее исследованных ингибиторов было проверено взаимодействие *hbTcDH* с аналогом субстрата – селеноцианатом ( $\text{SeCN}^-$ ). Показано, что селеноцианат не является субстратом для *hbTcDH*, но

способен ингибировать реакцию окисления тиоцианата. Механизм ингибирования – конкурентный. Определена константа ингибирования.

Второй объект нашего исследования – *ttTcDH*, был выделен из периплазматической фракции бактерии *T. thiocyanaticus*, выращенной на минеральной среде в присутствии тиоцианата, и содержал 0-2.9 иона меди на молекулу белка в зависимости от процедуры выделения. Фракции, в которых отсутствовала медь, не обладали тиоцианатдегидрогеназной активностью. В процессе выделения *ttTcDH* был получен в двух формах. Первая форма – свободный фермент, вторая форма – это комплекс *ttTcDH* с тиоредоксин-подобным белком (TLP). TLP – небольшой (молекулярная масса около 19 кДа) тиоредоксин-подобный белок, у которого отсутствует характерный для тиоредоксинов мотив CXXC, обеспечивающий каталитическую активность [5]. Ген TLP предшествует гену *ttTcDH* в геноме *T. thiocyanaticus*. В геномах бактерий рода *Thioalkalivibrio*, содержащих ген *TcDH*, ген TLP в этом положении отсутствует. Функция тиоредоксин-подобных белков не установлена. Однако известно, что тиоредоксин-подобные белки способны связывать глутатион [6]. В работе [3] высказано предположение, что благодаря такой способности, TLP может выполнять функцию транспорта серы, образующейся в катализируемой *ttTcDH* реакции окисления тиоцианата.

Было обнаружено, что каталитической активностью обладает только комплекс *ttTcDH*-TLP, в то время как у свободного *ttTcDH* отсутствует каталитическая активность, и он является нестабильным, склонным к агрегации и выпадению в осадок в процессе хранения. Аналогично вели себя и рекомбинантные препараты *ttTcDH*, которые были получены на первом этапе выполнения работы. Поэтому в данный момент мы предполагаем, что функция TLP — это стабилизация молекулы *ttTcDH*. Кроме того методом изотермической титрационной микрокалориметрии (ИТС) было показано, что TLP из *T. thiocyanaticus* способен связывать глутатион в окисленной и восстановленной формах в стехиометрическом соотношении 1:1. Константы диссоциации комплексов  $1.5 \pm 0.4$  мкМ и  $0.83 \pm 0.25$  мкМ для окисленной и восстановленной форм глутатиона.

**Основные выводы.** Получены и охарактеризованы две новые тиоцианатдегидрогеназы из бактерий *Thiohalobacter thiocyanaticus* HRh1 (*ttTcDH*) и *Hydrogenophilales bacterium* SM250 (*hbTcDH*), идентичность которых по аминокислотной последовательности с *tpTcDH* составляет 33 и 65%, соответственно. Оба белка содержат консервативный шаблон из 10 каталитически важных аминокислотных остатков, что подтверждает наше предположение, что этот шаблон действительно отвечает за принадлежность

белка к тицианатдегидрогеназам. Охарактеризовано взаимодействие hbTcDH с потенциальными ингибиторами. Выделен каталитически активный комплекс ttTcDH с тиоредоксин-подобным белком TLP. Показано, что TLP способствует стабилизации ttTcDH. Показано образование комплекса окисленной и восстановленной форм глутатиона с TLP из *T. thiocyanaticus*.

### Литература

1. Sorokin D.Y. et al. *Thioalkalivibrio thiocyanoxidans* sp. nov. and *Thioalkalivibrio paradoxus* sp. nov., novel alkaliphilic, obligately autotrophic, sulfur-oxidizing bacteria capable of growth on thiocyanate, from soda lakes // International journal of systematic and evolutionary microbiology. – 2002. – Vol. 52 (2). – P. 657-664.
2. Tikhonova T.V. et al. Trinuclear copper biocatalytic center forms an active site of thiocyanate dehydrogenase // Proceedings of the National Academy of Sciences. – 2020. – Vol. 117 (10). – P. 5280-5290.
3. Tsallagov S.I. et al. Comparative genomics of *Thiohalobacter thiocyanaticus* HRh1T and *Guyparkeria* sp. SCN-R1, halophilic chemolithoautotrophic sulfur-oxidizing gammaproteobacteria capable of using thiocyanate as energy source // Frontiers in microbiology. – 2019. – Vol. 10. – P. 898.
4. Sorokin D.Y. et al. Isolation and characterization of an obligately chemolithoautotrophic *Halothiobacillus* strain capable of growth on thiocyanate as an energy source // FEMS microbiology letters. – 2014. – Vol. 354 (1). – P. 69-74.
5. Lu J., Holmgren A. The thioredoxin antioxidant system // Free Radical Biology and Medicine. – 2014. – Vol. 66. – P. 75-87.
6. Nardini M. et al. Crystal structure of the glutaredoxin-like protein SH3BGRL3 at 1.6 Å resolution // Biochemical and biophysical research communications. – 2004. – Vol. 318 (2). – P. 470-476.

### Список публикаций по теме работы

1. Shipkov N.S. et al. Novel thiocyanate dehydrogenases from sulfur-oxidizing bacteria *Thiohalobacter thiocyanaticus* HRh1T and *Guyparkeria* sp. SCN-R1 // II Joint Symposium of the Russian Biochemical Society. Sochi, Russian Federation, 01-06 October 2019. – P. 259. (тезисы и постерный доклад)
2. Shipkov N.S. et al. Preliminary characterization of two novel thiocyanate dehydrogenases from halophilic sulfur oxidizing Gammaproteobacteria *Thiohalobacter thiocyanaticus* HRh1T and *Guyparkeria* sp. SCN-R1 // 12th International Conference BIOCATALYSIS-2019: Fundamentals & Applications. St.Petersburg, Russian Federation, 24-28 June 2019. – P. 117.

3. Шипков Н.С. Структура и свойства тиоцианатдегидрогеназ из различных источников // Сборник тезисов отчётной конференции аспирантов ФИЦ Биотехнологии РАН: направление подготовки 06.06.01 Биологические науки (21-25 июня 2021 г.) / под ред. В.О. Попова, А.Н. Фёдорова; сост. Е.С. Титова. – М.: ВАШ ФОРМАТ. – 2021. – С. 6-10. (тезисы и устный доклад)

**Shipkov Nikolai Sergeevich**  
**RESEARCH CENTER OF BIOTECHNOLOGY RAS**

**STRUCTURE AND PROPERTIES  
OF THIOCYANATEDEHYDROGENASES  
FROM VARIOUS SOURCES**

**Abstract**

Thiocyanate dehydrogenase (TcDH) isolated from *Thioalkalivibrio paradoxus* is a copper-containing enzyme that catalyzes the oxidation of thiocyanate via the cyanate pathway. The active center of TcDH contains 10 conserved amino acid residues, which probably determine whether the protein belongs to thiocyanate dehydrogenases. To confirm this assumption, the TcDH homology from *Hydrogenophilia* bacterium and *Thiohalobacter thiocyanaticus* were investigated.

**Keywords:** thiocyanate, thiocyanate dehydrogenase, sulfur-oxidizing bacteria, cyanate pathway

**Ефремов Глеб Ильич**

аспирант ФИЦ Биотехнологии РАН 3 года обучения

профиль 1.5.3. Молекулярная биология

e-mail: [gleb\\_efremov@mail.ru](mailto:gleb_efremov@mail.ru)

Научный руководитель

**Кочиева Елена Зауровна**

доктор биологических наук, профессор,

зав. лабораторией системной биологии растений



## **АНАЛИЗ СТРУКТУРНЫХ ГЕНОВ МЕТАБОЛИЗМА КАРОТИНОИДОВ У СОРТОВ И ДИКИХ ВИДОВ ТОМАТА**

**Аннотация.** *Томат Solanum lycopersicum L. является удобной моделью для изучения метаболизма каротиноидов, благодаря большому разнообразию каротиноид-опосредованной окраски спелого плода. Каротиноид-цис-транс-изомеразы CRTISO катализируют реакцию цис-транс-изомеризации двойных связей, приводящую к образованию all-trans-ликопина – сильнейшего антиоксиданта среди каротиноидов и субстрата для последующего синтеза  $\alpha$ -,  $\beta$ -каротинов и ксантофиллов. В работе были проанализированы различные сорта и линии томата, различающиеся окраской спелого плода. Полученные биохимические данные продемонстрировали зависимость окраски плода от содержания и состава каротиноидов и наличия/отсутствия хлорофиллов. Проведенный *in silico* и экспрессионный анализ экспрессии трех генов-паралогов CRTISO показал, что наибольший уровень экспрессии в плоде характерен только для гена CRTISO, который максимально транскрибируется на стадиях смены окраски (с зеленой на красную) и биологической спелости плода. Второй паралог CRTISO-L1 преимущественно экспрессируется в листьях и цветках на стадии цветения, но в меньшей степени в плодах на стадиях RR, BR, MG. CRTISO-L2 экспрессируется в плодах на стадиях RR и IG-1, и в меньшей степени во всех других органах.*

**Ключевые слова:** *Solanum lycopersicum*, биосинтез каротиноидов в растениях, каротиноид-изомеразы CRTISO, окраска плода томата

Каротиноиды – это класс вторичных метаболитов, которые являются важными компонентами защиты фотосинтетического аппарата растений от фотоокислительного повреждения, вызванного чрезмерным освещением. Изучение генов биосинтеза каротиноидов и мутаций на образцах дикорастущих и культивируемых видов томата, значительно различающихся

по качественному и количественному составу каротиноидов, поможет определить значение каждого фермента в этом процессе.

Каротиноид-цис-транс-изомераза *CRTISO*, является одним из ключевых ферментов биосинтеза каротиноидов и катализирует реакцию цис-транс-изомеризации двойных связей, приводящую к образованию all-trans-ликопина, который отвечает за красный цвет плодов томата и является субстратом для последующего синтеза  $\alpha$ - $\beta$ -каротинов и ксантофиллов.

Известная в гене *CRTISO* мутация «tangerine» приводит к накоплению вместо all-trans-ликопина zeta-каротина и cis-проликопина, что приводит к фенотипу плодов насыщенного оранжевого или мандаринового цвета. Известны два мутантных аллеля «tangerine», потеря функции, которых связана с делецией 282 п.н. (24 п.н. в экзоне I и 258 п.н. в интроне I) в последовательности гена *CRTISO* (tangerine mic) и нарушением экспрессии гена за счет делеции 348 п.н. в промоторе (tangerine 3183). В случае экзон-интронной делеции удаляется сайт сплайсинга, и образующаяся последовательность мРНК содержит ранний стоп-кодон, который прерывает синтез функционального белка *CRTISO*, а в случае делеции в промоторе не происходит инициация транскрипции [1].

Цель третьего года работы стало продолжение характеристики генов биосинтеза каротиноидов у видов *Solanum* секц. *Lycopersicon* и включало характеристику гена *CRTISO* и его паралагов (*CRTISO-L1* и *CRTISO-L2*) в динамике развития плодов у красноплодных и зеленоплодных видов томата, а также плодов сортов и линий томата *S. lycopersicum*, различающихся окраской, с содержанием и составом каротиноидов. В отдельную задачу было выделено определение у сортов томата мутаций tangerine 3183 и tangerine mic и анализ у них уровня экспрессии *CRTISO* и его паралагов (*CRTISO-L1* и *CRTISO-L2*) в листьях и плодах на стадии биологической спелости.

Проведенный анализ референсного генома томата позволил три ортологичных гена каротиноид-цис-транс-изомеразы: *CRTISO*, *CRTISO-L1* и *CRTISO-L2*.

Сравнительный анализ *CRTISO*, *CRTISO-L1* и *CRTISO-L2* выявил их общую доменную и мотивную структуру (из 20 идентифицированных мотивов 12 общих). В процессе эволюции в результате дупликации возникли новые паралаги *CRTISO-L1* и *CRTISO-L*. Их экзон-интронная структура не изменилась, однако изменилась хромосомная локализация. Для того чтобы определить, какой из генов каротиноид-цис-транс-изомеразы активен в плоде томата, был проведен *in silico* анализ их экспрессии. Было показано, что ген *CRTISO* экспрессируется во всех анализируемых тканях и органах растения с максимумом в плоде, а также в листе и цветке. При этом в плоде наибольший

уровень транскрипции *CRTISO* наблюдается на стадии смены окраски с зеленой на красную (стадия breaker, BR) и при биологической спелости (стадия red ripe, RR). Транскрипция гена *CRTISO-L1* наиболее активна в цветке томата, причем экспрессия значительно ниже, чем у гена *CRTISO*, а в плоде близка к нулевому значению. мРНК третьего гена *CRTISO-L2* в анализируемых тканях томата не обнаружена.

Были выявлены значительные различия в паттернах экспрессии *CRTISO* и его паралога *CRTISO-L1* и *CRTISO-L2* в различных органах, на стадии зрелого плода и в процессе созревания у трех красноплодных и желтоплодных сортов, различающихся качественным и количественным составом каротиноидов и у двух зеленоплодных дикорастущих видов.

Был проведен анализ состава каротиноидов у сортов с различной окраской зрелых плодов. Было показано, что содержание ликопина или  $\beta$ -каротина строго не коррелировало с окраской плода. Плоды с бледно-зеленой и желто-оранжевой окраской характеризовались следовыми количествами ликопина (Л-Золотой лотос) или совсем не содержали его, тогда как плоды красной и коричнево-фиолетовой окраски характеризовались относительно высоким содержанием ликопина.

У этих же сортов были определены паттерны экспрессии *CRTISO* и его паралога на стадии зрелого плода и в листьях. Показано, что экспрессия *CRTISO* выше на поздних стадиях оттогенеза – BR and RR. Экспрессия паралога (*CRTISO-L1* и *CRTISO-L2*) в сортах и линиях в плодах на стадии RR была на относительно низком уровне или практически отсутствовала. Уровень экспрессии всех трех паралога (*CRTISO*, *CRTISO-L1* и *CRTISO-L2*) в листьях различных сортов и линий томата был на одном уровне. Было показано отсутствие четкой корреляции между уровнем экспрессии гена *CRTISO* и суммой каротиноидов, что может объясняться различным количеством метаболитов, предшествующих проликопину.

Помимо характеристики трех генов каротиноид-цис-транс-изомеразы представлялось интересным поиск у желто – и оранжевоплодных сортов томата мутаций tangerine 3183 и tangerine mic и анализ у них уровня экспрессии генов *CRTISO* в листьях и в спелых плодах. Проведенный молекулярно-генетический анализ гена *CRTISO* показал, что сортов Алтайский оранжевый, Хурма, Оранжевый гигант, Черри желто-оранжевые, Дебаро оранжевый, Органза и линий (Т-Т15300 и Дынюшка 2с-эп) томата имели мутацию типа tangerine 3183, содержали делецию в 348 п.н. в промоторе гена *CRTISO*. Мутации типа tangerine mic обнаружено не было. Паттерны экспрессии CP совпадали с аллельным статусом (гомо/гетрозиготностью) по генам и присутствием мутации tangerine 3183.

**Основные выводы.** Полученные биохимические данные демонстрируют зависимость окраски плода томата от содержания и состава каротиноидов и наличия хлорофиллов. Отсутствие выраженной корреляции между уровнем экспрессии гена *CRTISO* и суммой каротиноидов может объясняться различным количеством метаболитов, предшествующих проликопину, что определяется активностью, в первую очередь, фитоинсинтазы PSY1 и, затем, десатураз (PDS и ZDS) и ζ-каротин-изомеразы Z-ISO. Экспрессионный анализ показал дифференциальную и орган-специфичную экспрессию *CRTISO* и его паралагов *CRTISO-L1* и *CRTISO-L2*.

### Литература

Isaacson T., Ohad I., Beyer P., Hirschberg J. Analysis in vitro of the enzyme CRTISO establishes a poly-cis-carotenoid biosynthesis pathway in plants // *Plant Physiol.* – 2004. – Vol. 136. – P. 4246.

### Список публикаций по теме работы

#### Статьи

1. Efremov G.I., Slugina M.A., Shchennikova A.V., Kochieva E.Z. Differential Regulation of Phytoene Synthase PSY1 During Fruit Carotenogenesis in Cultivated and Wild Tomato Species (*Solanum* section *Lycopersicon*) // *Plants.* – 2020. – Vol. 9 (9). – P. 1169.
2. Дьяченко Е.А., Филюшин М.А., Ефремов Г.И., Щенникова А.В., Кочиева Е.З. Структурно-функциональные особенности изоформ фитоинсинтазы PSY1 и PSY2 у сортов перца *Capsicum annuum* L. // *Вавиловский журнал генетики и селекции* – 2020. – Т.24. – № 7. – С. 687-696.
3. Щенникова А.В., Дьяченко Е.А., Ефремов Г.И., Филюшин М.А., Кочиева Е.З. Вариабельность и филогения паралагов фитоинсинтазы PSY1 и PSY2 перца у различных видовых комплексов рода *Capsicum* // *ДОКЛАДЫ РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК. НАУКИ О ЖИЗНИ.* – 2020. – Т. 495. – № 1. – С. 590-597.
4. Филюшин М. А., Дьяченко Е. А., Ефремов Г. И., Кочиева Е. З., Щенникова А. В Вариабельность и экспрессия паралагов фитоинсинтазы (PSY) у видов перца клады *Annuum* // *Генетика.* – 2021. – Т.57. – № 3. – С. 280-296.
5. Slugina M.A., Efremov G.I., Shchennikova A.V., Kochieva E.Z. Characterization of RIN Isoforms and Their Expression in Tomato Fruit Ripening // *Cells.* – 2021. – Vol. 10 (7). – P. 1739.
6. Efremov G.I., Slugina M.A., Shchennikova A.V., Kochieva E.Z.; Characterization of 15-cis-zeta-Carotene Isomerase Z-ISO in Cultivated and Wild Tomato Species Differing in Ripe Fruit Pigmentation // *Plants.* – 2021. – Vol. 9 (11).



7. Ефремов Г.И., Джос Е.А., Ашихмин А.А., Кочиева Е.З., Щенникова А.В. Влияние содержания каротиноидов и активности гена каротиноид-цистринс-изомеразы *CRTISO* на окраску плода // Физиология растений. – 2022. – Т. 69. – № 4. – С. 352-362.

*Тезисы докладов*

1. Слугина М.А., Ефремов Г.И., Щенникова А.В., Джос Е.А., Кочиева Е.З. ПЛОДЫ ТОМАТА: ОТ ЭВОЛЮЦИИ ПРОМОТОРОВ К ЭВОЛЮЦИИ ОКРАСКИ // Сборник тезисов международной конференции «125 лет прикладной ботаники в России» (25-28 ноября 2019 г.). СПб: ФИЦ ВИГРР им. Н.И. Вавилова. – С. 187.

2. Ефремов Г.И. Анализ новых структурных и регуляторных генов для использования в mas селекции сортов томата с улучшенными питательными характеристиками плодов // Сборник тезисов отчётной конференции аспирантов ФИЦ Биотехнологии РАН: направление подготовки 06.06.01 Биологические науки (22-30 июня 2020 г.) / под редакцией В.О. Попова, А.Н. Федорова; сост. Е.С. Титова. – М.: МАКС Пресс. – 2020. – С. 13-18. (тезисы и устный доклад)

3. Ефремов Г.И., Тукусер Я. П., Слугина М.А. Аллельный полиморфизм гена фитоинсинтазы *SIPSY1* и биохимический анализ содержания ликопина и бета-каротина у современных сортов томата овощного (*Solanum lycopersicum*) // Материалы 20-ой Всероссийской конференции молодых ученых «Биотехнология в растениеводстве, животноводстве и сельскохозяйственной микробиологии». Москва, 16-17 июня 2020 г., М.: ФГБНУ ВНИИСБ. – 2020. – С. 101-102.

4. Efremov G.I., Shchennikova A.V., Kochieva E.Z. Z-ISO: a catching up step towards formation of colored carotenoids in tomatoes // Abstracts of The 6th International Scientific Conference «Plant Genetics, Genomics, Bioinformatics, and Biotechnology (PlantGen2021)» (June 14-18 2021). – Novosibirsk; ICG SB RAS, 2021. – P. 61.

5. Ефремов Г.И. Анализ структурных генов метаболизма каротиноидов у сортов и диких видов томата // Сборник тезисов отчётной конференции аспирантов ФИЦ Биотехнологии РАН: направление подготовки 06.06.01 Биологические науки (22-30 июня 2020 г.) / под ред. В.О. Попова, А.Н. Фёдорова; сост. Е.С. Титова. – М.: ВАШ ФОРМАТ. – 2021. – С. 13–18. (тезисы и устный доклад)

6. Ефремов Г.И., Слугина М.А. Изменение окраски спелых плодов у видов томата (*Solanum* секция *Lycopersicon*) как результат эволюции регуляторных последовательностей генов каротиноидного пути // Материалы V (XIII) Международной ботанической конференции молодых учёных. Санкт-Петербург, 25-29 апреля 2022 г., СПб.: БИН РАН. – 2022. – С. 107.

## **Основные достижения**

Диплом за лучший доклад на ежегодной отчетной конференции аспирантов ФИЦ Биотехнологии РАН, 2021 г.

**Efremov Gleb Ilich**  
**RESEARCH CENTER OF BIOTECHNOLOGY RAS**

### **ANALYSIS OF STRUCTURAL GENES OF CAROTENOID METABOLISM IN TOMATO CULTIVARS AND WILD SPECIES**

#### **Abstract**

*Solanum lycopersicum* L. is a convenient model for studying carotenoid metabolism due to different color of the ripe fruit. Carotenoid-cis-trans-isomerase *CRTISO* catalyzes the reaction of cis-trans isomerization of double bonds, leading to the formation of all-trans-lycopene, the strongest antioxidant among carotenoids and a substrate for the subsequent synthesis of  $\alpha$ -,  $\beta$ -carotenes and xanthophylls. Various varieties and lines of tomato, differing in the color of the ripe fruit were analyzed. The obtained biochemical data demonstrated the correlation between the fruit color and the content and composition of carotenoids and the presence/absence of chlorophylls. The in silico and expression analysis of the expression of three *CRTISO* paralog genes showed that the highest level of expression in fruits is typical only for the *CRTISO* gene, which is maximally transcribed at the stages of color change (from green to red) and the biological ripeness of the fetus. The second paralog of *CRTISO*-L1 is predominantly expressed in leaves and flowers at the flowering stage, but to a lesser extent in fruits at the RR, BR, and MG stages. *CRTISO*-L2 is expressed in RR and IG-1 fetuses, and to a lesser extent in all other organs.

**Keywords:** *Solanum lycopersicum*, plant carotenoid biosynthesis, *CRTISO* carotenoid isomerase, tomato fruit coloring

**Армянинова Дарья Константиновна**

*аспирант ФИЦ Биотехнологии РАН 4 года обучения*

*профиль 1.5.3. Молекулярная биология*

*e-mail: dasha.arm@yandex.ru*

Научный руководитель

**Гончаренко Анна Владимировна**

*кандидат биологических наук,*

*руководитель группы редактирования*

*геномов микроорганизмов*



## **CRISPR/CAS КАК ИНСТРУМЕНТ ГЕННОЙ ИНЖЕНЕРИИ МИКОБАКТЕРИЙ**

**Аннотация.** *Туберкулез продолжает лидировать в списках смертоносных инфекционных заболеваний во всем мире и уносит около 2 миллионов человеческих жизней ежегодно. Для успешной борьбы с *Mycobacterium tuberculosis* необходима разработка новых высокоэффективных молекулярных и генетических инструментов для манипулирования геномами микобактерий. Создаваемая нами система CRISPR/Cpf1 может решить проблему получения немаркированных вставок или делеций в геноме микобактерий, что будет способствовать идентификации и характеристике мишеней для лекарственных препаратов против *M. tuberculosis*, и станет инструментом создания новых рекомбинантных вакцинных штаммов для профилактики туберкулеза.*

**Ключевые слова:** *Mycobacterium spp, редактирование генома, система CRISPR/Cas*

Туберкулез остается одной из самых смертоносных инфекций в мире, от которой ежедневно погибает более четырех тысяч человек. За последние 10 лет глобальные усилия по борьбе с этим заболеванием позволили спасти миллионы жизней, однако пандемия COVID-19 перечеркнула эти успехи, подтолкнув рост числа случаев смерти от туберкулеза. Имея глобальное воздействие на систему здравоохранения, *M. tuberculosis* требует разработки новых высокоэффективных молекулярных и генетических инструментов для манипулирования им, чтобы облегчить идентификацию и характеристику новых мишеней для лекарств и разработку рекомбинантных вакцинных штаммов. В частности, необходимы инструменты для направленного мутагенеза и делеции генов.

подавляющее большинство методов получения нокаута гена у микобактерий основаны на гомологичной рекомбинации и использовании

селектируемых маркеров, что позволяет изолировать нокаут-мутанты, устойчивые к антибиотикам. Однако низкая эффективность гомологичной рекомбинации и высокие частоты неспецифической рекомбинации у *Mycobacterium tuberculosis complex*, представляет собой серьезную трудность для выделения желаемых делеционных штаммов [4].

Система CRISPR/Cas, которая в первую очередь является адаптивной иммунной системой прокариот, произвела революцию среди инструментов генной инженерии. CRISPR-ассоциированный белок Cas12a (Cpf1), эндонуклеаза типа V-A системы CRISPR-Cas класса 2, представляет собой двойную нуклеазу, которая участвует в процессинге crПНК, распознавании сайта-мишени и расщеплении ДНК [5], и не требует дополнительно tracrПНК для управления. Для связывания и разрезания ДНК-мишени необходим PAM – комплиментарный сегменту crПНК короткий (3 – 5 п.н.) мотив (последовательность ДНК), прилегающий к протоспейсеру (мишени). Cas12a распознает богатые тимидином последовательности PAM (YTN). Недавно он был использован для редактирования генома млекопитающих, растений и бактерий [5]. Индуцируемый системой CRISPR/Cpf1 двуцепочечный разрыв ДНК, клетка может восстановить либо путем гомологичной рекомбинации (HR), либо путем репарации с нехомологичным соединением концов (NHEJ). Редактирование генома посредством NHEJ подвержена небольшим ошибкам при восстановлении двуцепочечных разрывов, однако такой путь не требует гомологичной ДНК-матрицы, что упрощает процедуры редактирования генома [2].

Белки-репрессоры Tet (TetR) регулируют экспрессию семейства белков, экспортирующих тетрациклин [1]. В отсутствие последнего, белок-репрессор прочно связывается с последовательностью оператора (tetO) в промоторе, и подавляет транскрипцию гена, следующим за таким промотором. Индукция репрессора происходит до момента ингибирования рибосомы тетрациклином, поскольку сродство тетрациклина с репрессором в  $10^3$ - $10^5$  раз выше, чем сродство тетрациклина с рибосомой [1]. Промоторы в таких системах в грамотрицательных бактериях, относятся к числу наиболее жестко регулируемых бактериальных промоторов [3].

Разрабатываемый нами инструмент получения немаркированной вставки в геном микобактерий, в частности *M. bovis BCG*, основан на доставке целевого гена методом сайт-специфической рекомбинации по attP/attB сайтам, с последующим удалением тела плазмиды с геном антибиотикоустойчивости системой CRISPR/Cpf1.

Одна из трудностей работы с *M. tuberculosis* и *M. bovis BCG* является крайне медленный рост бактерии, поэтому использование двухплазмидных

систем CRISPR/Cas, предполагающих последовательную трансформацию векторами, увеличивает продолжительность экспериментов по редактированию до 3 – 4 месяцев. Поэтому было принято решение создать одноплазмидную систему. В ходе работы мы столкнулись с нецелевым редактированием при использовании конститутивных промоторов, поэтому встала задача создания регулируемой системы редактирования.

Для сборки одноплазмидной системы, применяемой в нашей работе, была использована плазида pSBY1\_FnCpf1cg, кодирующая эндонуклеазу FnCpf1, и созданная нами плазида pWgRNA\_αL, на основе pRH2521, несущая модифицированную под Cpf1 двойную синтетическую gRNA и кассету для клонирования gRNA с α-пептидом гена *LacZ* находится под тетрациклин регулируемым промотором myc1\_tetO (P<sub>myc1</sub>tetO).

В процессе сборки двух вариантов одноплазмидной системы, где в первом, направляющая РНК находится под конститутивным промотором, а во втором под тетрациклин регулируемым, было принято решение о создании двух дополнительных вариантов. Новые варианты представляют собой варианты ранее полученных плазмид pSBY\_sgRNA и pSBY\_sgRNAtetR, в которых конститутивный промотор hsp60 (P<sub>hsp60</sub>) был заменен на регулируемый P<sub>myc1</sub>tetO. Таким образом, получены следующие варианты плазмид:

1. pDKhsp (FnCpf1/P<sub>hsp60</sub> + кассета gRNA\_α-LacZ/P<sub>myc1</sub>tetO);
2. pDKhsp\_tetR (FnCpf1/P<sub>hsp60</sub> + кассета gRNA\_α-LacZ/ P<sub>myc1</sub>tetO + TetR/P<sub>imyc</sub>);
3. pDKtetO (FnCpf1/P<sub>myc1</sub>tetO + кассета gRNA\_α-LacZ/P<sub>myc1</sub>tetO);
4. pDKtetO\_tetR (FnCpf1/P<sub>myc1</sub>tetO + кассета gRNA\_α-LacZ/ P<sub>myc1</sub>tetO + TetR/P<sub>imyc</sub>).

В каждый из вариантов было заклонировано по 4 пары двойных gRNA, которые направлены на ген устойчивости к гентамицину и ген *SacB* или *LacZ*, и таким образом получено 16 различных вариантов CRISPR/Cpf1 системы.

Регулируемые системы экспрессии генов являются прекрасными инструментами для изучения функции генов и тестирования новых методов и препаратов. Создаваемая система CRISPR/Cpf1 может решить проблему получения немаркированных вставок или делеций в геном микобактерий, что в свою очередь необходимо при создании новых вакцинных штаммов.

### Литература

1. Ehrt S., Guo X. V., Hickey C.M., Ryou M., Monteleone M., Riley L.W., Schnappinger D. Controlling gene expression in mycobacteria with anhydrotetracycline and Tet repressor // *Nucleic Acids Research*. – 2005. – Vol. 33

(2). – P. e21.

2. Jiang W., Marraffini L.A. CRISPR-Cas: New Tools for Genetic Manipulations from Bacterial Immunity Systems // Annual Review of Microbiology. – 2015. – Vol. 69. – P. 209-228.

3. Klotzsche M., Ehrt S., Schnappinger D. Improved tetracycline repressors for gene silencing in mycobacteria // Nucleic Acids Research. – 2009. – Vol. 37 – P. 1778-1788.

4. Shenkerman Y., Elharar Y., Vishkautzan M., Gur E. Efficient and simple generation of unmarked gene deletions in Mycobacterium smegmatis // Gene. – 2014. – Vol. 533 – P. 374-378.

5. Yan M.Y., Yan H.Q., Ren G.X., Zhao J.P., Guo X.P., Sun Y.C. CRISPR-Cas12a-assisted recombineering in bacteria // Applied and Environmental Microbiology. – 2017. – Vol. 83 (17). – P. e00947-17.

### **Список публикаций по теме работы**

#### *Статьи*

1. Nadolinskaia N.I., Zamakhaev M.V., Shumkov M.S., Armianinova D.K., Karpov D.S., Goncharenko A.V. CRISPR Interference of Adenylate Cyclases from Mycobacterium tuberculosis // Applied Biochemistry and Microbiology. – 2021. – Vol. 57 (4). – P. 421-425.

2. Армянинова Д.К., Карпов Д.С., Котлярова М.С., Гончаренко А.В. Геномная инженерия микобактерий // Молекулярная биология (принята в печать)

#### *Тезисы докладов*

1. Армянинова Д.К. Разработка новых методов получения генных нокаутов микобактерий // Сборник тезисов отчётной конференции аспирантов ФИЦ Биотехнологии РАН: направление подготовки 06.06.01 Биологические науки (24-28 июня 2019 г.) / под редакцией В.О. Попова, К.Г. Скрябина; сост. Е.С. Титова. – Москва: МАКС Пресс. – 2019. – С. 10-11. (тезисы и устный доклад)

2. Nadolinskaia N., Karpov D., Armianinova D., Shumkov M., Goncharenko A. Synthetical CRISPR array with dual gRNAs for efficient knockout of mycobacterial genes // FEBS Open Bio. – 2019. – Vol. 9 (1). – P. 401. (постерный доклад)

3. Армянинова Д.К. Разработка эффективного метода введения в геном микобактерий целевых генов с последующим удалением генов антибиотикоустойчивости // Сборник тезисов отчётной конференции аспирантов ФИЦ Биотехнологии РАН: направление подготовки 06.06.01 Биологические науки (22-30 июня 2020 г.) / под редакцией В.О. Попова, А.Н. Фёдорова; сост. Е.С. Титова. – Москва: МАКС Пресс. – 2020. – С. 16-19. (тезисы и устный доклад)

4. Armianinova D., Karpov D., Nadolinskaia N., Goncharenko A. A method for efficient non-marked insertion of target genes into the mycobacterial chromosome // FEBS Open Bio. – 2021. (постерный доклад)
5. Армянинова Д.К. Разработка метода немаркированного введения в геном микобактерий целевых генов // Сборник тезисов отчётной конференции аспирантов ФИЦ Биотехнологии РАН: направление подготовки 06.06.01 Биологические науки (21-25 июня 2021 г.) / под редакцией В.О. Попова, А.Н. Фёдорова; сост. Е.С. Титова. – М.: ВАШ ФОРМАТ. – 2021. – С. 24-28. (тезисы и устный доклад)

#### **Основные достижения**

1. Диплом за лучший доклад на ежегодной отчетной конференции аспирантов ФИЦ Биотехнологии РАН, 2020 г.
2. Диплом за лучший доклад на ежегодной отчетной конференции аспирантов ФИЦ Биотехнологии РАН, 2021 г.

**Armianinova Daria Konstantinovna**  
**RESEARCH CENTER OF BIOTECHNOLOGY RAS**

### **CRISPR/CAS AS A TOOL FOR THE GENETIC ENGINEERING OF MYCOBACTERIA**

#### **Abstract**

Tuberculosis continues to lead the list of deadly infectious diseases worldwide and claims about 2 million human lives annually. Successful control of *Mycobacterium tuberculosis* requires the development of new highly efficient molecular and genetic tools for manipulating the genomes of mycobacteria. The CRISPR/Cpf1 system we are creating can solve the problem of obtaining unmarked inserts or deletions in the mycobacteria genome, which will help identify and characterize targets for drugs against *M. tuberculosis*, and become a tool for creating new recombinant vaccine strains for the prevention of tuberculosis.

**Keywords:** *Mycobacterium spp.*, genome editing, CRISPR/Cas

**Старшин Алексей Станиславович**

*аспирант ФИЦ Биотехнологии РАН 4 года обучения*

*профиль 1.5.3. Молекулярная биология*

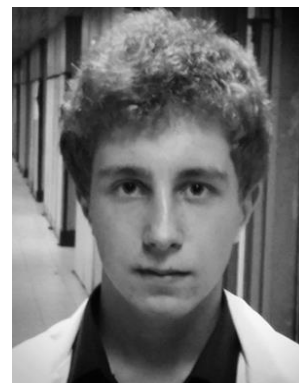
*e-mail: starshin.alexey@gmail.com*

Научный руководитель

**Прохорчук Егор Борисович**

*доктор биологических наук, чл.-корр. РАН,*

*зав. лабораторией геномики и эпигеномики позвоночных*



## **ИЗУЧЕНИЕ ЭПИГЕНЕТИЧЕСКОЙ ГЕТЕРОГЕННОСТИ В МОДЕЛЬНОЙ СИСТЕМЕ *GASTEROSTEUS ACULEATUS***

**Аннотация.** *Исследование механизмов, обуславливающих адаптации организмов к изменению условий среды, по-прежнему является актуальным направлением современной биологии. Знаниям такого рода могут найтись самые разные применения, начиная от уточнения эволюционных моделей и заканчивая повышением эффективности противоопухолевой терапии у людей. В данной работе исследуется вклад эпигенетики в конвергентную эволюцию у экотипов *Gasterosteus aculeatus*. Была дана общая характеристика эпигенетической гетерогенности как для морских, так и для пресноводных экотипов, был идентифицирован ряд локусов, объясняющих до 50% разницы эпигенетической гетерогенности всего генома, была обнаружена связь между энтропией метилирования и изменением аллельной частоты, также была найдена связь между энтропией метилирования и доступностью хроматина.*

**Ключевые слова:** *Gasterosteus aculeatus, адаптации, эпигенетическая гетерогенность, энтропия метилирования*

Традиционно принято считать, что фенотип определяется структурой генома. Однако на то, как реализуется генетическая информация, во многом влияет внешняя среда. Это происходит при помощи таких молекулярных механизмов, как метилирование ДНК, модификации гистонов и РНК-интерференция, которые обычно понимаются под словом «эпигенетика» [1]. Метилирование ДНК может быть поделено на две категории: спонтанное (или selection-based) и индуцибельное (или преддетерминированное). Первая категория представлена отдельными эпимутациями, которые возникают стохастически и могут находиться под давлением отбора. Эволюционное значение таких эпимутаций обусловлено тем, что скорость их возникновения значительно выше скорости появления мутаций генетических. Кроме того,



вклад эпимутаций будет тем выше, чем меньше размер популяции. Также существуют и преддетерминированные локусы, которые были отобраны ранее и выступают в качестве буфера, защищающего популяцию организмов (или клеток) от вымирания при изменении условий среды и/или попадании в среду с другими условиями [2].

В данной работе рассчитывается т.н. энтропия метилирования, которая представляет собой функцию, зависящую от эпиааллельных частот, нормированных на количество эпиааллелей. Таким образом, мы имеем возможность определять как локусы, находящиеся под отбором, так и консервативные регионы, задействованные в древних адаптационных механизмах.

В качестве модельного организма для изучения эволюционной роли эпигенетики была выбрана трёхиглая колюшка (*Gasterosteus aculeatus*). Древний предшественник трёхиглой колюшки относится к морским костистым рыбам. По окончании последнего ледникового максимума у морских рыб появился доступ и к пресноводным ареалам обитания. На текущий момент морские колюшки способны колонизировать озёра и менять свой экотип за несколько десятков лет, что является очень коротким временным интервалом по меркам эволюции. Существует ряд известных механизмов, которые объясняют такой быстрый темп адаптации. Однако большая часть этих механизмов связана с геномными особенностями рыб и не затрагивает эпигенетическую компоненту [3].

Основываясь на результатах, полученных в работе Артёмова и др. [4], мы предположили, что увеличение эпигенетической клональности (гетерогенности) в пресноводной среде, подобно генетической variability, способно давать адаптационные преимущества популяции рыб.

Для того чтобы охарактеризовать эпигенетическую гетерогенность с точки зрения её влияния на транскрипцию и доступность хроматина, вместе с полногеномным бисульфитным секвенированием, был проведён одноклеточный РНК-сек и одноклеточный АТАК-сек. Бисульфитной конверсии была подвергнута ДНК 48 образцов. Соотношение морских рыб к пресноводным составило 1:1, а мужских особей к женским — 20:28. Одноклеточный РНК и АТАК-сек был произведен на четырёх мужских образцах (где два — пресноводные, а два — морские) в соответствии со стандартными протоколами Illumina.

В качестве меры эпигенетической гетерогенности была выбрана энтропия метилирования, расчёт проводился для каждого плавающего окна из 5 CpG по следующей формуле:

$$ME = \frac{e}{b} \sum \left( -\frac{n_i}{N} \text{Log} \frac{n_i}{N} \right),$$

где  $e$  – энтропия на одну единицу информации (бит)

$b$  – количество позиций CpG

$n_i$  –  $i$ -ый наблюдаемый паттерн метилирования

$N$  – общее число ридов, покрывающих окно

Для оценки транскрипционной variability была рассчитана дисперсия экспрессии между всеми клетками, относящимися к определённому экотипу. Также была рассчитана и дисперсия пиков открытого хроматина.

В одной из предыдущих работ нами было установлено, что островки дивергенции (DI), локализованные в работе Терехановой и др. [5] и характеризующиеся большой плотностью SNPs с изменённой аллельной частотой, также демонстрируют сильное увеличение энтропии метилирования в пресноводной среде.

Помимо вышеупомянутых островков дивергенции, существует набор и других гаплотитов, которые, как принято считать, являются драйверами адапционного процесса. Например, мы посмотрели, как энтропия метилирования распределена в трёх инверсиях: на 1, 11 и 21 хромосоме [6]. Как и в случае с островками дивергенции, в инвертированных регионах пресноводных рыб наблюдалось резкое увеличение энтропии метилирования (Рис. 1).

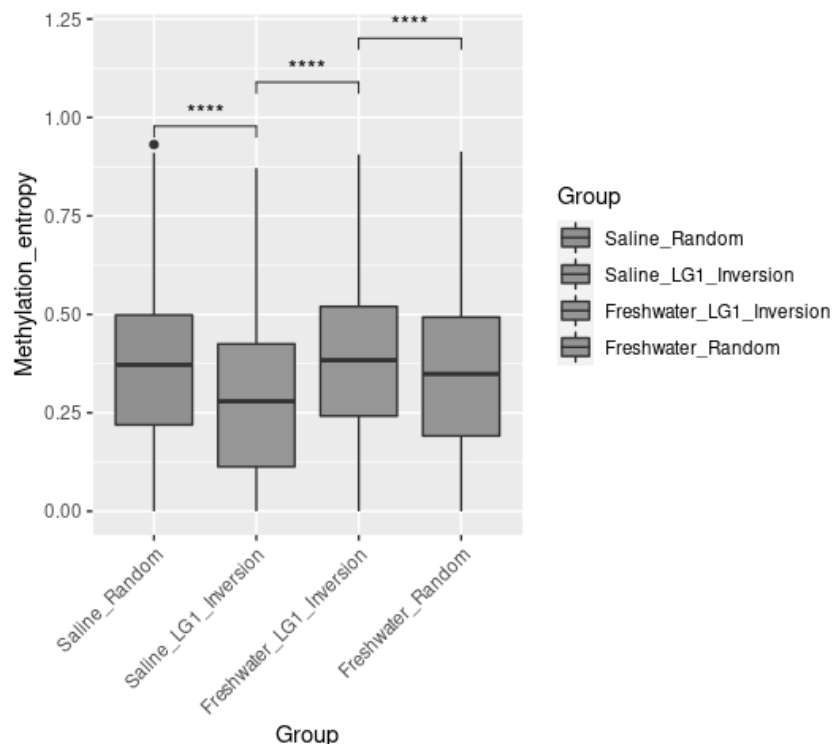


Рис. 1. Энтропия метилирования в инвертированных регионах по сравнению с полногеномным распределением

В недавней работе Робертса Кингмана и др. [7] был получен набор т.н. экопиков, содержащих гаплотипы, конвергентно эволюционирующие у пресноводных экотипов. Мы также охарактеризовали данные пики с перспективы энтропии метилирования, получив картину, схожую с инвертированными регионами (Рис. 2).

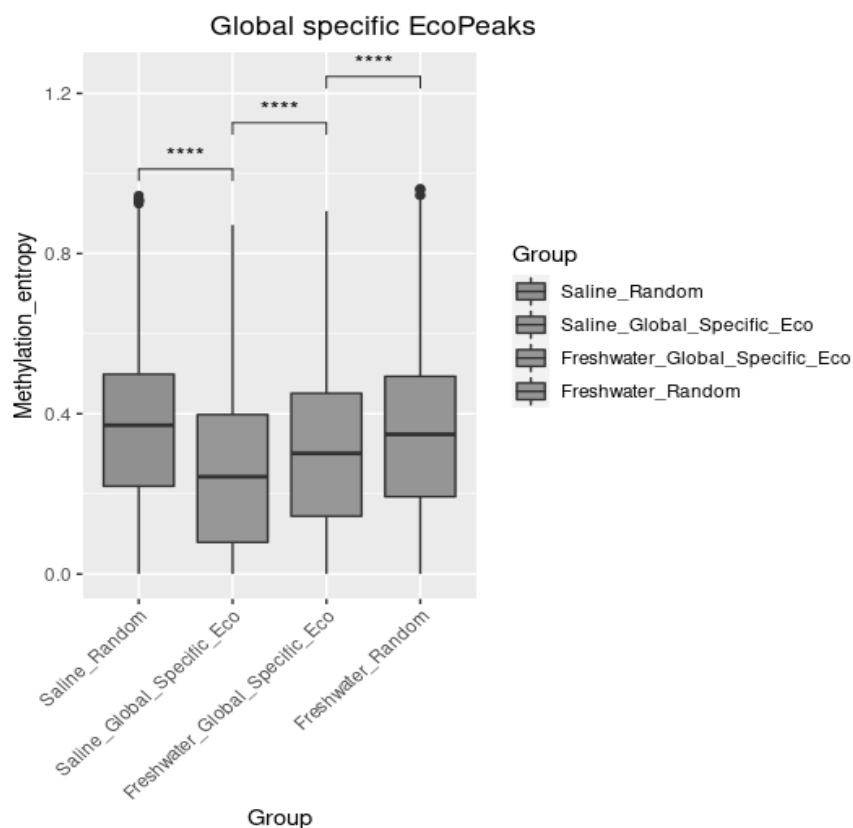


Рис. 2. Энтропия метилирования в глобальных специфичных экопиках по сравнению с полногеномным распределением

**Основные выводы.** В результате исследования DI-подобных областей у рыб, выловленных из различных ареалов обитания (Белое море, сев. часть Тихого океана, Атлантический океан), мы подтвердили гипотезу о том, что локусы, обогащённые устойчивыми генетическими вариациями (SGV), у всех популяций колюшки демонстрируют схожие паттерны метилирования ДНК, характеризующиеся резким увеличением энтропии метилирования в пресноводной среде. Это, в свою очередь, позволяет делать более глобальные выводы о синергии между устойчивыми генетическими вариациями и преддетерминированным метилированием ДНК.

### Литература

1. Hashimoto H., Vertino P.M., Cheng X. Molecular coupling of DNA methylation and histone methylation // Epigenomics. – 2010. – Vol. 2 (5). – P. 657-669.

2. Heckwolf M.J. et al. Two different epigenetic information channels in wild three-spined sticklebacks are involved in salinity adaptation // *Science advances*. – 2020. – Vol. 6 (12). – P. eaaz1138.
3. Reid K., Bell M.A., Veeramah K. R. Threespine stickleback: A model system for evolutionary genomics // *Annual review of genomics and human genetics*. – 2021. – Vol. 22. – P. 357-383.
4. Artemov A.V. et al. Genome-wide DNA methylation profiling reveals epigenetic adaptation of stickleback to marine and freshwater conditions // *Molecular biology and evolution*. – 2017. – Vol. 34 (9). – P. 2203-2213.
5. Terekhanova N.V. et al. Fast evolution from precast bricks: genomics of young freshwater populations of threespine stickleback *Gasterosteus aculeatus* // *PLoS genetics*. – 2014. – Vol. 10 (10). – P. e1004696.
6. Jones F.C. et al. The genomic basis of adaptive evolution in threespine sticklebacks // *Nature*. – 2012. – Vol. 484 (7392). – P. 55-61.
7. Roberts Kingman G.A. et al. Predicting future from past: The genomic basis of recurrent and rapid stickleback evolution // *Science Advances*. – 2021. – Vol. 7. (25). – P. eabg5285.

### **Список публикаций по теме работы**

#### *Статьи*

1. Kaplun D., Starshin A., Sharko F., Gainova K., Filonova G., Zhigalova N., Mazur A., Prokhortchouk E., Zhenilo S. Kaiso Regulates DNA Methylation Homeostasis // *International Journal of Molecular Sciences*. 2021. – Vol. 22 (14). – P. 7587.
2. Artemov A.V., Zhenilo S., Kaplun D., Starshin A., Sokolov A., Mazur A.M., Szpotan J., Gawronski M., Modrzejewska M., Gackowski D., Prokhortchouk E.B. An IDH-independent mechanism of DNA hypermethylation upon VHL inactivation in cancer // *Epigenetics*. – 2021. – P. 1-12.

#### *Тезисы докладов*

1. Старшин А.С. VHL как модулятор эпигенетического разнообразия // Сборник тезисов отчётной конференции аспирантов ФИЦ Биотехнологии РАН: направление подготовки 06.06.01 Биологические науки (24-28 июня 2019 г.) / под редакцией В.О. Попова, К.Г. Скрыбина; сост. Е.С. Титова. – М.: МАКС Пресс. – 2019. – P. 16-20. (тезисы и устный доклад)
2. Старшин А.С. Поиск новых мишеней E3 убиквитин-лигазы супрессора опухолей VHL // XXXI Зимняя молодёжная научная школа «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии» / под ред. Т.В. Овчинниковой, Л.И. Петровой, Москва: отпечатано на полиграфическом участке ИБХ РАН. – 2019. – С. 108.
3. Старшин А.С. VHL как модулятор эпигенетического разнообразия // Сборник тезисов отчётной конференции аспирантов ФИЦ Биотехнологии

РАН: направление подготовки 06.06.01 Биологические науки (22-30 июня 2020 г.) / под редакцией В.О. Попова, А.Н. Фёдорова; сост. Е.С. Титова. – М.: МАКС Пресс. – 2020. – Р. 25-28. (тезисы и устный доклад)

4. Старшин А.С. Изучение эпигенетической гетерогенности у *Gasterosteus aculeatus* // Сборник тезисов отчётной конференции аспирантов ФИЦ Биотехнологии РАН: направление подготовки 06.06.01 Биологические науки (21-25 июня 2021 г.) / под ред. В.О. Попова, А.Н. Фёдорова; сост. Е.С. Титова. – М.: ВАШ ФОРМАТ. – 2021. – С. 35-40. (тезисы и устный доклад)

5. Starshin A. Epiclinality alterations may contribute to adaptation of sticklebacks to different osmotic conditions // FEBS Open Bio, 2021. – Vol. 11 (S1). – P. 01.4-29.

**Starshin Alexey Stanislavovitch**  
**RESEARCH CENTRE OF BIOTECHNOLOGY RAS**

**STUDY OF EPIGENETIC HETEROGENEITY IN *GASTEROSTEUS ACULEATUS* MODEL SYSTEM**

**Abstract**

Studying mechanisms to determine the adaptation of organisms to changing environmental conditions is still an actual topic of modern biology. This kind of knowledge can be used in a variety of ways, from refining evolutionary models to improving the effectiveness of anticancer therapy in humans. This paper examines the contribution of epigenetics to convergent evolution in different ecotypes of *Gasterosteus aculeatus*. A general characterization of epigenetic heterogeneity was given for both marine and freshwater ecotypes, a number of loci were identified that explained up to 50% of the difference in epigenetic heterogeneity of the entire genome, a relationship was found between methylation entropy and a allelic frequency change, and a relationship was also found between methylation entropy and chromatin availability.

**Keywords:** *Gasterosteus aculeatus*, adaptations, epigenetic heterogeneity, methylation entropy

## ПРОФИЛЬ 1.5.4. БИОХИМИЯ

**Ламердонова Фатима Хасбияновна**

*аспирантка ФИЦ Биотехнологии РАН 1 года обучения*

*профиль 1.5.4. Биохимия*

*e-mail: lamertim@mail.ru*

Научный руководитель

**Александров Александр Иванович**

*кандидат биологических наук,*

*заместитель директора по научной работе,*

*зав. лабораторией молекулярной генетики*



### ИССЛЕДОВАНИЕ МЕХАНИЗМА ДЕЙСТВИЯ ГЕТЕРИЛТИОЦИАНАТА В КАЧЕСТВЕ ПЕРСПЕКТИВНОГО АНТИМИКОТИКА

**Аннотация.** *Грибковые патогены человека, а также сельскохозяйственных животных и растений приносят значительный ущерб. Для лечения системных микозов в настоящее время существует ограниченный ряд групп антигрибковых препаратов: азолы, полиеновые макролиды, флуцитозин и эхинокандины. Устойчивые формы патогенов практически ко всем этим веществам уже встречаются. В связи с этим, разработка новых антимикотиков является необходимой задачей. Нами был исследован перспективный антимикотик с неизвестным механизмом действия. Вещество, являющееся гетерилтиоцианатом было синтезировано в лаборатории биомедицинской химии В.А. Макарова, и показало эффективность против ряда грибковых патогенов. В моей работе для исследования механизма действия этого вещества был проведен скрининг полногеномной библиотеки делеционных штаммов дрожжей с целью обнаружения устойчивых и чувствительных мутантов. В результате мы установили, что мутанты с делециями генов, отвечающих за модификацию гистонов и устройство хроматина, а также мутанты с делециями различных компонентов цитоплазматических и митохондриальных рибосом имеют повышенную чувствительность.*

**Ключевые слова:** *антимикотики, противогрибковые вещества, скрининг, гетерилтиоцианат, полиены, азолы, пиримидины, эхинокандины*

Грибковые инфекции можно разделить на два типа: поверхностные, которые можно лечить местными противогрибковыми препаратами, и

диссеминированные (системные), поражающие внутренние органы и ткани. Последний тип инфекций часто опасен для жизни и требует быстрого и эффективного лечения с использованием парентеральных терапевтических средств. По существующим данным от грибковых инфекций ежегодно по всему миру умирает примерно 1,7 млн человек, что сопоставимо с количеством смертей от туберкулеза [1].

Разнообразие антимикотиков значительно ниже разнообразия антибактериальных средств. Это связано с тем, что грибы являются эукариотами и, следовательно, большинство агентов, токсичных для грибов, также токсичны для хозяина. Выбор эффективных противогрибковых средств для лечения системных микозов в настоящее время ограничивается флуцитозином, азолами, полиеновыми макролидами и эхинокандинами [1; 2; 3].

Лаборатория биомедицинской химии, заведующим которой является доктор фармацевтических наук Макаров Вадим Альбертович, предоставила нам перспективный антимикотик гетерилтиоцианат, обладающий активностью против ряда грибковых патогенов (дрожжи рода *Candida*, и грибы родов *Trichophyton*, *Cryptococcus* и *Fusarium*), а также показавшего высокую эффективность в мышинной модели вагинального кожного кандидоза.

Цель работы заключалась в идентификации различных аспектов механизма действия данного вещества. Первой задачей на этом пути был скрининг полногеномной библиотеки, состоящей из ~5000 делеционных штаммов дрожжей, 32 из которых оказались сверхчувствительными к данному препарату.

**Основные выводы.** В результате получили данные о том, что повышенной чувствительностью к гетерилтиоцианату обладают мутанты с делециями генов, отвечающих за модификацию гистонов и устройство хроматина, а также мутанты с делециями различных компонентов цитоплазматических и митохондриальных рибосом.

Предварительно эти данные указывают на роль эпигенетической пластичности в обеспечении устойчивости дрожжей к гетерилтиоцианату, т.е. для снижения вероятности гибели клетке необходима перестройка экспрессии генов, а также эффективная трансляция. Однако для идентификации основных мишеней и конкретных механизмов устойчивости к этому веществу требуется дальнейшая работа.

### **Литература**

1. Zotchev S.B. Polyene Macrolide Antibiotics and their Applications in Human Therapy // Current Medicinal Chemistry. – 2003. – Vol. 10. – P. 211-223.

2. Medoff G., Kobayashi G.S. Strategies in the treatment of systemic fungal infections // The New England Journal of Medicine. – 1980. – Vol. 302 (3). – P. 145-155.
3. Chandrasekar P. Management of invasive fungal infections: a role for polyenes // Journal of Antimicrobial Chemotherapy. – 2011. – Vol. 66. – P. 457-465.

**Lamerdonova Fatima Khasbiyanovna**  
**RESEARCH CENTER OF BIOTECHNOLOGY RAS**

**INVESTIGATION OF THE MECHANISM OF ACTION  
OF HETERYLTHIOCYANATE AS A PROMISING ANTIMICOTIC**

**Abstract**

Fungal pathogens in humans, as well as in agricultural animals and plants, cause significant damage. Currently there are limited numbers of antifungal drugs groups used to treat systemic mycoses: azoles, polyene macrolides, flucytosine and echinocandins. Almost all resistant forms of pathogens substance have already been observed. In this regard, the development of new antimycotics is the matter of utmost importance. We have studied a promising antimycotic with an unknown mechanism of action. The substance, which is a heterylthiocyanate, was synthesized in the laboratory of biomedical chemistry (headed by V. A. Makarov) has shown efficacy against a number of fungal pathogens. In my work, to investigate the mechanism of action of this substance, a genome-wide library of yeast deletion strains was screened in order to identify mutants resistant and sensitive to heterylthiocyanate. It was found that mutants with deletions of the genes responsible for the modification of histones and chromatin structure, as well as mutants with deletions of various components of cytoplasmic and mitochondrial ribosomes, had increased sensitivity.

**Keywords:** antimycotics, antifungal agents, screening, heterylthiocyanate, polyenes, azoles, pyrimidines, echinocandins



**Шабает Александр Викторович**

аспирант ФИЦ Биотехнологии РАН 1 года обучения

профиль 1.5.4. Биохимия

e-mail: a.shabaeff2011@yandex.ru

Научный руководитель

**Федорова Татьяна Васильевна**

кандидат технических наук,

зав. лабораторией молекулярных основ

биотрансформаций



## **ЛИГНОЛИТИЧЕСКИЙ КОМПЛЕКС БАЗИДИАЛЬНЫХ ГРИБОВ БЕЛОЙ ГНИЛИ РАЗЛИЧНЫХ ЭКОЛОГИЧЕСКИХ НИШ**

**Аннотация.** Изучены ростовые характеристики и проведена качественная оценка активности окислительных и целлюлолитических ферментов первичного ксилотрофа *Trametes hirsuta* LE-BIN 072 (Wulfen) Pilat (порядок Polyporales; семейство Polyporaceae) и вторичного ксилотрофа *Peniophora lycii* LE-BIN 2142 (Pers.) Hoenh. & Litsch (порядок Russulales; семейство Peniophoraceae) на твердых агаровых средах с различными видами древесных опилок (берёза, ольха и сосна). Проведено сравнение профиля секретуруемых ферментов базидиомицетов *T.hirsuta* и *P.lycii* при культивировании на жидких средах с различными типами древесных опилок (берёза, ольха и сосна). Идентифицированы основные белки лигнолитического комплекса данных грибов. Показано, что для *Trametes hirsuta* основными ферментами являются лакказы (AA1), пероксидазы класса II (AA2) и глиоксаль-оксидаза GLOX (AA5). В опилочных секретах *P. lycii* на всех средах в большом количестве идентифицирован FAD-binding domain-containing protein – ранее не описанный белок (из категории HP – hypothetical protein), который предположительно может являться основным ферментом лигнолитической системы данного гриба.

**Ключевые слова:** древесные опилки, базидиомицеты, лигнин, целлюлоза, секретом

Растительная биомасса – самый распространенный возобновляемый источник углерода на Земле. Многие микроорганизмы играют важную роль в деградации этой биомассы, обеспечивая глобальный цикл углерода. Грибы являются ключевыми участниками данного процесса, специализируясь на использовании растительной биомассы в качестве источника углерода, для чего вырабатывают ферменты, разрушающие полисахариды клеточной

стенки растений до метаболизируемых сахаров. Ферменты, деполимеризующие полисахариды растений, представляют большой интерес для биотехнологии, поскольку продукты их катализа могут использоваться в качестве прекурсоров в различных процессах, которые производят продукты на биологической основе, например топливо, бумагу, продукты питания, корм для животных, различные химикаты и др. [1; 3].

Базидиомицеты колонизируют или населяют разнообразный растительный материал в лесах, лугах, сельскохозяйственных угодьях и компосте. Различные виды базидиальных грибов имеют уникальные ферментативные системы, необходимые для колонизации той или иной экологической ниши: дереворазрушающие, подстилочные и гумусовые сапротрофы; симбионты и эндофиты, образующие микоризы и лишайники; паразиты, а также патогены растений и животных [4].

Дереворазрушающие базидиальные грибы белой гнили являются наиболее эффективными деструкторами древесной биомассы. Понимание механизмов, которые данные базидиомицеты используют для разложения биополимеров (лигнина, целлюлозы и гемицеллюлоз) клеточных стенок растений, находится в зачаточном состоянии по сравнению с исследованиями аскомицетов, в основном из-за традиционной и хорошо известной промышленной значимости некоторых аскомицетных грибов (рода *Aspergillus*, *Penicillium*). Поскольку ферментативный комплекс базидиомицетов, вероятно, отражает адаптацию к их уникальным природным нишам, данные грибы обладают огромным потенциалом для применения в различных отраслях промышленности, который до сих пор остается в значительной степени малоизученным, или неизученным вовсе [2].

В работе были проведены исследования ферментативного комплекса базидиомицетов из различных экологических ниш: *Trametes hirsuta* (Wulfen) Pilat (порядок Polyporales; семейство *Polyporaceae*) – дереворазрушающий первичный раневой ксилотроф; *Peniophora lycii* (Pers.) Höhn. & Litsch. (порядок Russulales; семейство *Peniophoraceae*) – лишайниковый вид с ресупинатными плодовыми телами, который обычно колонизирует мертвые ветви лиственных и хвойных пород деревьев по всему миру.

На первоначальном этапе проводилось изучение скорости роста грибных культур *Trametes hirsuta* LE-BIN 072 и *Peniophora lycii* LE-BIN 2142 на твёрдых агаровых средах, содержавших опилки разных видов древесины, таких как берёза, ольха и сосна, с параллельной качественной оценкой активности окислительных и целлюлолитических ферментов. Показано, что линейная скорость роста *T. hirsuta* на всех средах выше, чем *P. lycii*. При этом скорости роста на опилках берёзы и ольхи примерно одинаковы у обоих

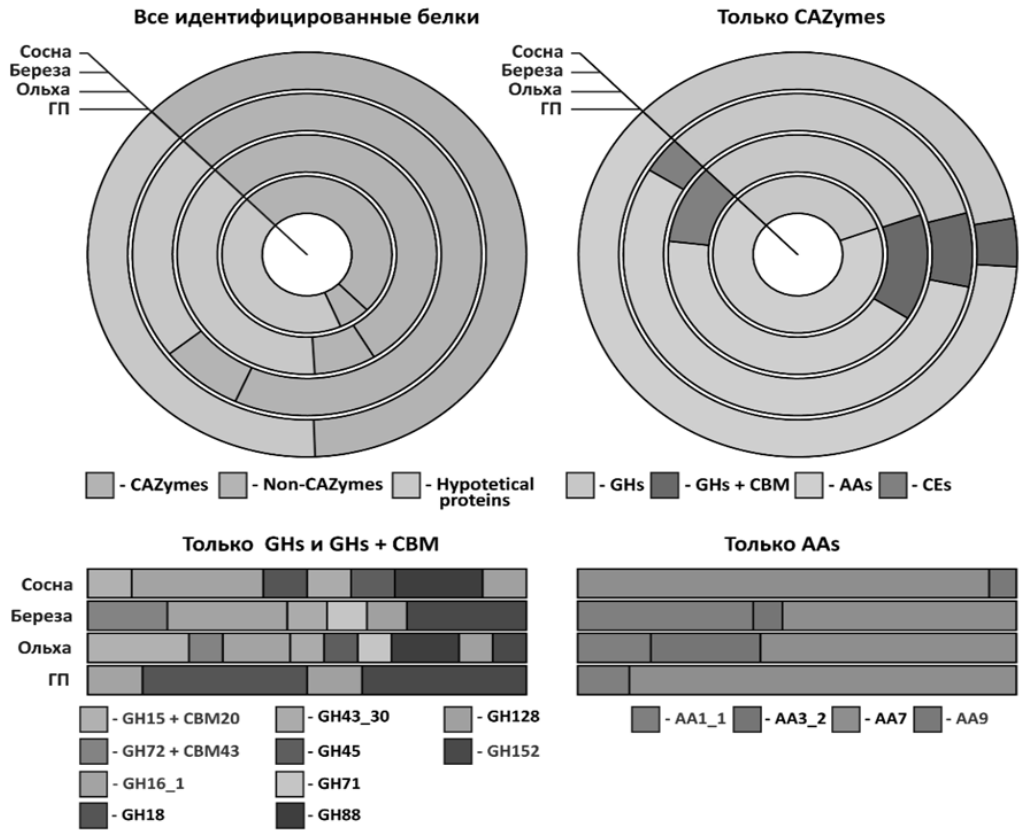
грибов и сопоставимы со скоростями их роста на контрольной среде (агаровая среда без внесения опилок). В то время как на опилках сосны скорость роста обоих штаммов была несколько ниже, по сравнению с ольхой и берёзой, причем у *P. lycii* задержка роста на сосне более выражена, по сравнению с *T. hirsuta*.

Качественная оценка активности окислительных и целлюлолитических ферментов при твердофазном культивировании *T. hirsuta* 072 и *P. lycii* 2142 на различных древесных субстратах показала, что оба гриба синтезируют внеклеточные оксидазы и целлюлазы, однако наибольшие оксидазная и целлюлазная активности обнаружены у *T. hirsuta*, по сравнению с *P. lycii*. При этом интенсивность качественной реакции при оценке ферментивных активностей гриба *T. hirsuta* была сопоставима для всех типов древесных опилок (за исключением оксидазной активности на сосне, которая уменьшалась), в тоже время интенсивность как оксидазной, так и целлюлазной активностей *P. lycii* зависела от вида древесного субстрата, на котором культивировался данный ксилотроф.

На втором этапе для более детального изучения ферментов, задействованных в процессах биodeградации лигноцеллюлозных субстратов, было проведено сравнительное исследование секретомов при полутвердофазном культивировании базидиомицетов *T. hirsuta* 072 и *P. lycii* 2142 на глюкозопептонных (ГП) среде, содержащей разные типы древесных опилок – береза (ГпБ), ольха (ГпО) и сосна (ГпС).

Сравнительный анализ секретомов (экзопротеомов) показал, что для гриба *T. hirsuta* основными секретирруемыми на всех средах углеводно-активными ферментами (CAZy) являлись лакказы (AA1), пероксидазы (AA2) и глиоксаль-оксидаза GLOX (AA5), генерирующая пероксид водорода, необходимый для функционирования пероксидаз (Рис. 1). Так у *T. hirsuta* на всех средах наблюдалась значительная секреция изоферментов марганец (MnP5) и версатил (VP2) пероксидаз. Дополнительно на средах ГП и ГпС наблюдалась секреция лигнин пероксидазы LiP9. В тоже время все экзопротеомы *P. lycii* характеризовались полным отсутствием лигнолитических пероксидаз (AA2), а в сосновом секретоме не обнаружены также и лакказы (AA1). При этом на всех средах у *P. lycii* наблюдалась преобладающая секреция FAD-binding domain-containing protein – ранее не описанного белка (из категории НР – hypothetical protein), который предположительно может являться основным ферментом лигнолитической системы данного гриба (Рис. 1).

### *Peniophora lycii* LE-BIN 2142



### *Trametes hirsuta* LE-BIN 072

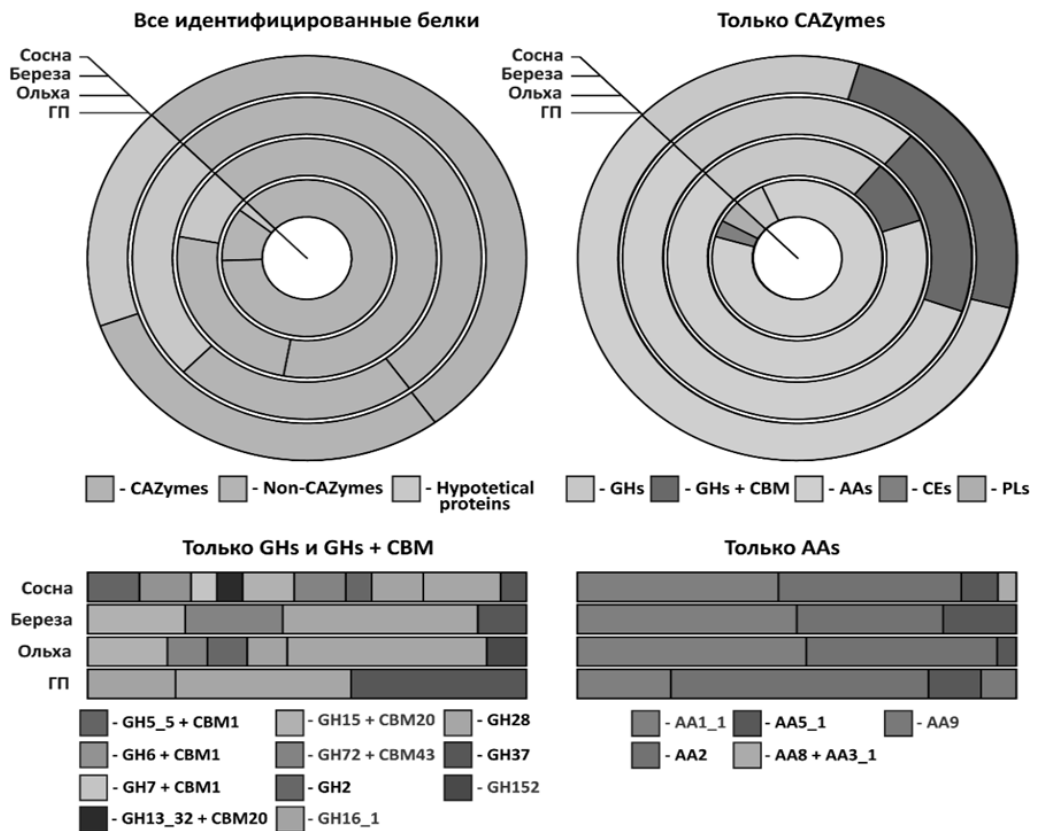


Рис. 1. Сравнительный анализ белков секрета первичного *Trametes hirsuta* LE-BIN и вторичного *Peniophora lycii* LE-BIN 2142 ксилотрофов при полу-твердофазном культивировании на глюкозопептонной (ГП) среде, содержащей разные типы древесных опилок – ольха, береза и сосна

Спектр идентифицированных гликозид-гидролаз в опилочных секретах гриба *T.hirsuta* говорит о преимущественной и предпочтительной гидролитической активности данного гриба в отношении геммицеллюлозы и пектина. Среди семейств гликозил гидролаз (GH) базидиомицета *T. hirsuta*, участвующих в деградации полисахаридов (целлюлозы, гемицеллюлозы и пектина), в секретах были идентифицированы белки таких семейств как GH2, GH5, GH6, GH7, GH13, GH15-CBM20, GH16, GH28, GH37 и GH72-CBM43, а также карбоксил-эстеразы (CE) из нескольких семейств (CE9 и CE16) и полисахарид-лиаза 8 семейства (PL8). Причем основную долю опилочных секретов составляет GH28 – эндо-полигалактуроноза PG1 (КФ: 3.2.1.15), также известная как пектиндеполимераза, или пектолаза, или пектингидролаза, гидролизует  $\alpha$ -1,4-гликозидные связи между остатками галактуроновой кислоты, входящей в состав пектина (Рис.). Её количество отличается на разных средах и убывает в ряду: ГпБ>ГпО>ГпС>ГП.

В опилочных секретах гриба *P.lycii* обнаружено наличие большого количества гемицеллюлаз что предполагает его потенциально сильную способность к деградации гемицеллюлозы. При этом спектр GH семейств гриба *P. lycii* отличается от такового *T.hirsuta*. У *P.lycii* идентифицированы белки таких семейств как GMC оксидоредуктаза, GH16, GH18, GH43, GH71, GH88, GH128 и GH15-CBM20 (GH15 с карбогидратсвязывающим модулем CBM20) (Рис.). При этом основная доля приходится на GH16 и GH43. GH45+GH71. GH16 – грибная Lam16A глюканаза, которая принадлежит к «неспецифическому» подсемейству эндо-1,3(4)- $\beta$ -глюканаз (КФ 3.2.1.39), которая гидролизует основную цепь в  $\beta$ -D-глюканах гемицеллюлозы (эндогидролиз 1,3- или 1,4-связей).

Количество Lam16A глюканазы значительно отличалось на разных средах и убывало в ряду: ГпО $\approx$ ГпС>ГпБ>ГП. Семейство GH43, которое включает в основном гемицеллюлазы с  $\alpha$ -L-арабинофуранозидазной (КФ 3.2.1.55) и эндо- $\alpha$ -L-арабинаназной (КФ 3.2.1.99) активностями, катализирующие расщепление арабинозосодержащих полимеров, как-то ксилоглюкан, галактоманнан, арабиноксилан и пектин. На средах ГпБ и ГпО дополнительно обнаружено семейство GH71 –  $\alpha$ -1,3-глюканазы (мутаназы, КФ 3.2.1.59), осуществляющие гидролиз  $\alpha$ -1,3-глюкана.

**Основные выводы.** Спектр идентифицированных гликозид-гидролаз говорит, о преимущественной гидролитической активности грибов *T.hirsuta* LE-BIN 072 и *P.lycii* LE-BIN 2142 в отношении таких полисахаридов, как гемицеллюлоза и пектин. Однако профиль гликозид-гидролаз у этих двух базидиомицетов сильно различается, что свидетельствуют о деструкции разных полисахаридов в составе гемицеллюлозы. При этом также показано

существенное различие комплекса лигнолитических ферментов для разрушения древесины данными грибами.

### **Литература**

1. Болотникова О.И., Михайлова Н.П., Базарнова Ю.Г. и др. Проблемы и перспективы использования микроорганизмов для утилизации отходов лигноцеллюлозы // Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология. – 2019. – Т. 9. – № 4. – С. 679-693.
2. Asemoloye M.D., Marchisio M.A., Gupta V.K. et al. Genome-based engineering of ligninolytic enzymes in fungi // Microbial cell factories. – 2021. Vol. 20 (1). – P. 1-18.
3. Bugg T.D., Ahmad M., Hardiman, E.M. et al. Pathways for degradation of lignin in bacteria and fungi // Natural product reports. – 2011. – Vol. 28 (12). – P. 1883-1896.
4. Osono T. Functional diversity of ligninolytic fungi associated with leaf litter decomposition // Ecological Research. 2020. – Vol. 35 (1). – P. 30-43.

**Shabaev Alexander Viktorovich**  
**RESEARCH CENTER OF BIOTECHNOLOGY RAS**

### **LIGNOLYTIC COMPLEX OF BASIDIAL WHITE ROT FUNGI OF VARIOUS ECOLOGICAL NICHES**

#### **Abstract**

Growth characteristics were studied and a qualitative assessment of the activity of oxidative and cellulolytic enzymes of the primary xylotrophe *Trametes hirsuta* LE-BIN 072 (Wulfen) Pilat (order Polyporales; family Polyporaceae) and secondary xylotrophe *Peniophora lycii* LE-BIN 2142 (Pers.) Hoehn was carried out. & Litsch (order Russulales; family Peniophoraceae) on solid agar media with various types of sawdust (birch, alder and pine). The profile of secreted enzymes of *T.hirsuta* and *P.lycii* basidiomycetes was compared when cultured on liquid media with various types of sawdust (birch, alder and pine). The main proteins of the lignolytic complex of these fungi have been identified. It has been shown that for *Trametes hirsuta*, the main enzymes are laccases (AA1), class II peroxidases (AA2) and glyoxal oxidase GLOX (AA5). In the sawdust secrets of *P. lycii* has been identified in large quantities on all media FAD-binding domain-containing protein – a previously undescribed protein (from the HP – hypothetical protein category), which presumably may be the main enzyme of the lignolytic system of this fungus.

**Keywords:** sawdust, basidiomycetes, lignin, cellulose, secret

**Бакунова Алина Константиновна**

*аспирант ФИЦ Биотехнологии РАН 2 года обучения*

*профиль 1.5.4. Биохимия*

*e-mail: albakunova@mail.ru*

Научный руководитель

**Безсуднова Екатерина Юрьевна**

*кандидат химических наук,*

*с.н.с. лаборатории инженерной энзимологии*



## **ХАРАКТЕРИСТИКА СТАБИЛЬНОСТИ ТРАНСАМИНАЗЫ D-АМИНОКИСЛОТ ИЗ *HALISCOMENOBACTER HYDROSSIS***

**Аннотация.** *Пиридоксаль-5'-фосфат (PLP) зависимые трансаминазы (ТА) являются промышленно значимыми ферментами и применяются для стереоселективного аминирования органических соединений. В работе проведен анализ каталитической эффективности трансаминазы D-аминокислот в реакциях аминирования широкого ряда кетокислот. Исследована стабильность апоформы фермента. Проанализированы процессы диссоциации кофактора из холоформы и ассоциации кофактора с апоформой ТА.*

**Ключевые слова:** *трансаминазы, биокатализ, стабильность, пиридоксаль-5'-фосфат (PLP)*

Пиридоксаль-5'-фосфат (PLP) зависимые трансаминазы (ТА) – ключевые ферменты метаболизма аминокислот во всех организмах: ТА катализируют обратимый стереоселективный перенос аминогруппы с аминокислоты/аминна на кетокислоту/кетон с образованием новой аминокислоты/аминна и новой кетокислоты/кетона. В биотехнологии ТА востребованы в процессах стереоселективного аминирования органических соединений [1]. Помимо субстратной специфичности и скорости реакции важной характеристикой фермента, как биокатализатора, является его стабильность. Кроме устойчивости белковой глобулы и целостности активного центра, критичным параметром стабильности ТА является стабильность холоформ – ковалентного соединения кофактора PLP с молекулой ТА и нековалентного комплекса (пиридоксамин-5'-фосфат PMP) с молекулой фермента. Одним из возможных путей деградации ТА является диссоциация кофактора, которая приводит к инактивации фермента, изменениям в трехмерной структуре и далее к агрегации.

На предыдущем этапе работы была охарактеризована новая ТА из *Haliscomenobacter hydrossis* (Halhy) [2], которая принадлежит к

суперсемейству трансаминаз IV типа укладки PLP-связывающего домена. Halhu отличается высокой скоростью деаминирования разнообразных D-аминокислот и (R)-стереоселективным аминированием кетокислот, энантиомерный избыток D-продукта составляет более 99,3%. Также фермент показывает высокую стабильность при оптимальных условиях для катализа, K-фосфатный буфер, pH 8, 40-50 °C.

В настоящей работе в контексте применимости ТА Halhu в биокаталитических процессах стереоселективного синтеза природных и неприродных D-аминокислот, были получены кинетические параметры реакций аминирования широкого ряда кетокислот, включающих кетоаналоги алифатических (с длиной углеводородной цепи C4-C6), ароматических и фосфиновых D-аминокислот.

В рамках исследования стабильности ТА Halhu при хранении и в реакционных условиях был проведен анализ кинетической стабильности апоформы фермента в сравнении с его холоформой при 40 и 50°C. Был исследован процесс регенерации холоформы Halhu. Для этого была определена константа диссоциации комплекса Halhu-PLP как кинетическим методом, так и методом тушения триптофановой флуоресценции. Спектральным методом были определены константы скорости ассоциации PLP с апоформой Halhu и диссоциации PLP и PMP из соответствующих холоформ фермента. Также была оценена скорость утечки кофактора PLP из активного центра Halhu в ходе трансаминазной реакции.

#### **Основные выводы:**

- 1) Апоформа Halhu имеет сравнимую с холоформой стабильность при 40°C. При 50°C период полуинактивации апоформы значительно ниже (10 мин), чем холоформы (24 часа).
- 2) Константа диссоциации ( $K_d$ ) комплекса Halhu-PLP составила 3 мкМ, таким образом, аффинность Halhu к PLP укладывается в диапазон  $K_d$  (PLP) охарактеризованных ТА (0.15-70 мкМ). Определены оптимальные условия регенерации холоформы Halhu: K-фосфатный буфер, pH 8, 40°C, 30 мкМ PLP.

#### **Литература**

1. Slabu I., Galman J.L., Lloyd R.C., Turner N.J. Discovery , Engineering , and Synthetic Application of Transaminase Biocatalysts // ACS Catalysis. – 2017. – Vol. 7 (12). – P. 8263-8284.
2. Bakunova A.K., Nikolaeva A.Y., Rakitina T.V., Isaikina T.Y., Khrenova M.G., Boyko K.M., Popov V.O., Bezsudnova E.Y. The Uncommon Active Site of D-Amino Acid Transaminase from *Haliscomenobacter hydrossis*: Biochemical and Structural Insights into the New Enzyme // Molecules. – 2021. – Vol. 26 (16). – P. 1-18.



### Список публикаций по теме работы

Bakunova A.K., Nikolaeva A.Y., Rakitina T.V., Isaikina T.Y., Khrenova M.G., Boyko K.M., Popov V.O., Bezsudnova E.Y. The Uncommon Active Site of D-Amino Acid Transaminase from *Haliscomenobacter hydrossis*: Biochemical and Structural Insights into the New Enzyme // *Molecules*. – 2021. – Vol. 26 (16). – P. 1-18.

#### Тезисы докладов

1. Бакунова А.К. Биохимическая и структурная характеристика новой трансаминазы D-аминокислот из *Haliscomenobacter hydrossis* // Сборник тезисов отчётной конференции аспирантов ФИЦ Биотехнологии РАН: направление подготовки 06.06.01 Биологические науки (21-25 июня 2021 г.) / под редакцией В.О. Попова, А.Н. Фёдорова; сост. Е.С. Титова. – М.: ВАШ ФОРМАТ. – 2021. — С. 41-43. (тезисы и устный доклад)
2. Бакунова А.К., Ракитина Т.В., Бойко К.М., Безсуднова Е.Ю. Трансаминаза D-аминокислот из *Haliscomenobacter hydrossis* – потенциальный биокатализатор синтеза природных и не природных D-аминокислот // Современные проблемы теоретической и экспериментальной химии: Межвуз. сборник науч. трудов XV Всероссийск. конф. молодых ученых с международ. участием. – Саратов: Изд-во «Саратовский источник». – 2021. – С. 54-56.

### Основные достижения

Диплом за лучший доклад на ежегодной отчетной конференции аспирантов ФИЦ Биотехнологии РАН, 2021 г.

**Bakunova Alina Konstantinovna**  
**RESEARCH CENTRE OF BIOTECHNOLOGY RAS**

### **CHARACTERIZATION OF THE STABILITY OF D-AMINO ACID TRANSAMINASE FROM *HALISCOMENOBACTER HYDROSSIS***

#### **Abstract**

Pyridoxal-5'-phosphate (PLP) dependent transaminases (TA) are industrially important enzymes and are used for stereoselective amination of organic compounds. In this work, we analyzed the catalytic efficiency of D-amino acid transaminase in amination reactions of a wide range of ketoacids. The stability of the apo form of the enzyme was studied. The processes of dissociation of the cofactor from the holo form and association of the cofactor with the TA apo form were analyzed.

**Keywords:** transaminases, biocatalysis, stability, pyridoxal-5'-phosphate (PLP)

*Работа поддержана грантом РФФ № 19-14-00164*

**Варфоломеева Лариса Александровна**

*аспирант ФИЦ Биотехнологии РАН 2 года обучения*

*профиль 1.5.4. Биохимия*

*e-mail: larisaavarfolomeeva@gmail.com*

Научный руководитель

**Бойко Константин Михайлович**

*кандидат биологических наук,*

*с.н.с. лаборатории инженерной энзимологии*

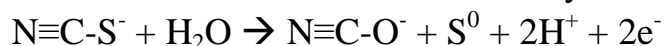


## **ИЗУЧЕНИЕ МЕХАНИЗМА ДЕЙСТВИЯ ТИОЦИАНАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ МЕТОДОМ РЕНТГЕНОСТРУКТУРНОГО АНАЛИЗА**

**Аннотация.** *Медьсодержащий фермент тиоцианатдегидрогеназа (TcDH) катализирует реакцию окисления тиоцианата до цианата и элементной серы. Для подтверждения гипотетического механизма каталитической стадии реакции были определены структуры свободного фермента из *Hydrogenophila bacterium* (hbTcDH) и комплекса фермента с ингибитором тиомочевинной с атомным разрешением.*

**Ключевые слова:** *тиоцианатдегидрогеназа, асимметричный димер, трехъядерный медный кластер, комплекс с тиомочевинной, атомное разрешение, рентгеноструктурный анализ*

Недавно в нашей лаборатории была установлена пространственная структура и был предложен молекулярный механизм действия для нового класса ферментов – тиоцианатдегидрогеназы (TcDH) [1]. Фермент катализирует реакцию окисления тиоцианата по следующей схеме:



В активном центре TcDH располагается уникальный трехъядерный медный кластер. Пространственная структура TcDH из микроорганизма *Thioalkalivibrio paradoxus* (tpTcDH) была определена с высоким разрешением 1.45 Å (PDB code: 6I3Q). Однако сильная анизотропия дифракционных наборов и двойникование кристаллов tpTcDH ухудшили качество структурных данных и, тем самым, не позволили точно охарактеризовать координационную сферу ионов меди активного центра.

В ходе функционирования медьсодержащих белков происходит реорганизация их медных кластеров. Координационная сфера ионов меди изменяется в соответствии со степенью их окисления. Установление степени окисления иона меди активного центра на основании его координации возможно только с использованием структурных данных высокого качества с

атомным разрешением. Так благодаря атомному разрешению кристаллов лакказы из *Steccherinum murashkinskyi*, удалось интерпретировать разные состояния активного центра фермента при протекании реакции в кристалле под действием рентгеновского излучения и предложить на основании структурных данных механизм действия [2].

Для получения кристаллов TcDH высокого качества, был проведен поиск гомологичных ферментов у других микроорганизмов. В качестве объекта исследования в работе была выбрана TcDH из микроорганизма *Hydrogenophilia bacterium* (hbTcDH). На первом этапе работы был проведен первичный поиск условий кристаллизации hbTcDH с использованием кристаллизационного робота oyx4 (Douglas instruments, UK) и наборов коммерческих реактивов (Hampton research, USA) методом диффузии паров в «сидячей» капле. После оптимизации найденных условий кристаллизации вручную были получены крупные кристаллы фермента (300–400 мкм) в виде пластинок. Кристаллы hbTcDH принадлежали к пространственной группе  $P2_12_12_1$  и давали дифракционную картину с атомным разрешением. Кристаллы hbTcDH оказались перспективными для рентгеноструктурных исследований тонких деталей активного центра.

В отличие от всех структур trTcDH, где в независимой части элементарной ячейки располагается тетрамер фермента, в структуре hbTcDH находится димер фермента. В тетрамере trTcDH все субъединицы были обнаружены в одной конформации. Напротив, димер hbTcDH асимметричен: одна субъединица находится в «закрытой» конформации, а вторая – в «открытой». Субъединицы димера hbTcDH в разных конформациях отличаются доступностью активного центра для растворителя. В «закрытой» конформации остатки Pro 255 и Phe 400 перекрывают субстратный канал, ведущий в активный центр hbTcDH. В «открытой» конформации остатки Pro 255 и Phe 400 не препятствуют связыванию цепочки молекул воды в субстратном канале.

Строение активного центра hbTcDH идентично строению активного центра trTcDH. В активном центре субъединиц hbTcDH в «закрытой» и «открытой» конформациях для каждого иона меди трехъядерного кластера можно выделить по два состояния. Благодаря атомному разрешению, для каждого состояния иона меди был точно определен тип координации и на ее основании установлена степень окисления. Выявление корреляции между заселенностью ионов меди в разных позициях и заселенностью их лигандов позволило для субъединиц в «закрытой» и «открытой» конформациях выделить два состояния кластера, окисленное и восстановленное. При этом

окисленное состояние медного кластера h**TcDH** у субъединиц в разных конформациях отлично.

На следующем этапе работы были проведены эксперименты по настаиванию кристаллов h**TcDH** с ингибитором тиомочевинной и продуктом реакции цианатом (CNO<sup>-</sup>). Кристаллы фермента помещали в кристаллизационный раствор, содержащий 10 или 100 мМ ингибитора или продукта. Структуру комплекса h**TcDH** с продуктом реакции получить не удалось: ион цианата отсутствовал в активном центре фермента. Структура комплекса фермента с тиомочевинной была определена с атомным разрешением. Ингибитор связался только в активном центре «закрытой» субъединицы асимметричного димера h**TcDH**. В структуре комплекса фермента с тиомочевинной для субъединиц в «закрытой» и «открытой» конформациях можно также выделить окисленное и восстановленное состояние медного кластера, аналогичные таковым состояниям структуры свободного фермента. Комплекс h**TcDH** с тиомочевинной напоминает переходное состояние, которое возникает в ходе реакции окисления тиоцианата по предложенному ранее механизму [1]. Атом серы тиомочевинной соответствует атому серы тиоцианата, атом азота одной из аминок групп тиомочевинной соответствует атому азота тиоцианата, а атом азота второй аминок группы занимает положение атакующей молекулы воды. На основании полученных структурных данных с атомным разрешением можно детализировать механизм реакции, катализируемой **TcDH**.

**Основные выводы.** Кристаллы h**TcDH** перспективны для дальнейших рентгеноструктурных исследований. Димер h**TcDH** асимметричен: одна субъединица находится в «закрытой» конформации, вторая – в «открытой». Для субъединицы в «закрытой» и «открытой» конформациях можно выделить два состояния медного кластера, окисленное и восстановленное. Получена структура комплекса h**TcDH** с ингибитором тиомочевинной.

### Литература

1. Tikhonova T.V., Sorokin D.Y., Hagen W.R., Khrenova M.G., Muyzer G., Rakitina T.V., Shabalin I.G., Trofimov A.A., Tsallagov S.I., Popov V.O. Trinuclear copper biocatalytic center forms an active site of thiocyanate dehydrogenase // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2020. – Vol. 117 (10). – P. 5280-5290.
2. Polyakov K.M., Gavryushov S., Ivanova S., Fedorova T.V., Glazunova O.A., Popov A.N., Koroleva O.V. Structural study of the X-ray-induced enzymatic reduction of molecular oxygen to water by *Steccherinum murashkinskyi* laccase:

Insights into the reaction mechanism // Acta Crystallographica. Section D: Structural Biology. – 2017. – Vol. 73 (Pt. 5). – P. 388-401.

### Список публикации по теме работы

Khrenova M.G., Soloveva A.Yu., Varfolomeeva L.A., Tikhonova T.V., Popov V.O. The O to S substitution in urea brings inhibition activity against thiocyanate dehydrogenase // Mendeleev Communication. – 2021. – Vol. 31 (3). – P. 373-375.

#### Тезисы докладов

1. Varfolomeeva L.A., Polyakov K.M., Komolov A.S., Rakitina T.V., Tikhonova T.V., Popov V.O. Crystallization and structure analysis of the mutant forms of thiocyanate dehydrogenase from *Thioalkalivibrio paradoxus* // 12<sup>th</sup> International Conference «Biocatalysis-2019: Fundamentals and Applications» (24-28 июня 2019, г. Санкт-Петербург). – 2019. (стендовый доклад)
2. Варфоломеева Л.А., Поляков К.М., Комолов А.С., Ракитина Т.В., Тихонова Т.В., Попов В.О. Кристаллизация и структурный анализ мутантных форм тиоцианатдегидрогеназы из бактерии *Thioalkalivibrio paradoxus* с заменами K281A и K264A, K267A // Сборник тезисов II студенческого биохимического форума. – 2020. – С. 21-22. (стендовый доклад)
3. Варфоломеева Л.А., Поляков К.М., Комолов А.С., Ракитина Т.В., Бойко К.М., Тихонова Т.В., Попов В.О. Модификация поверхностных остатков тиоцианатдегидрогеназы (ТСДН) предотвращает двойникование кристаллов фермента // Сборник тезисов «XXXIII Зимняя молодежная научная школа «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии» (8-11 февраля 2021, ИБХ РАН). – 2021. – С. 8. (стендовый доклад)
4. Варфоломеева Л.А. Изучение механизма реакции тиоцианатдегидрогеназы методом рентгеноструктурного анализа // Сборник тезисов отчётной конференции аспирантов ФИЦ Биотехнологии РАН: направление подготовки 06.06.01 Биологические науки (21-25 июня 2021 г.) / под ред. В.О. Попова, А.Н. Фёдорова; сост. Е.С. Титова. – М.: ВАШ ФОРМАТ. – 2021. – С. 44-47. (устный доклад)
5. Варфоломеева Л.А., Поляков К.М., Шипков Н.С., Дергоусова Н.И., Бойко К.М., Тихонова Т.В., Попов В.О. Перестройки медного кластера тиоцианатдегидрогеназы из *Hydrogenophilia bacterium* в процессе каталитической реакции на основе рентгеноструктурных данных с атомным разрешением // Сборник тезисов «XXXIV Зимняя молодежная научная школа «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии» (8-11 февраля 2022, ИБХ РАН). – 2022. – С. 13. (устный доклад)

## **Основные достижения**

Призер в конкурсе работ молодых ученых в XXXIV Международной зимней молодежной научной школе «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии» за работу «Перестройки медного кластера тиоцианатдегидрогеназы из *Hydrogenophilia bacterium* в процессе каталитической реакции на основе рентгеноструктурных данных с атомным разрешением», 2021 г.

**Varfolomeeva Larisa Aleksandrovna**  
**RESEARCH CENTER OF BIOTECHNOLOGY RAS**

## **STUDY OF THE MECHANISM OF THE ACTION OF THIOCYANATE DEHYDROGENASE BY THE METHOD OF X-RAY ANALYSIS**

### **Abstract**

The copper-containing enzyme thiocyanate dehydrogenase (TcDH) catalyzes the oxidation of thiocyanate to cyanate and sulfur. To confirm the hypothetical mechanism of the catalytic reaction, the structures of free hbTcDH (from *Hydrogenophilia bacterium*) and the complex of the enzyme with the inhibitor thiourea were determined at atomic resolution.

**Keywords:** thiocyanate dehydrogenase, asymmetric dimer, trinuclear copper cluster, complex with thiourea, atomic resolution, X-ray diffraction analysis

**Кривицкая Александра Вячеславовна**

*аспирант ФИЦ Биотехнологии РАН 2 года обучения*

*профиль 1.5.4. Биохимия*

*e-mail: al\_krivickaya@mail.ru*

Научный руководитель

**Хренова Мария Григорьевна**

*доктор физико-математических наук, профессор РАН,*

*руководитель группы молекулярного моделирования*



## **МЕХАНИЗМЫ РЕАКЦИИ ГИДРОЛИЗА ИМИПЕНЕМА МЕТАЛЛО- $\beta$ -ЛАКТАМАЗАМИ NDM-1 И L1**

**Аннотация.** *В данной работе представлены результаты исследования механизма реакции гидролиза имипенема в активном центре металло- $\beta$ -лактамаз L1 и NDM-1 с использованием комбинированного подхода квантовой механики/молекулярной механики. Проведен ряд молекулярно-динамических расчетов, позволяющих описать поведения гидролизованного имипенема в растворе и сделать предположения об итоговых продуктах реакции. Полученные результаты соответствуют известным экспериментальным данным.*

**Ключевые слова:** *металло- $\beta$ -лактамаза, L1, NDM-1, имипенем, бактериальная резистентность, молекулярная динамика, комбинированный метод квантовой механики/молекулярной механики*

Неуклонно растет число случаев устойчивости бактерий к  $\beta$ -лактамным антибиотикам в клинической практике. На сегодняшний день борьба с бактериальной резистентностью является одной из самых сложных задач. Превалирующим механизмом бактериальной резистентности является экспрессия бактериальных ферментов  $\beta$ -лактамаз, которые инактивируют  $\beta$ -лактамные антибиотики посредством реакции гидролиза.

В данной работе рассмотрен процесс гидролиза антибиотика имипенема из класса карбапенемов металло- $\beta$ -лактамазами L1 и NDM-1. Реакция инициируется нуклеофильной атакой каталитического гидроксид-аниона, что в дальнейшем приводит к разрыву  $\beta$ -лактамного кольца и, таким образом, образованию отрицательно заряженного интермедиата реакции. В этом интермедиате заряд делокализован между тремя атомами пирролинового кольца имипенема, –  $\text{NC}_2\text{C}_3^-$ . Затем происходит протонирование этого интермедиата, однако на какой атом, N или  $\text{C}_3$ , неизвестно. Из экспериментальных данных известно, что конечным продуктом реакции для обоих ферментов является протонированный по

углероду R-изомер имипенема, который с течением времени эпимеризуется в S-изомер [1]. Однако неясно, образуется ли C-продукт R-изомер в активном центре ферментов или же в результате таутомеризации N-продукта импенема в растворе.

В ходе работы изучены особенности строения фермент-субстратных комплексов L1 и NDM-1. Фермент L1 относится к подклассу металло- $\beta$ -лактамаз B3, в активном центре которого находятся два катиона цинка,  $Zn^{2+}$ , гистидины, координирующие цинки, каталитическая аспарагиновая кислота и каталитический гидроксид анион. NDM-1 относится к подклассу B1, в активном центре которого также находятся два катиона цинка,  $Zn^{2+}$ , гистидины, координирующие цинки и цистеин, образующий связь с  $Zn1$ , каталитическая аспарагиновая кислота и каталитический гидроксид анион. Значимой структурной особенностью является разное положение петли 10 в ферментах. В L1 имипенем накрыт петлей 10, над имипенемом находится Pro226. В NDM-1 над субстратом находится гибкий Gly219, и петля 10 больше отодвинута от имипенема ввиду чего он более «открыт» раствору, что обуславливает возможность альтернативного хода реакции в активном центре NDM-1.

Энергетический профиль реакции был рассчитан комбинированным методом молекулярной механики с квантово-механическими потенциалами. Фермент-субстратный комплекс L1 и имипенема был получен из кристаллической структуры PDB ID: 2AIO [2], а фермент-субстратный комплекс NDM-1 и имипенема был получен из кристаллической структуры PDB ID: 5YPK [3]. Квантово-механическая подсистема включала в себя имипенем, два катиона цинка,  $Zn^{2+}$ , и боковые цепи аминокислотных остатков, образующие с ними координационные связи, каталитический гидроксид-анион, воды и боковые цепи, образующие водородные связи с имипенемом. Рассчитанные профили химической реакции демонстрируют, что предпочтительным продуктом гидролиза обоих ферментов является N-продукт. В NDM-1 происходит конкурирующая реакция – протонирование  $C_3$ , однако в виду строения фермента возможно образование только S-изомера. Структуры ферментов в каждой стационарной точке профиля потенциальной энергии проанализированы в рамках квантово-топологической теории атомов в молекулах [4]. Показано, что возможность образования C продукта в NDM-1 объясняется только наличием альтернативного канала протонирования, в L1 этот канал перекрыт Pro226.

Для N-, C(R)- и C(S)- продуктов имипенема проведен расчет молекулярной динамики длиной 250 нс для исследования поведения имипенема в растворе. Молекула имипенема является цвиттер-ионом в



нейтральном pH [5]. Его гибкая заряженная формимидоильная группа определяет предпочтительные конформации для таутомеризации в C(R) или C(S). Исследование молекулярной динамики N-продукта имипенема в растворе показало, что 61,61% конформаций являются предпочтительными для таутомеризации в R положение, 28,07% в S и 10,32% соответствуют конформации, открытой для обоих случаев. Эти результаты подтверждают, что после реакции в активном центре N-продукт в растворе предпочтительно таутомеризуется в C(R). Для исследования процесса эпимеризации была проведена молекулярная динамика C-продуктов в водном растворе. Выявлено, что в динамике C(R) 50,04% соответствует конформациям, закрытым для эпимеризации, и 49,96 % конформациям, доступным для эпимеризации в S. В C(S) 84,24 % соответствует закрытым для эпимеризации конформациям и 15,76 % соответствует конформациям, доступным для эпимеризации в R. Следовательно, возможность эпимеризации R в S намного выше, чем возможность эпимеризации S в R.

Таким образом, можно заключить, что в активном центре обоих ферментов преимущественно образуется N-продукт и некоторое количество C(S) в случае NDM-1. Затем в растворе N-продукт имипенема таутомеризуется главным образом в C(R)-изомер. Затем C(R)-изомер эпимеризуется в C(S)-изомер. Полученные данные, подтверждают экспериментальные наблюдения [1].

**Основные выводы.** В активном центре обоих ферментов преимущественно образуется N-продукт. В случае NDM-1 возможно образование и C(S). После чего в растворе N-продукт имипенема таутомеризуется главным образом в C(R)-изомер, а затем C(R)-изомер эпимеризуется в C(S)-изомер.

### Литература

1. Lohans C.T., Freeman E.I., Groesen E., Tooke C.L. et. al. Mechanistic Insights into  $\beta$ -lactamase-catalysed carbapenem degradation product characterisation // *Scientific Reports*. – 2019. – Vol. 9. – P. 13608-13617.
2. Spencer J., Read J., Sessions R.B., Howell S., Blackburn G.M., Gamblin S.J. Antibiotic Recognition by Binuclear Metallo- $\beta$ -Lactamases Revealed by X-Ray Crystallography // *Journal of the American Chemical Society*. – 2005. – Vol. 127. – P. 14439-14444.
3. Feng H., Liu X., Wang S., Fleming J., Wang D.-C., Liu W. The Mechanism of NDM-1-Catalyzed Carbapenem Hydrolysis Is Distinct from That of Penicillin or Cephalosporin Hydrolysis // *Nature Communications*. – 2017. – Vol. 8. – P. 2242.

4. Bader R.F.W. Atoms in Molecules – A Quantum Theory, Oxford University Press, Oxford, – 1990.
5. Smith G.B., Dezeny G.C., Douglas A.W. Stability and Kinetics of Degradation of Imipenem in Aqueous Solution // Journal of Pharmaceutical Sciences. – 1990. – Vol. 79. – P. 732-740.

### **Список публикаций по теме работы**

#### *Тезисы докладов*

1. Кривицкая А.В. Процессы гидролиза и ингибирования в активном центре металло- $\beta$ -лактамазы NDM-1 // Сборник тезисов отчётной конференции аспирантов ФИЦ Биотехнологии РАН: направление подготовки 06.06.01 Биологические науки (21-25 июня 2021 г.) / под ред. В.О. Попова, А.Н. Фёдорова; сост. Е.С. Титова. – М.: ВАШ ФОРМАТ. – 2021. – С. 48-52. (тезисы и устный доклад)
2. Кривицкая А.В., Хренова М.Г. Механизмы реакции гидролиза имипенема карбапенемазами L1 и NDM-1 // XXIX Международная конференция «Математика. Компьютер. Образование». Москва, 24-28 января 2022. (устный доклад)
3. Кривицкая А.В. Механизмы реакции гидролиза имипенема металло- $\beta$ -лактамазы L1 и NDM-1 // IX Всероссийская научная молодежная школа-конференция «Химия, физика, биология: пути интеграции». Москва, 20-22 апреля 2022. (устный доклад)

**Krivitskaya Alexandra Vyacheslavovna**  
**RESEARCH CENTRE OF BIOTECHNOLOGY RAS**

### **MECHANISM OF IMPENEM HYDROLYSIS BY METALLO- $\beta$ -LACTAMASES L1 AND NDM-1**

#### **Abstract**

This work presents the results of the study of mechanism of imipenem hydrolysis reaction in active site of L1 and NDM-1 metallo- $\beta$ -lactamases by combined quantum mechanics/molecular mechanics approach. Molecular dynamics studies of the behavior of imipenem after the reaction in solution have been carried out. The results obtained correspond to the known experimental data.

**Keywords:** metallo- $\beta$ -lactamase, L1, NDM-1, carbapenems, imipenem, bacterial resistance, quantum theory of atoms in molecules, molecular dynamics, combined method of quantum mechanics / molecular mechanics

*Работа выполнена при финансовой поддержке РФФ (грант № 18-74-10056)*

**Соловьева Анастасия Юрьевна**

аспирант ФИЦ Биотехнологии РАН 2 года обучения

профиль 1.5.4. Биохимия

e-mail: [nastya.soloveva1@yandex.ru](mailto:nastya.soloveva1@yandex.ru)

Научный руководитель

**Тихонова Тамара Викторовна**

кандидат химических наук,

с.н.с. лаборатории инженерной энзимологии



## ИССЛЕДОВАНИЕ МЕХАНИЗМА АКТИВАЦИИ ТИОЦИАНАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ IN VITRO И IN VIVO

**Аннотация.** Фермент тиоцианатдегидрогеназа (TcDH) способен катализировать реакцию разложения тиоцианата до цианата и элементной серы с переносом двух электронов на акцептор. Объектом исследования в данной работе является TcDH из галоалкалофильной бактерии *Thioalkalivibrio paradoxus*. В настоящей работе был изучен процесс активации TcDH ионами меди. Проведен кинетический анализ встраивания ионов меди разной степени окисления. Определены константы взаимодействия ионов меди с TcDH методами тушения триптофановой флуоресценции и изотермической титрационной микрокалориметрии (ИТС). Изучено связывание других ионов переходных металлов, таких как Zn и Ni, в активном центре TcDH. Продолжено исследование свойств и структуры потенциальных акцепторов электронов в реакции окисления тиоцианата.

**Ключевые слова:** тиоцианатдегидрогеназа, медь-содержащий белок, факторы, влияющие на активацию ионами меди *in vitro*, акцепторы электронов, цитохром C546/556

Бактерия *Thioalkalivibrio paradoxus*, выделенная из содовых озер, способна расти на тиоцианате как источнике энергии и азота. Фермент, который окисляет тиоцианат до цианата и элементарной серы с переносом двух электронов на акцептор, – тиоцианатдегидрогеназа (TcDH) [1], содержащая в активном центре три иона меди, необходимых для протекания реакции.

В нашей работе были использованы два препарата фермента: первый был выделен из клеток бактерии *Tv. paradoxus*, выращенной с тиоцианатом как единственным источником энергии и азота (мы обозначили его как «нативный»); второй – рекомбинантный, полученный методом гетерологической экспрессии в клетках *E. coli*. В нативном препарате TcDH в ходе выделения происходит частичная потеря 2 – 2,5 ионов меди, в

результате фермент становится неактивным. В рекомбинантном TcDH ионы меди отсутствуют изначально. Ранее было показано, что инкубирование с ионами меди позволяет восстановить ферментативную активность TcDH [1]. Активация TcDH может происходить как ионами  $\text{Cu}^{2+}$ , так и  $\text{Cu}^+$ .

В настоящей работе были изучены некоторые кинетические закономерности процесса активации TcDH ионами меди с разными степенями окисления, а также определены константы связывания ионов меди в активном центре TcDH. Показано, что активация TcDH ионами  $\text{Cu}^{2+}$  – медленный процесс, при котором полная активация фермента достигается в течение нескольких дней. Скорость активации линейно зависит от концентрации TcDH и от соотношения TcDH/  $\text{Cu}^{2+}$  (в качестве стартового соотношения использовали 1:3, поскольку каталитически активный центр TcDH содержит 3 иона меди). Активация как нативного, так и рекомбинантного препаратов TcDH ионами  $\text{Cu}^+$  достигается практически мгновенно. Из этих результатов можно заключить, что встраивание ионов меди в активный центр фермента происходит в степени окисления 1+. В этом случае, активация TcDH ионами  $\text{Cu}^{2+}$  может лимитироваться скоростью образования ионов  $\text{Cu}^+$ . Медленное образование  $\text{Cu}^+$  в результате длительного инкубирования белка с ионами  $\text{Cu}^{2+}$  возможно в результате неспецифического окисления аминокислотных остатков, таких как His, Met, Cys [2].

Для определения констант взаимодействия ионов меди с активным центром TcDH были использованы методы тушения триптофановой флуоресценции и изотермической титрационной микрокалориметрии (ИТС). Данные, полученные обоими методами, хорошо согласуются и указывают на существование у нативной TcDH двух сайтов связывания ионов  $\text{Cu}^{2+}$  с константами диссоциации  $(1,90 \pm 0,50)$  мкМ и  $(0,70 \pm 0,22) \times 10^{-2}$  мкМ.

Проверена возможность замены ионов меди в активном центре TcDH на ионы  $\text{Ni}^{2+}$ , близкие по ионному радиусу и координационному числу ионам  $\text{Cu}^{2+}$ , а также на редокс неактивные ионы  $\text{Zn}^{2+}$ . Показано, что ионы обоих металлов могут связываться в активном центре, определены константы диссоциации для обоих ионов, однако полученные препараты TcDH не обладали ферментативной активностью.

Другим направлением исследования механизма TcDH является поиск и характеристика акцепторов электронов в реакции окисления тиоцианата. Ранее нами был получен и охарактеризован одноклеточный цитохром C552, экспрессия гена которого растет при культивировании бактерий *T. paradoxus* на тиоцианате параллельно с ростом уровня экспрессии гена TcDH. C552

соочищался с ТсДН и отделялся только на финальной стадии очистки – гель-фильтрации.

Другим цитохромом, который также соочищался с ТсДН и отделялся от нее на стадии гель-фильтрации был одногемовый цитохром с молекулярной массой 8.8 кДа. Цитохром с был выделен в гомогенном состоянии и охарактеризован.

Выделенный цитохром имел характерные для цитохромов с максимумы поглощения при 409 и 417 нм (линии Соре окисленной и восстановленной форм, соответственно) и необычные двухгорбые пики поглощения, соответствующие линиям бета и альфа (520/528 нм и 546/556 нм, соответственно). Наличие небольшого максимума при 695 нм характерно для гемов с, координированных остатками His и Met в проксимальном и дистальном положениях координационной сферы иона железа. Спектр цитохрома С546/556 не изменялся в интервале рН 6.5-9.5. Но в спектре, полученном в щелочном пиридиновом буфере, раздвоение пиков исчезало,  $\alpha$ -полоса восстановленной формы имела максимум при 550 нм. Это свидетельствует о том, что данный цитохром (далее С546/556) относится к с-типу, а необычные спектральные свойства связаны с влиянием окружения гема на электронные свойства.

Для проверки способности цитохрома С546/556 принимать электроны от ТсДН был определен редокс потенциал С546/556. Редокс титрование проводили в анаэробном боксе в атмосфере азота в присутствии двух медиаторов 2,6-дихлорфенолиндофенола ( $E_m +220$  мВ) и феназинметасульфата (+80 мВ) с контролем степени восстановления С546/556 по поглощению на двух длинах волн 546 и 556 нм. Редокс - потенциал С546/556 составил  $95 \pm 10$  мВ. Полученный потенциал значительно ниже, чем у цитохрома с из сердца лошади ( $E_m +260$  мВ) и цитохрома С552 ( $E_m + 160$  мВ), выделенного из *T. paradoxus*.

Однако, несмотря на низкий редокс потенциал, С546/556 может выступать акцептором электронов в реакции окисления тиоцианата. Активность ТсДН в стандартных условиях с цитохромом С546/556 в качестве акцептора электронов составила 3.3 мкмоль/мин\*мг. В тех же условиях активность с цитохромом С552 равна 7.3 мкмоль/мин\*мг, а с цитохромом с из сердца лошади – 10.9 мкмоль/мин\*мг.

Для понимания структурных особенностей, обеспечивающих необычный спектр С546/556, была получена пространственная структура цитохрома методом рентгеноструктурного анализа. Для этого были получены кристаллы С546/556.

Поиск условий кристаллизации проводили под руководством аспирантки лаборатории инженерной энзимологии Ларисы Варфоломеевой с помощью кристаллизационного робота Oryx4 (Douglas instruments, UK). Найденные условия кристаллизации фермента оптимизировали вручную методом диффузии паров в висячей капле. Дифракционные данные были собраны с.н.с. лаборатории инженерной энзимологии К.М. Бойко в ESRF (Гренобль, Франция) и Spring-8 (Япония) при 100 К. Обработка полученного набора рентгеновских данных была проведена под руководством и при участии Ларисы Варфоломеевой (м.н.с. лаборатории инженерной энзимологии). Структура цитохрома C546/556 была решена с разрешением 1,15 Å методом аномального рассеяния, используя аномальный сигнал от железа гема. Пространственная группа кристалла – ромбическая P212121. В независимой части элементарной ячейки находятся две молекулы C546/556. Каждая молекула C546/556 состоит из 83 аминокислотных остатков и содержит один ковалентно связанный гем с. Укладка C546/556 типична для одногемовых цитохромов с первого класса: пять  $\alpha$ -спиралей формируют полость, в которой связывается гем. Гем-связывающий мотив CLSCH располагается в  $\alpha$ 2-спирали. Гем в обеих молекулах C546/556 из независимой части элементарной ячейки является шестикоординированным, аксиальные положения заняты остатками His 40 и Met 81. Особенностью полученной структуры является то, что молекулы А и В C546/556 из независимой части элементарной ячейки неодинаковы и отличаются доступностью гемов к растворителю. Могут ли данные различия в строении и окружении гемов в молекулах А и В быть причиной необычных спектров цитохрома C546/556 является предметом дальнейшего исследования.

**Основные выводы.** Активация фермента TcDH ионами  $\text{Cu}^+$  достигается практически мгновенно, в то время как активация  $\text{Cu}^{2+}$  - медленный процесс, протекающий в течение нескольких дней. Для нативного препарата получены две константы диссоциации меди ( $1,90 \pm 0,50$ ) мкМ и ( $0,70 \pm 0,22$ )  $\times 10^{-2}$  мкМ. Показано, что  $\text{Ni}^{2+}$  и  $\text{Zn}^{2+}$  способны связываться в активном центре TcDH, однако полученные препараты не обладали ферментативной активностью. Был найден и охарактеризован потенциальный акцептор электронов реакции TcDH одногемовый цитохром C546/556, структура которого была получена с разрешением 1,15 Å.

### Литература

1. Tikhonova T. V. et al. Trinuclear copper biocatalytic center forms an active site of thiocyanate dehydrogenase // Proceedings of the National Academy of Sciences. – 2020. – Vol. 117 (10). – P. 5280-5290.

2. Rubino J.T. et al. A comparison of methionine, histidine and cysteine in copper(I)-binding peptides reveals differences relevant to copper uptake by organisms in diverse environments // *Metallomics*. – 2011. – Vol. 3 (1). – P. 61-73.

### **Список публикаций по теме работы**

Khrenova M.G., Soloveva A.Yu., Varfolomeeva L.A., Tikhonova T.V., Popov V.O. The O to S substitution in urea brings inhibition activity against thiocyanate dehydrogenase // *Mendeleev Communication*. – 2021. – Vol. 31. – P. 373-375.

#### *Тезисы докладов*

1. Соловьева А.Ю. Изучение механизма действия тиоцианатдегидрогеназы методами стационарной кинетики // Сборник тезисов XXXIII Зимняя международная молодежная научная школа «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии»: 8-11 февраля 2021 / под ред. д.х.н. Т.В. Овчинниковой, к.б.н. Е.А. Стукачевой, сост.: к.б.н. Стукачева Е.А. – С. 38. (стендовый доклад)

2. Соловьева А.Ю. ИССЛЕДОВАНИЕ МЕХАНИЗМА АКТИВАЦИИ ТИОЦИАНАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ IN VITRO И IN VIVO // Сборник тезисов отчётной конференции аспирантов ФИЦ Биотехнологии РАН: направление подготовки 06.06.01 Биологические науки (21-25 июня 2021 г.) / под ред. В.О. Попова, А.Н. Фёдорова; сост. Е.С. Титова. – М.: ВАШ ФОРМАТ. – 2021. – С. 53-56. (тезисы и устный доклад)

3. Соловьева А.Ю., Хренова М.Г., Тихонова Т.В., Попов В.О. Исследование механизма действия тиоцианатдегидрогеназы методом ингибиторного анализа // Сборник тезисов «III Объединенный научный форум физиологов, биохимиков и молекулярных биологов, VII съезд биохимиков России, X Российский симпозиум «белки и пептиды», VII съезд физиологов СНГ»: 3-8 октября 2021 / под ред. А.Г. Габибова и М.А. Островского. – С. 131. (стендовый доклад)

### **Soloveva Anastasiia Iurevna RESEARCH CENTRE OF BIOTECHNOLOGY RAS**

### **STUDY OF ACTIVATION MECHANISM OF THIOCYANATE DEHYDROGENASE IN VITRO AND IN VIVO**

#### **Abstract**

The thiocyanate dehydrogenase (TcDH) is able to catalyze the decomposition of thiocyanate to cyanate and elemental sulfur with the transfer of two electrons to an acceptor. The object of study in this work is TcDH from the

haloalkaliphilic bacterium *Thioalkalivibrio paradoxus*. In this work, we studied the process of TcDH activation by copper ions. A kinetic analysis of the incorporation of copper ions of different oxidation states was carried out. The interaction constants of copper ions with TcDH were determined by tryptophan fluorescence quenching and isothermal titration microcalorimetry (ITC). The binding of other transition metal ions, such as Zn and Ni, in the TcDH active center was studied. The study of the properties and structure of potential electron acceptors in the thiocyanate oxidation reaction was continued.

**Keywords:** thiocyanate dehydrogenase, copper-containing protein, factors influencing activation by copper ions in vitro, electron acceptors, cytochrome C. 546/556



**Баршевская Любовь Владимировна**

*аспирант ФИЦ Биотехнологии РАН 3 года обучения*

*профиль 1.5.4. Биохимия*

*e-mail: lyubov.barshevskaya@yandex.ru*

*Научный руководитель*

**Дзантиев Борис Борисович**

*доктор химических наук, профессор,*

*руководитель отдела лиганд-рецепторных*

*взаимодействий и биосенсорики,*

*зав. лабораторией иммунобиохимии*



## **ВЫСОКОЧУВСТВИТЕЛЬНЫЙ ФОРМАТ ИММУНОХРОМАТОГРАФИИ С ДВОЙНОЙ КОНКУРЕНЦИЕЙ: РАЗРАБОТКА И АПРОБАЦИЯ**

**Аннотация.** *Предложена новая схема реализации иммунохроматографического анализа (ИХА) с двойной конкуренцией, которая сочетает в себе черты конкурентного и сэндвич-анализа и обеспечивает высокочувствительную детекцию низкомолекулярных аналитов. Численный анализ моделей демонстрирует снижение предела обнаружения (ПрО) на порядок в схеме с двойной конкуренцией по сравнению со стандартным конкурентным ИХА. При экспериментальной реализации и апробации ИХА на примере определения хлорамфеникола в меде показано, что визуальный ПрО хлорамфеникола составил 50 нг/мл для стандартной и 5 нг/мл для предложенной схемы, а инструментальный ПрО – 300 пг/мл (1,2 мкг/кг в пересчете на навеску меда) и 20 пг/мл (80 нг/кг в пересчете на навеску меда), соответственно. Полученные данные свидетельствуют о перспективности ИХА с двойной конкуренцией для высокочувствительного выявления различных соединений.*

**Ключевые слова:** *конкурентный иммуноанализ, иммунохроматография, хлорамфеникол, наночастицы золота, математическое моделирование*

Иммунохроматографический анализ (ИХА) – перспективный метод детектирования различных аналитов, что обусловлено его экспрессностью и простотой проведения. Однако существенным недостатком иммунохроматографических тест-систем является высокий предел обнаружения (ПрО), который может оказаться критическим параметром для адекватных выводов о наличии или отсутствии целевого аналита в пробах. Существующие подходы к снижению ПрО зачастую связаны с

использованием дополнительных реагентов и стадий анализа, что усложняет процедуру его проведения. В данной работе разработан и охарактеризован простой способ снижения ПрО ИХА, апробированный для контроля антибиотика хлорамфеникола в меде.

Сопоставлены два формата иммунохроматографии:

- стандартный конкурентный ИХА с мечеными антителами, принцип которой состоит в конкуренции между антигеном в составе конъюгата гаптен-белок, иммобилизованного в аналитической зоне рабочей мембраны, и свободным антигеном в пробе за центры связывания специфических антител, иммобилизованных на поверхности наночастиц-маркеров;
- схема с двойной конкуренцией, в которой антитела против определяемого соединения иммобилизуются и на поверхности маркерных частиц, и в аналитической зоне рабочей мембраны.

На начальный участок тест-полоски нанесен конъюгат белка-носителя с несколькими молекулами аналита. При добавлении жидкой пробы она смешивается с этим конъюгатом, который за счет поливалентного взаимодействия образует в аналитической зоне окрашенный комплекс состава: иммобилизованное антитело – конъюгат белка-носителя с аналитом – меченое антитело. При появлении в пробе определяемого соединения его молекулы блокируют активные центры антител как на маркерных частицах, так и в тестовой зоне. Эта особенность позволяет ожидать более эффективное подавление образования окрашенного комплекса в аналитической зоне, чем для стандартного конкурентного ИХА, что и было проверено в ходе исследования.

Проведен численный анализ моделей процессов образования иммунных комплексов с использованием программного обеспечения COPASI. Полученные расчетные данные свидетельствуют о том, что система с двойной конкуренцией обеспечивает меньший предел обнаружения низкомолекулярных аналитов.

При экспериментальной реализации предложенной схемы ИХА исследовали зависимость интенсивности окраски аналитической зоны от концентрации конъюгата гаптен-белок (200, 400 и 800 нг/мл), который смешивается с пробой. Установлено, что для конъюгата меченых антител, полученного добавлением антител в концентрации 10 мкг/мл к наночастицам золота при синтезе, максимальная окраска в отсутствии аналита достигается при концентрации гаптен-белка 400 нг/мл и составляет 14,3 отн. ед. В традиционной схеме наблюдается близкая интенсивность окраски, равная 15,5 отн. ед. и достигаемая при использовании конъюгата антител с наночастицами, полученного при добавлении антител в концентрации 5

мкг/мл к наночастицам золота при синтезе. В выбранных условиях проведена сравнительная характеристика двух схем ИХА для определения хлорамфеникола в растворах, содержащих аналит в концентрациях от 0,005 до 500 нг/мл. Согласно полученным данным, визуальный предел обнаружения, соответствующий исчезновению окрашивания в аналитической зоне, для стандартной конкурентной схемы составил 50 нг/мл. При проведении анализа по предложенной схеме предел обнаружения хлорамфеникола составил 5 нг/мл. При инструментальной регистрации результатов анализа достоверное снижение интенсивности окраски наблюдалось в двух схемах при концентрациях 400 и 20 нг/мл, соответственно.

Апробацию разработанной схемы ИХА с двойной конкуренцией проводили в искусственно контаминированных пробах меда, разбавленных фосфатным буфером с детергентом в соотношении 1:4. Визуальный предел обнаружения, соответствующий исчезновению окрашивания в аналитической зоне, для стандартной схемы составил 50 нг/мл, для предложенной схемы – 5 нг/мл. При инструментальной регистрации результатов анализа предел обнаружения хлорамфеникола в меде составил 300 нг/мл или 1,2 мкг/кг в пересчете на навеску меда для стандартной схемы и 20 нг/мл или 80 нг/кг в пересчете на навеску меда для предложенной схемы. Согласно полученным результатам, новая схема ИХА с двойной конкуренцией обеспечивает высокочувствительную детекцию малых молекул без использования дополнительных стадий усиления.

**Основные выводы:** предложена новая схема конкурентного иммунохроматографического анализа, которая обеспечивает высокочувствительную детекцию малых молекул без использования дополнительных стадий усиления. Моделирование иммунохроматографии в традиционном формате и в формате с двойной конкуренции в программе COPASI позволяет сделать заключение о более высокой чувствительности детекции аналитов при использовании предложенного подхода.

### **Список публикаций по теме работы**

#### *Статьи*

1. Barshevskaya L.V., Sotnikov D.V., Zherdev A.V., Khassenov B.B., Baltin K.K., Eskendirova S.Z., Mukanov K.K., Mukantayev K.K., Dzantiev B.B. Triple immunochromatographic system for simultaneous serodiagnosis of bovine brucellosis, tuberculosis, and leukemia // Biosensors. – 2019. – Vol. 9 (4). – Ar. 115.

2. Sotnikov D.V., Barshevskaya L.V., Zherdev A.V., Eskendirova S.Z., Mukanov K.K., Mukantayev K.K., Ramankulov Y.M., Dzantiev B.B. Immunochromatographic system for serodiagnostics of cattle brucellosis using gold nanoparticles and signal amplification with quantum dots // Applied Sciences. – 2020. – Vol. 10 (3). – Ar. 738.
3. Сотников Д.В., Баршевская Л.В., Жердев А.В., Дзантиев Б.Б. Конъюгаты антителосвязывающий белок – наночастица золота: Определение состава и применение в иммунохроматографическом анализе сульфониламида // Прикладная биохимия и микробиология. – 2022. – Т. 58 (1). – С. 83-88.
4. Sotnikov D.V., Barshevskaya L.V., Bartosh A.V., Zherdev A.V., Dzantiev B.B. Double competitive immunodetection of small analyte: Realization for highly sensitive lateral flow immunoassay of chloramphenicol // Biosensors. – 2022. – Vol. 12 (5). – Ar. 343.

*Тезисы докладов*

1. Баршевская Л.В. Получение комплексов иммунореагентов с нанодисперсными носителями, их характеристика и сравнительная оценка как компонентов серодиагностических тест-систем // Сборник тезисов отчётной конференции аспирантов ФИЦ Биотехнологии РАН: направление подготовки 06.06.01 Биологические науки (22-30 июня 2020 г.) / под ред. В.О. Попова, А.Н. Федорова; сост. Е.С. Титова. – Москва: МАКС Пресс, 2020. – С. 39-42. (тезисы и устный доклад)
2. Баршевская Л.В. Разработка новых подходов для повышения чувствительности иммунохроматографических тест-систем. // Сборник тезисов отчётной конференции аспирантов ФИЦ Биотехнологии РАН: направление подготовки 06.06.01 Биологические науки (21–25 июня 2021 г.) / под ред. В.О. Попова, А.Н. Фёдорова; сост. Е.С. Титова. – М.: ВАШ ФОРМАТ. – 2021. – С. 57-61. (тезисы и устный доклад)
3. Баршевская Л.В., Сотников Д.В., Бызова Н.А., Жердев А.В., Дзантиев Б.Б. Комплексы белка G с наночастицами золота: определение состава и иммуноаналитическое применение // Научные труды III Объединенного научного форума физиологов, биохимиков и молекулярных биологов. VII Съезд биохимиков России, X Российский симпозиум «Белки и пептиды», VII Съезд физиологов СНГ: 3-8 октября 2021 г. – Москва: Перо, 2021. – Т. 2 – С. 186. (тезисы)
4. Баршевская Л.В., Сотников Д.В., Жердев А.В., Дзантиев Б.Б. Способы снижения предела обнаружения иммунохроматографических тест-систем для контроля антибиотиков в меде // Материалы международного конгресса

«Биотехнология: Состояние и перспективы развития»: 26–29 октября 2021 г.: ООО «Экспо-Биохим-Технологии», 2021. – Выпуск 19. – С. 219-220.

5. Sotnikov D.V., Barshevskaya L.V., Zherdev A.V., Dzantiev B.B. Enhanced techniques for sensitive immunochromatographic detection of antibiotics and their application for control of honey. // Book of Abstracts of the 12th International Conference on Instrumental Methods of Analysis: Modern Trends and Applications (IMA-2021): September 20–23. – 2021.– P. 180. (постерный доклад)

#### **Основные достижения, патенты**

Сотников Д.В., Баршевская Л.В., Жердев А.В., Дзантиев Б.Б. Способ повышения чувствительности иммунохроматографического серодиагностического анализа с использованием двух маркеров. // Патент РФ на изобретение № 2 739 752 от 28 декабря 2020 г.

### **Barshevskaya Lyubov Vladimirovna RESEARCH CENTER OF BIOTECHNOLOGY RAS**

#### **HIGHLY SENSITIVE FORMAT OF DOUBLE COMPETITIVE IMMUNOCHROMATOGRAPHY: DEVELOPMENT AND APPROBATION**

##### **Abstract**

A new scheme for the implementation of immunochromatographic analysis (ICA) with double competition is proposed, which combines the features of competitive and sandwich analysis and provides highly sensitive detection of low molecular weight analytes. Numerical analysis of the models demonstrates an order of magnitude decrease in the limit of detection (LOD) in the double competition scheme compared to the standard competitive ICA. During the experimental implementation and testing of ICA using the example of the determination of chloramphenicol in honey, it was shown that the visual LOD of chloramphenicol was 50 ng/ml for the standard and 5 ng/ml for the proposed scheme, and the instrumental LOD = 300 pg/ml (1.2 µg/kg in conversion per sample weight of honey) and 20 pg/ml (80 ng/kg in conversion per sample weight of honey), respectively. The data obtained indicate the promise of ICA with double competition for the highly sensitive detection of various compounds.

**Keywords:** immunochromatography, competitive immunoassay, chloramphenicol, gold nanoparticles, mathematical modeling

*Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда  
(грант № 20-76-10033)*

**Кулакова Мария Викторовна**

аспирант ФИЦ Биотехнологии РАН 3 года обучения

профиль 1.5.4. Биохимия

e-mail: kulakova\_masha95@mail.ru

Научный руководитель

**Агафонов Михаил Олегович**

доктор биологических наук,

руководитель группы генной инженерии низших эукариот



## **ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ ПРОЯВЛЕНИЯ ПРОДУКЦИИ ГЕНЕТИЧЕСКИ КОДИРУЕМОГО ИНДИКАТОРА КАЛЬЦИЯ GEM- GECO В КЛЕТКАХ ДРОЖЖЕЙ *OGATAEA PARAPOLYMORPHA***

**Аннотация.** Генетически кодируемый индикатор кальция GEM-GECO представляет собой циркулярно-пермутированный флуоресцентный белок, на С-конце которого находится кальмодулиновый домен, а на N – кальмодулин-связывающий пептид. Мы обнаружили, что при низком уровне продукции GEM-GECO в клетках дрожжей *Ogataea parapolymorpha* с нарушенным геном *PMC1*, кодирующим вакуолярную  $Ca^{2+}$ -АТФазу, проявления этой мутации становятся более выраженными, а при высоком уровне продукции останавливается рост клеток. У клеток с аллелью гена *PMC1* дикого типа высокий уровень продукции GEM-GECO приводил к увеличению чувствительности к додецилсульфату натрия (SDS), что было сходно с проявлением нарушения дефекта гена *PMC1*. Показано, что GEM-GECO не компенсирует отсутствие эндогенного кальмодулина в клетках исследуемых дрожжей.

**Ключевые слова:** GEM-GECO, *Ogataea parapolymorpha*, вакуолярная  $Ca^{2+}$ -АТФаза, кальмодулин, гомеостаз кальция

Катионы кальция являются вторичным мессенджером, который участвует в ответе на внешние стимулы в различных типах живых клеток [1]. Визуализация изменения концентрации  $Ca^{2+}$  в клетках существенно облегчает изучение конкретных механизмов сигналинга. Одним из инструментов для отслеживания изменений внутриклеточной концентрации  $Ca^{2+}$  являются генетически кодируемые индикаторы (GECI). Среди них широко используется семейство индикаторов GCaMP, созданных на основе производных флуоресцентных белков, слитых с кальмодулином (CaM) и  $Ca^{2+}$ /CaM-связывающим пептидом M13. Как правило, при связывании с кальцием у представителей этого семейства индикаторов увеличивается

интенсивность флуоресценции. Однако существуют и радиометрические индикаторы, изменяющие длину волны возбуждения и/или эмиссии при связывании с кальцием, что позволяет оценивать его внутриклеточную концентрацию независимо от уровня продукции GEC1. Белок GEM-GECO является одним из таких индикаторов. Максимум возбуждения его флуоресценции почти не зависит от связывания кальция и находится в области 390-400 нм. Максимум эмиссии свободной от кальция формы находится на 513 нм, а кальций-связанной формы – около 450 нм [3]. Ранее нами было показано, что GEM-GECO позволяет отслеживать изменение концентрации  $Ca^{2+}$  в цитозоле клеток дрожжей *O. parapolymorpha* при различных внешних условиях [4]. Однако не было известно, оказывает ли влияние на физиологию клеток дрожжей продукция GEM-GECO, и можно ли его использовать для изучения мутантов с нарушением вакуолярной  $Ca^{2+}$ -АТФазы *Pmc1*, участвующей в поддержании концентрации  $Ca^{2+}$  в цитозоле на низком уровне.

Клетки дрожжей *O. parapolymorpha* штамма DL1-L (*leu2*) были трансформированы интегративной плазмидой с геном, кодирующим белок GEM-GECO. Этот ген находится под регуляцией сильного промотора *MAL1*, который индуцируется при выращивании клеток на сахарозе. На основе трансформантов, продуцирующих GEM-GECO, были получены мутанты, с нарушением гена *PMC1*. Полученные штаммы, которые отличались друг от друга наличием интактного гена *PMC1* и экспрессионной кассеты GEM-GECO, инкубировали на среде с глюкозой или сахарозой. Показано, что наличие экспрессионной кассеты GEM-GECO не влияет на рост клеток на среде с глюкозой. Клетки *pmc1-Δ*, продуцирующие белок GEM-GECO на сахарозе, заметно медленнее растут, чем клетки без него (Рис. 1). Это говорит о том, что продукция GEM-GECO усугубляет негативные эффекты нарушения гена *PMC1*.

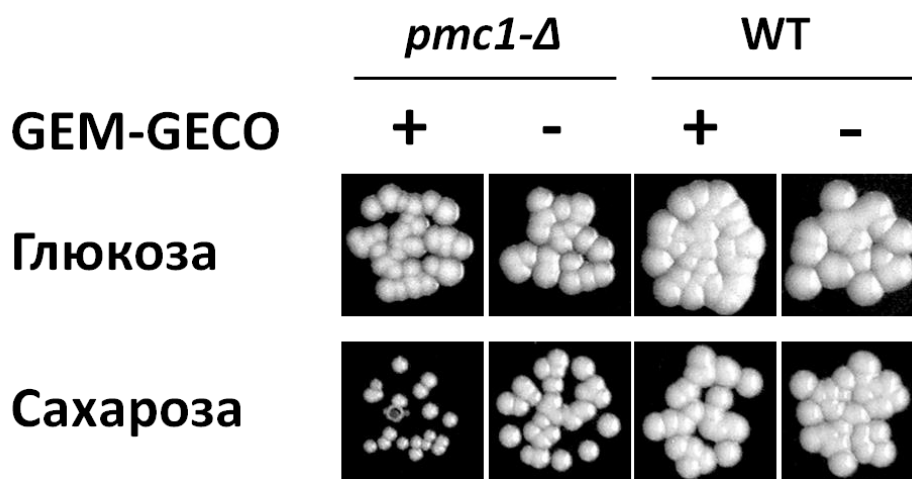


Рис.1. Фенотипы наличия и отсутствия продукции GEM-GECO у клеток *O. parapolymorpha* дикого типа и *pmc1-Δ*

Дрожжи штамма DL1-L с нарушенным геном *PMC1* чувствительны к повышенной концентрации  $\text{Ca}^{2+}$  и присутствию SDS в среде по сравнению с клетками дикого типа [2]. Ранее с помощью индикатора GEM-GECO нами было показано, что SDS способствует повышению уровня цитозольного кальция, при этом  $\text{Ca}^{2+}$  поступает в клетки из внешней среды [4]. Чтобы определить влияет ли присутствие экспрессионной кассеты GEM-GECO в клетках *pmc1-Δ* на их чувствительность к  $\text{Ca}^{2+}$  и SDS, суспензии клеток наносили на среду, содержащую глюкозу, с добавлением  $\text{CaCl}_2$  и SDS в разных концентрациях. В отличие от клеток с геном *PMC1* дикого типа, клетки *pmc1-Δ* с экспрессионной кассетой GEM-GECO были не способны расти на среде, содержащей 10 мМ  $\text{CaCl}_2$ , и на среде с 0,0015% SDS. То есть, наличие экспрессионной кассеты GEM-GECO даже в условиях репрессии ее промотора увеличивает чувствительность клеток *pmc1-Δ* к  $\text{Ca}^{2+}$  и SDS. Аналогичный эксперимент был проведен с клетками дикого типа на среде, содержащей глюкозу или сахарозу, с добавлением SDS. Экспрессия GEM-GECO снижала устойчивость клеток дикого типа к SDS. Разница в росте между клетками, имеющими экспрессионную кассету GEM-GECO, и без нее проявлялась на среде с 0,008% SDS в условиях индукции промотора. Этот фенотип напоминал проявление инактивации гена *PMC1*, которое, скорее всего, связано с повышением уровня цитозольного кальция.

Полученные результаты говорят о том, что GEM-GECO каким-то образом участвует в  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимой регуляции. Это очевидно связано с наличием кальмодулинового домена у GEM-GECO, который частично функционален в клетках дрожжей. Мы предположили, что продукция GEM-GECO сможет компенсировать отсутствие эндогенного кальмодулина у дрожжей *O. parapolymorpha*. Чтобы проверить это предположение, клетки с экспрессионной кассетой GEM-GECO трансформировали плазмидой, нарушающей ген *CMD1*, который кодирует эндогенный CaM. ПЦР-анализ выявил нарушение аллели *CMD1* у некоторых трансформантов, однако во всех подобных случаях был обнаружен и локус дикого типа. Это могло произойти из-за дубликации локуса или анеуплоидии. Отсутствие трансформантов, лишенных гена *CMD1* дикого типа, указывает на его незаменимость для дрожжей *O. parapolymorpha*. Однако это не удалось проверить на диплоидном штамме, так как штамм DL1-L является аспорогенным. Для решения этой проблемы был выбран диплоидный штамм *O. polymorpha*, который является близким родственником дрожжей *O. parapolymorpha*. Диплоидный штамм был получен путем скрещивания штамма с экспрессионной кассетой GEM-GECO со штаммом без нее. Диплоид был трансформирован плазмидой для нарушения гена *CMD1*,



селективным маркером в которой являлся ген *LEU2*. На основании анализа методом ПЦР были отобраны клоны с нарушением гена *CMD1*. Полученные клоны инкубировали на среде для спорообразования, гаплоидные клетки отбирали с помощью обогащения диэтиловым эфиром. Колонии сегрегантов были получены на средах с глюкозой и сахарозой. Ни один из сегрегантов не содержал маркер *LEU2*, использованный для инактивации *CMD1*, хотя примерно половина из них несла экспрессионную кассету GEM-GECO. Это доказывало, что GEM-GECO не может компенсировать отсутствие гена кальмодулина в геноме.

**Основные выводы.** Продукция GEM-GECO не оказывает заметного влияния на рост клеток дрожжей *O. parapolymorpha* дикого типа, однако в условиях присутствия SDS в среде повышает их чувствительность к этому детергенту. В клетках с нарушенным геном *PMC1* продукция GEM-GECO усугубляла негативные эффекты этой мутации. Выявлено, что GEM-GECO не может компенсировать отсутствие эндогенного кальмодулина в клетках исследуемых дрожжей.

### Литература

1. Cui J., Kaandorp Sloot P., Lloyd, Filatov M. Calcium homeostasis and signaling in yeast cells and cardiac myocytes // FEMS Yeast Research. – 2009. – Vol. 9 (8). – P. 1137-1147.
2. Fokina A., Socolov S., Hyun Ah Kang, Ter-Avanesyan M., Agaphonov M. Inactivation of *Pmc1* vacuolar Ca<sup>2+</sup> ATPase causes G2 cell cycle delay in *Hansenula polymorpha* // Cell Cycle. – 2012. – Vol. 11 (4). – P. 778- 784
3. Koldenkova V., Nagai T. Genetically encoded Ca<sup>2+</sup> indicators: Properties and evaluation // Biochimica et Biophysica Acta. – 2013. – Vol. 1833 (7). – P. 1787-1797.
4. Кулакова М.В. Визуализация изменений внутриклеточной концентрации ионов кальция в клетках дрожжей *Ogataea parapolymorpha* с помощью генетически кодируемого индикатора GEM-GECO // Сборник тезисов отчётной конференции аспирантов ФИЦ Биотехнологии РАН: направление подготовки 06.06.01 Биологические науки (21-25 июня 2021 г.) / под ред. В.О. Попова, А.Н. Фёдорова; сост. Е.С. Титова. – М.: ВАШ ФОРМАТ. – 2021. – С. 62-65.

### Список публикаций по теме работы

Кулакова М.В. Визуализация изменений внутриклеточной концентрации ионов кальция в клетках дрожжей *Ogataea parapolymorpha* с помощью генетически кодируемого индикатора GEM-GECO // Сборник тезисов

отчётной конференции аспирантов ФИЦ Биотехнологии РАН: направление подготовки 06.06.01 Биологические науки (21-25 июня 2021 г.) / под ред. В.О. Попова, А.Н. Фёдорова; сост. Е.С. Титова. – М.: ВАШ ФОРМАТ. – 2021. – С. 62-65. (тезисы и устный доклад)

### **Основные достижения**

Диплом за лучший доклад на ежегодной отчетной конференции аспирантов ФИЦ Биотехнологии РАН, 2021 г.

**Kulakova Mariya Viktorovna**  
**RESEARCH CENTER OF BIOTECHNOLOGY RAS**

### **PHYSIOLOGICAL MANIFESTATIONS OF THE PRODUCTION OF THE GENETICALLY ENCODED CALCIUM INDICATOR GEM-GECO IN *OGATAEA PARAPOLYMORPHA* YEAST CELLS**

#### **Abstract**

The genetically encoded calcium indicator GEM-GECO is a circularly permuted fluorescent protein with a calmodulin domain at the C-terminus and a calmodulin-binding peptide at the N-terminus. We found that at low levels of GEM-GECO production in *Ogataea parapolymorpha* yeast cells with a disrupted *PMCI* gene encoding vacuolar Ca<sup>2+</sup>-ATPase, the manifestations of this mutation become more pronounced, while at high levels of production cell growth stops. In cells with the wild-type allele of the *PMCI* gene, high levels of GEM-GECO production resulted in increased sensitivity to sodium dodecyl sulfate, which was similar to the manifestation of a defect in the *PMCI* gene. It was shown that GEM-GECO does not compensate for the absence of endogenous calmodulin in the studied yeast cells.

**Keywords:** GEM-GECO, *Ogataea parapolymorpha*, vacuolar Ca<sup>2+</sup>-ATPase, calmodulin, calcium homeostasis

**Марынич Надежда Константиновна**

*аспирант ФИЦ Биотехнологии РАН 3 года обучения*

*профиль 1.5.4. Биохимия*

*e-mail: marynich.nadya@gmail.com*

Научный руководитель

**Савицкий Александр Павлович**

*доктор химических наук, профессор,*

*зав. лабораторией физической биохимии*



## **СОЗДАНИЕ ПЕРВОГО БИФОТОХРОМНОГО БЕЛКА MOXSAASOTI, СТАБИЛИЗИРОВАННОГО К ОКИСЛИТЕЛЬНЫМ УСЛОВИЯМ КЛЕТКИ**

**Аннотация.** *Бифотохромные белки являются уникальными представителями GFP-подобных флуоресцентных белков. Они обладают одновременно свойствами обратимого фотопереключения (переход между флуоресцирующим и нефлуоресцирующим состояниями) и необратимой фотоконверсией (переход из зеленого в красное флуоресцирующее). Высокая фотохимическая активность остатков цистеина является одной из причин создания «мокс»-мономерных и устойчивых к окислению форм белка. На основании сайт-насыщенного одновременного двухточечного мутагенеза C105 и C117 получена форма тохSAASoti с заменами всех пяти остатков цистеина C21N/C71G/C105G/C117T/C175A. Для нового варианта характерны более высокая скорость фотопереключения, более полная релаксация во флуоресцентное состояние, а также более высокая скорость фотоконверсии по сравнению с mSAASoti.*

**Ключевые слова:** *бифотохромные флуоресцентные белки, обратимое фотопереключение, необратимая фотоконверсия, флуоресценция, аминокислотные остатки цистеина*

С момента расшифровки гена GFP флуоресцентные белки стали надежными и эффективными генетически кодируемыми биологическими маркерами. Широкое применение в методах супер-разрешающей микроскопии нашли бифотохромные белки, обладающие одновременно обратимым фотопереключением и необратимой фотоконверсией, полученные при помощи методов генной инженерии [1-3] и обнаруженные в природе [4]. В последние годы активно ведутся работы по повышению устойчивости флуоресцентных белков в окислительных условиях клетки [5],

способных нарушить стабильный фолдинг, созревание хромофора или привести к быстрому фотообесцвечиванию.

Для преодоления этих проблем были разработаны формы флуоресцентных белков moxFP («mox»-мономерные и устойчивые к окислению) [6; 7].

Ранее в лаборатории была получена форма mSAASoti с заменами трех аминокислотных остатков цистеина C21N/C175A/C71G (mSAASoti-3C). Она обладала более высокими скоростями фотопереключения и фотоконверсии, однако имела низкую фотостабильность.

Следующим этапом была разработана «mox» форма SAASoti с заменами всех пяти аминокислотных остатков цистеина. Путем одновременного сайт-насыщенного мутагенеза по положениям 105 и 117 были получены яркие варианты SAASoti, содержащие глицин в положении 105 и треонин или валин в положении 117. Новые варианты mSAASoti были экспрессированы в клетках *E. coli* и очищены по стандартной схеме. Поскольку C117 обращен наружу  $\beta$ -бочонка, его замена может привести к усилению агрегации новой формы белка. Олигомерное состояние новых мутантных форм было проанализировано методом гель-фильтрации. Объем элюирования (Табл. 1) для обоих вариантов соответствовал молекулярной массе 25,7 кДа, что соответствует мономерной форме SAASoti. Это может свидетельствовать о том, что внешний остаток 117 не определяет олигомеризацию moxSAASoti.

Таблица 1

Объем элюирования и рассчитанная молекулярная масса эксклюзионной хроматографии на колонке Superdex200 (буфер для элюции 20 мМ Tris-HCl, 150 мМ NaCl, pH 7,4)

Белок	Объем элюирования	Молекулярный вес
moxSAASoti-T	16,8	25,7
moxSAASoti-V	16,8	25,7

Были изучены свойства фотопереключения и фотоконверсии новых вариантов. Кинетика обратимого фотопереключения зеленой формы описывается биэкспоненциальной зависимостью (уравнение 1).

$$I = I_1 * \exp(-k_1 t) + I_2 * \exp(-k_2 t) + c \quad (1)$$

Значения скорости фотопереключения для новых вариантов сходны между собой и выше, чем для mSAASoti-3C и mSAASoti, также они обладают меньшей фотодеструкцией, чем mSAASoti-3C (Рис. 2).

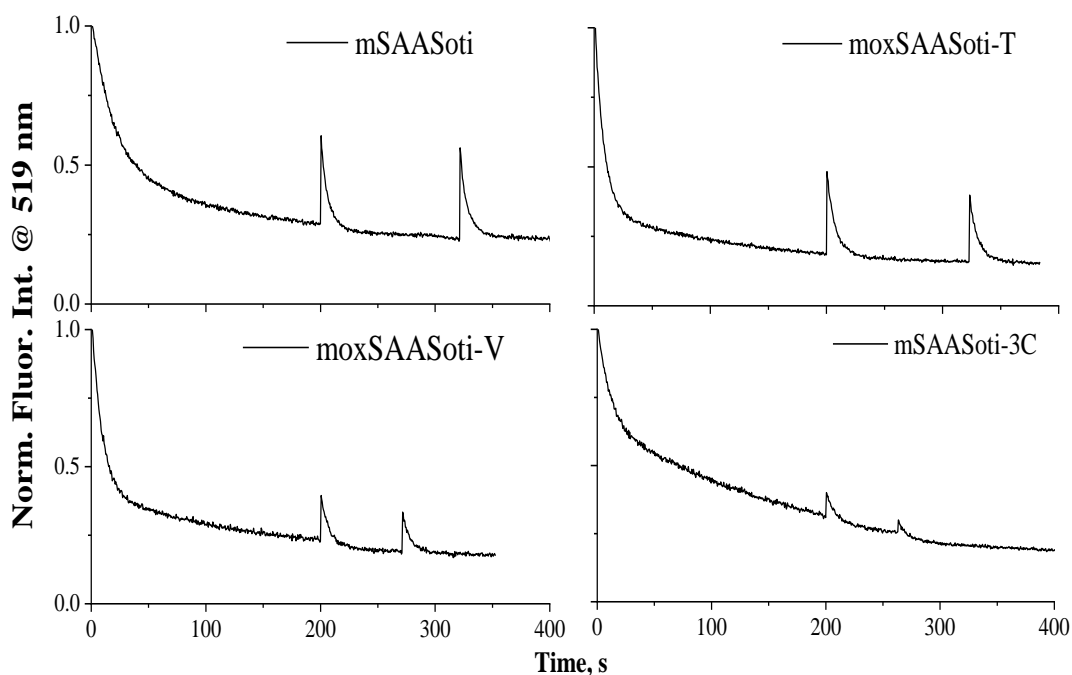


Рис. 1. Нормированные профили фотопереключения вариантов mSAASoti (Тушение инициировалось светом 470 нм, релаксация во включенное состояние светом 400 нм в течение 5 с; белки в буфере 20 мМ NaHCO<sub>3</sub>, pH 9,2)

Вариант moxSAASoti-V (последние буквы обозначают различающиеся аминокислотные остатки в 117 положении) показал более низкую степень релаксации после фотопереключения, чем moxSAASoti-T (20% и 30% исходной интенсивности флуоресценции восстановилось после первого цикла фотопереключения, соответственно) (Табл. 2). Восстановление флуоресценции после второго цикла фототушения более полное, что, вероятно, свидетельствует об одновременной реакции фотодеструкции в первом цикле. Вариант moxSAASoti-T показывает самое высокое отношение предэкспоненциальных интенсивностей, что указывает на то, что компонента с быстрым переключением ( $k_1$ ) вносит максимальный вклад в общую кинетику.

Таблица 2

Кинетические параметры фотопереключения вариантов SAASoti рассчитанные согласно Уравнению 1

Белок	Параметры обратимого фотопереключения <sup>a</sup>			Параметры необратимой фотоконверсии <sup>b</sup>	
	$k_1 \cdot 10^3, c^{-1}$	$k_2 \cdot 10^3, c^{-1}$	$I_1/I_2$	$k_1 \cdot 10^3, c^{-1}$	$k_2 \cdot 10^3, c^{-1}$
mSAASoti	55.5±1.0	8.3±0.7	1.9	62 ±1	55±1
mSAASoti-3C	95.2±2.0	5.0±0.2	0.7	273±16	106±4
moxSAASoti-T	131.6±0.9	7.5±0.3	3.7	278±16	79±2
moxSAASoti-V	113.6±1.3	7.3±0.4	2.9	270±14	107±4

<sup>a</sup> кинетика фотопереключения описывается уравнением (1)

<sup>b</sup> кинетика фотоконверсии описывается уравнением (2)

Также была проанализирована кинетика термической релаксации для moxSAASoti-T путем измерения интенсивности флуоресценции при 520 нм. Значение кинетической константы релаксации составляет  $0,021 \pm 0,001 \text{ мин}^{-1}$ , что до 8 раз больше, чем для других вариантов с заменами цистеинов и того же порядка, что и для mSAASoti, как было описано ранее. Затем была проанализирована способность новых вариантов к фотоконверсии. Варианты mox, как и предыдущий вариант mSAASoti-3C, показали высокую скорость, но низкую степень фотоконверсии (Рис. 2). Предположительно, возможно несколько объяснений этого явления: 1) низкая яркость красной формы; 2) низкая стабильность красная форма. Это, безусловно, могло быть сочетание обоих факторов, что является предметом дальнейших исследований. Процесс фотоконверсии регистрировали по изменению флуоресценции красной формы при длине волны 590 нм. Он описывается биэкспоненциальной моделью, представленной в уравнении 2:

$$I = -I_1 * \exp(-k_1 t) + I_2 * \exp(-k_2 t) + c \quad (2)$$

где первая экспонента отвечает за образование красной формы, а вторая экспонента описывает ее фотодеструкцию,  $c$  – фоновый и остаточный сигнал.

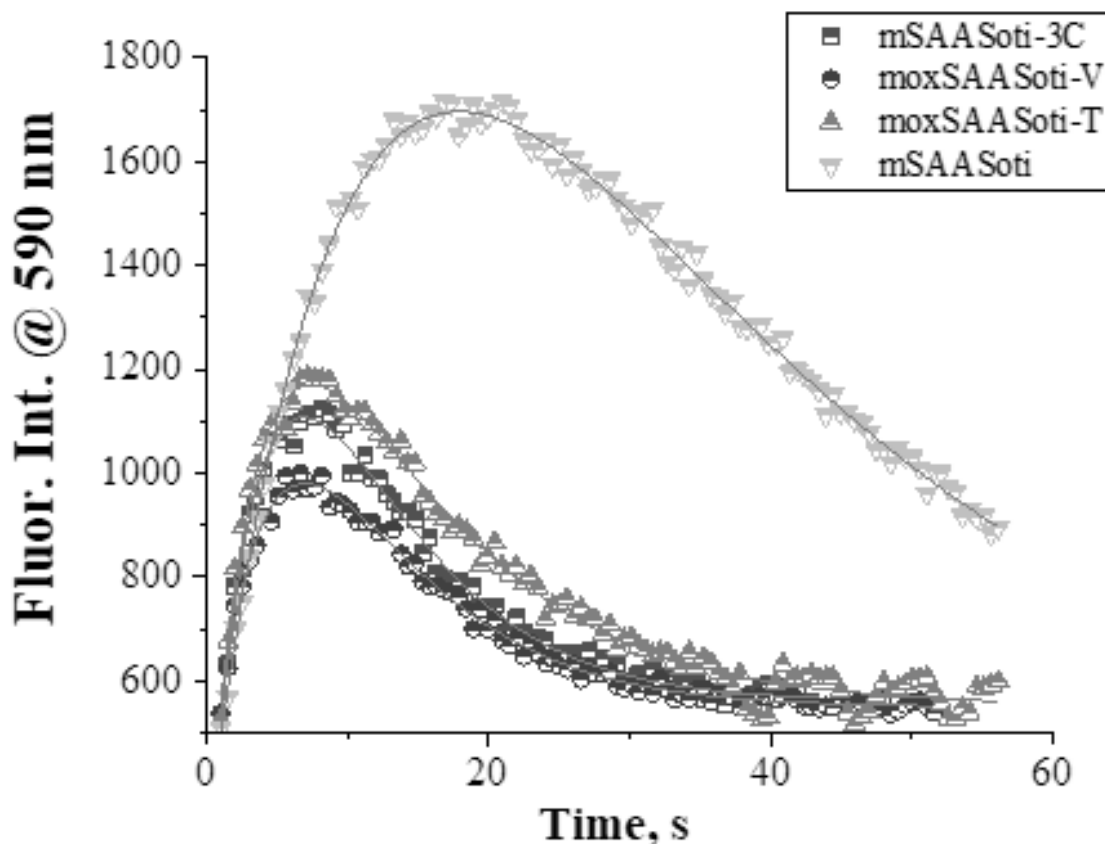


Рис. 2. Фотоконверсия вариантов mSAASoti. Образцы облучали светом 400 нм в комбинации со светом 550 нм. Образцы белка в буфере 200 mM Tris-HCl, pH 7,4

Соответствующие кинетические параметры (Табл. 2) для вариантов мох близки к исходным mSAASoti-3C. Основываясь на фотохимических и фотофизических свойствах новых форм мохSAASoti, наиболее перспективным для дальнейших исследований является мохSAASoti-T, так как он имеет высокую скорость фотопереключения, более низкую степень фотодеструкции (по сравнению с мохSAASoti-V) и более высокую скорость фотоконверсии выше, чем у исходного mSAASoti. В таблице 3 представлены физико-химические свойства мохSAASoti-T в сравнении с исходными mSAASoti и mSAASoti-3C. Интересно, что добавление C105G/C117T к C21N/C71G/C175A оказало наибольшее влияние на величину рKa красной формы мохSAASoti.

Таблица 3

Физико-химические свойства и флуоресцентные параметры различных вариантов mSAASoti

	$\lambda_{ex} / \lambda_{em}$	pK <sub>a</sub>	$\epsilon, M^{-1} \cdot cm^{-1}$	$\phi$	яркость (Ф* $\epsilon$ )
mSAASoti	509/519	6,3±0,1	75,0	0,59±0,02	44,3
	573/579	6,6±0,1	24,0		
mSAASoti-3C	509/519	6,4±0,1	83,8	0,60±0,02	50,3
	577/589	7,2±0,2	14,8		
мохSAASoti-T	509/519	6,1±0,1	71,8	0,50±0,02	35,9
	577/589	6,3±0,1	11,3		

**Основные выводы.** Путем одновременного случайного мутагенеза в положениях 105 и 117 получены два варианта с яркой флуоресценцией при 520 нм: мохSAASoti-T и мохSAASoti-V(содержащие замены всех цистеинов, V127T и отличающиеся только заменами в положении 117: C117T и C117V, соответственно). Варианты мох характеризуются более высокой скоростью фотопереключения по сравнению с mSAASoti и снижением скорости фотовыцветания по сравнению с вариантом mSAASoti-3C. Скорости фотоконверсии близки к варианту mSAASoti и выше, чем у mSAASoti-3C, однако эффективность фотоконверсии хуже, что, предположительно, связано со снижением стабильности красной формы. Поскольку кинетические параметры мохSAASoti-V несколько хуже, чем у мохSAASoti-T, в качестве базового мохSAASoti был выбран вариант мохSAASoti-T.

### Литература

1. Adam V. et al. Structural characterization of IrisFP, an optical highlighter undergoing multiple photo-induced transformations // Proceedings of the National Academy of Sciences. – 2008. – Vol. 105 (47). – P. 18343-18348.

2. Adam V. et al. Rational design of photoconvertible and biphotochromic fluorescent proteins for advanced microscopy applications // *Chemistry and Biology*. – 2011. – Vol. 18 (10). – P. 1241-1251.
3. Moeyaert B. et al. Green-to-red photoconvertible dronpa mutant for multimodal super-resolution fluorescence microscopy // *ACS Nano*. – 2014. – Vol. 8 (2). – P. 1664-1673.
4. Lapshin G. et al. Fluorescence color diversity of great barrier reef corals // *Journal of Innovative Optical Health Sciences*. – 2015. – Vol. 08 (04). – P. 550028.
5. Costantini L.M. et al. A palette of fluorescent proteins optimized for diverse cellular environments. // *Nature Communications*. – 2015. – Vol. 6. – P. 7670.
6. Kaberniuk A.A. et al. moxMaple3: a Photoswitchable Fluorescent Protein for PALM and Protein Highlighting in Oxidizing Cellular Environments // *Scientific Reports*. – 2018. – Vol. 8 (1). – P. 1-10.
7. Kaberniuk A.A. et al. moxDendra2: an inert photoswitchable protein for oxidizing environments // *Chemical Communications*. – 2017. – Vol. 53 (13). – P. 2106-2109.

#### **Список публикаций по теме работы**

Marynich N.K., Khrenova M.G., Gavshina A.V., Solovyev I.D., Savitsky A.P., First biphotochromic fluorescent protein moxSAASoti stabilized for oxidizing environment // *Scientific Reports*. – 2022. – Vol. 12 (1). – P. 7862.

#### *Тезисы докладов*

1. Марынич Н.К. Влияние замен аминокислотных остатков цистеина на физико-химические свойства бифотохромного флуоресцентного белка SAASOTI // Сборник тезисов отчётной конференции аспирантов ФИЦ Биотехнологии РАН: направление подготовки 06.06.01 Биологические науки (22-30 июня 2020 г.) / под ред. В.О. Попова, А.Н. Фёдорова; сост. Е.С. Титова. – М.: МАКС Пресс. – 2020. – С. 43-46. (тезисы и устный доклад)
2. Марынич Н.К. Влияние замен аминокислотных остатков цистеина на физико-химические свойства бифотохромного флуоресцентного белка SAASoti // Сборник тезисов отчётной конференции аспирантов ФИЦ Биотехнологии РАН: направление подготовки 06.06.01 Биологические науки (21-25 июня 2021 г.) / под ред. В.О. Попова, А.Н. Фёдорова; сост. Е.С. Титова. – М.: ВАШ ФОРМАТ. – 2021. – С. 43-46. (тезисы и устный доклад)
3. Марынич Н.К., Гавшина А.В., Савицкий А.П. moxSAASoti: первый бифотохромный флуоресцентный белок, устойчивый в окислительных условиях, для применения в суперразрешающей микроскопии // XXXIV Международная зимняя молодежная научная школа «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии». – Москва, 2022 г. – С. 27 (устный доклад).



**Marynich Nadezhda Konstantinovna**  
**RESEARCH CENTER OF BIOTECHNOLOGY RAS**

**DEVELOPMENT OF THE FIRST BIPHOTOCHROMIC FLUORESCENT  
PROTEIN MOXSAASOTI STABILIZED FOR OXIDIZING  
ENVIRONMENT OF THE CELL**

**Abstract**

Biphotochromic proteins are unique representatives of GFP-like fluorescent proteins. They have both the properties of reversible photoswitching (transition between fluorescent and non-fluorescent states) and irreversible photoconversion (transition from green to red fluorescent). The high photochemical activity of cysteine residues is one of the reasons for the development of “mox”-monomeric and oxidation-resistant protein forms. Based on site-saturated two-point mutagenesis of C105 and C117, moxSAASoti was obtained with substitutions of all five cysteine residues C21N/C71G/C105G/C117T/C175A. The new variant is characterized by a higher photoswitching rate, more complete relaxation to the fluorescent state, and a higher photoconversion rate compared to mSAASoti.

**Keywords:** biphotochromic fluorescent proteins, reversible photoswitching, irreversible photoconversion, fluorescence, cysteine amino acid residues

*Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда  
(грант № 19-14-00373)*

## **Обухов Юрий Николаевич**

*аспирант ФИЦ Биотехнологии РАН 4 года обучения*

*профиль 1.5.4. Биохимия*

*e-mail: y.u.r.a.o@mail.ru*

*Научный руководитель*

## **Крицкий Михаил Сергеевич**

*доктор биологических наук, профессор,*

*гл.н.с. лаборатории экологической*

*и эволюционной биохимии*



# **ВОДРАСТВОРИМЫЕ ХЛОРОФИЛЛ-СВЯЗЫВАЮЩИЕ БЕЛКИ СЕМЕЙСТВА WSCP КАК СЕНСИБИЛИЗАТОРЫ ФОТОХИМИЧЕСКИХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ С ЭКЗОГЕННЫМИ ДОНОРАМИ И АКЦЕПТОРАМИ ЭЛЕКТРОНА**

**Аннотация.** Белки семейства WSCP обладают способностью связывать хлорофилл (Хл) и образовывать водорастворимые тетрамерные Хл-белковые комплексы, не принимающие участия в процессах фотосинтеза. Хл в комплексах белков WSCP класса II упакован в виде димеров, структура которых имеет сходство с так называемой «специальной парой» Хл в реакционных центрах фотосистем (РЦ ФС). Данное сходство делает белки WSCP класса II перспективным объектом для моделирования фотобиохимических систем на основе Хл. В ходе биоинформатического исследования мы выявили различия в аминокислотной последовательности и филогенетическом происхождении между белками WSCP двух разных подклассов ПА и ПВ [2]. В ходе фотохимических исследований мы показали способность двух представителей семейства WSCP, принадлежащих к подклассам ПА и ПВ, сенсibilизировать реакции переноса электронов с НАДН [1] и аскорбата, а также под воздействием света восстанавливать цитохром *c* [3]. Скорость восстановления зависела как от количества света, поглощаемого пигмент-белковым комплексом (ПБК) WSCP, так и от концентрации самого цитохрома *c*, а хлорофилл в составе ПБК WSCP являлся катализатором восстановления цитохрома *c*, но не источником электронов. Полученные результаты, свидетельствующие о том, что под воздействием света ПБК WSCP может взаимодействовать не только с донорами, но и с акцепторами электрона, важны для характеристики Хл-белков WSCP как моделей РЦ ФС.

**Ключевые слова:** WSCP, фотохимия, окислительно-восстановительные реакции, абсорбционная спектроскопия, цитохром *c*, аскорбат

Белки семейства WSCP (Water Soluble Chlorophyll-binding Protein) уникальны среди других Хл-содержащих белков тем, что не являются частью фотосинтетического аппарата, но при связывании с хлорофиллом образуют водорастворимые комплексы, не ассоциированные с липидной мембраной. Структурно данные комплексы существенно проще, чем фотосинтетические белковые ансамбли: они имеют гомотетрамерную структуру, а мономерные, не связанные с пигментом субъединицы имеют массу около 20 кДа [4]. Каждая субъединица тетрамерного ПБК содержит по одной молекуле Хл *a* или Хл *b* [5]. Белки семейства WSCP разделяют на два класса на основе способности ПБК претерпевать фотоконверсию, т.е. изменять под воздействием света спектр поглощения; белки класса I обладают такой способностью, а белки класса II – нет. Отличительной особенностью ПБК WSCP класса II является организация молекул Хл в составе комплексов в виде димеров, структура которых близка к так называемой «специальной паре» Хл или бактериального Хл в реакционных центрах фотосистем (РЦ ФС). В организме растений белки WSCP, предположительно, участвуют в реакциях на стрессовые воздействия [4].

Комбинация относительной простоты структуры и водорастворимости ПБК WSCP класса II вместе с димерной организацией молекул Хл в их составе делает данные белки перспективным объектом для моделирования фотосинтетических преобразователей энергии света, в том числе, эволюционных прототипов РЦ ФС. В данном контексте важное значение приобретает вопрос: способен ли димер молекул Хл в составе белка WSCP, аналогично «специальной паре» Хл в РЦ ФС, фотосенсибилизировать окислительно-восстановительные реакции. До начала нашей работы ответ на данный вопрос отсутствовал в литературе.

**Методы.** Для исследования выбрали белки WSCP класса II из разных организмов с известной трехмерной структурой хлорофилл-белковых комплексов: белок из *Brassica oleracea* (BoWSCP, подкласс IIA) и белок из *Lepidium virginicum* (LvWSCP подкласса IIB). Белки получали путём гетерологической экспрессии в штамме *E. coli* BL21(DE3), после чего осуществляли их сборку в нативные хлорофилл-белковые комплексы, инкубируя с препаратом тилакоидов из листьев шпината. Полученные комплексы очищали посредством термообработки и хроматографии на Ni-агарозе [1]. Для оценки качества препаратов хлорофилл-белковых

комплексов использовали такие методы, как электрофорез в ПААГ, абсорбционную и флуоресцентную спектроскопию, а также спектроскопию кругового дихроизма. Фотофизические и фотохимические свойства препаратов изучали, используя спектрофотометр Shimadzu-1601PC в Центре коллективного пользования ИНБИ РАН (ФИЦ Биотехнологии РАН), а также осветительную установку на основе осветителя «Свитель-М», теплового фильтра, фокусирующей линзы, системы светофильтров и магнитной мешалки [1].

**Результаты и обсуждение.** Мы подвергали водный раствор ПБК ВоWSCP ( $OD_{673}=0,2$ ) и 10 мкМ цитохрома *c* облучению красным светом ( $\lambda > 650$  нм,  $700 \mu E/m^2 c$ ) в бескислородных условиях (продувка аргоном). Помимо ПБК ВоWSCP и цитохрома *c* пробы объёмом 2 мл содержали 10мМ Трис-НСl рН = 8 и 150 мМ NaCl, который добавляли в пробы для предотвращения агрегации белков. В результате облучения наблюдали увеличение оптической плотности проб при 550 нм, соответствующей пику поглощения восстановленной формы цитохрома *c*. Увеличение оптической плотности, т.е. восстановление цитохрома *c*, происходило и в отсутствие облучения, однако, светозависимый прирост этой величины значительно и достоверно превосходил её прирост в отсутствие облучения (Рис. 1). Можно заключить, таким образом, что возбуждение светом молекул димерного Хл в составе ПБК приводило к восстановлению цитохрома *c*.

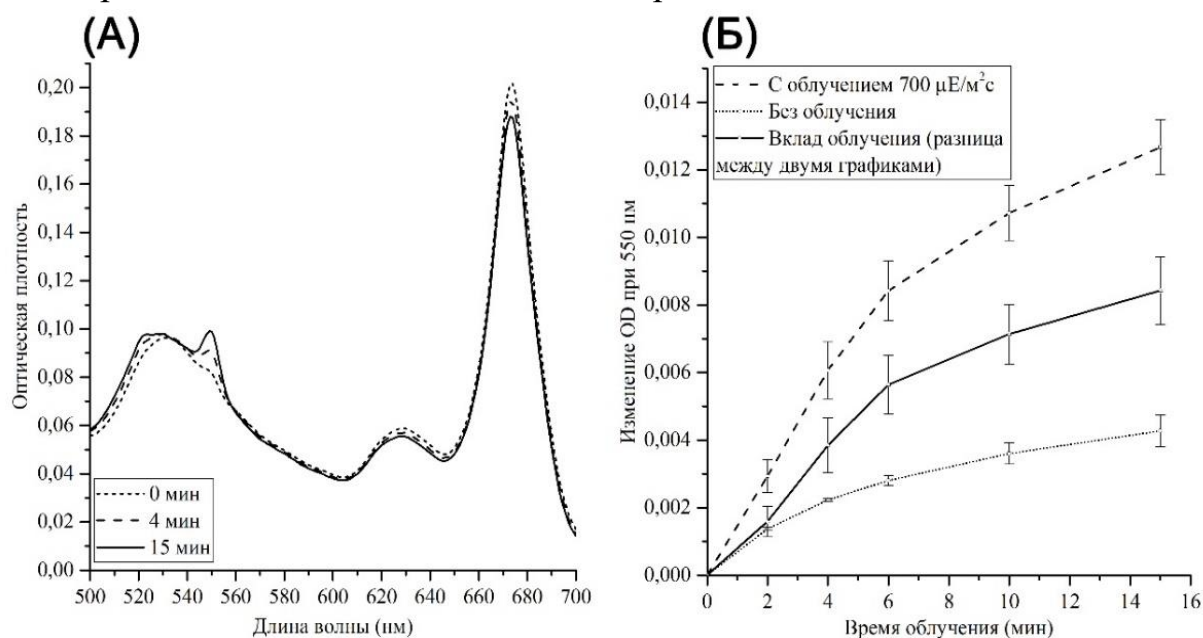


Рис. 1. (А) Спектры поглощения смеси ПБК ВоWSCP с цитохромом *c* в бескислородных условиях до облучения, после 4 и 15 минут облучения красным светом; (Б) Изменение оптической плотности при 550 нм при облучении раствора ПБК ВоWSCP и цитохрома *c* красным светом

Поскольку оценка зависимости скорости процесса от интенсивности действующего облучения (или, в случае химического агента, от его концентрации) может способствовать пониманию его механизма, мы исследовали зависимость скорости фотовосстановления цитохрома *c* от интенсивности облучения, а также от концентрации цитохрома *c*. При варьировании интенсивности света ( $\lambda > 650$  нм) на уровне 250, 430, 700, 1080 и 1800  $\mu\text{E}/\text{m}^2\text{s}$  использовали концентрацию цитохрома *c* в 10 мкМ. При варьировании концентрации цитохрома *c* в диапазоне от 10 до 50 мкМ интенсивность облучения установили на уровне 1800  $\mu\text{E}/\text{m}^2\text{s}$ . Далее, по приросту оптической плотности при 550 нм определяли количество цитохрома *c*, восстановленного за первые 4 минуты облучения. Параллельно оценивали количество окисленного Хл в составе ПБК ВоWSCP за то же время (по снижению оптической плотности при 673 нм). Результаты приведены на (Рис. 2).

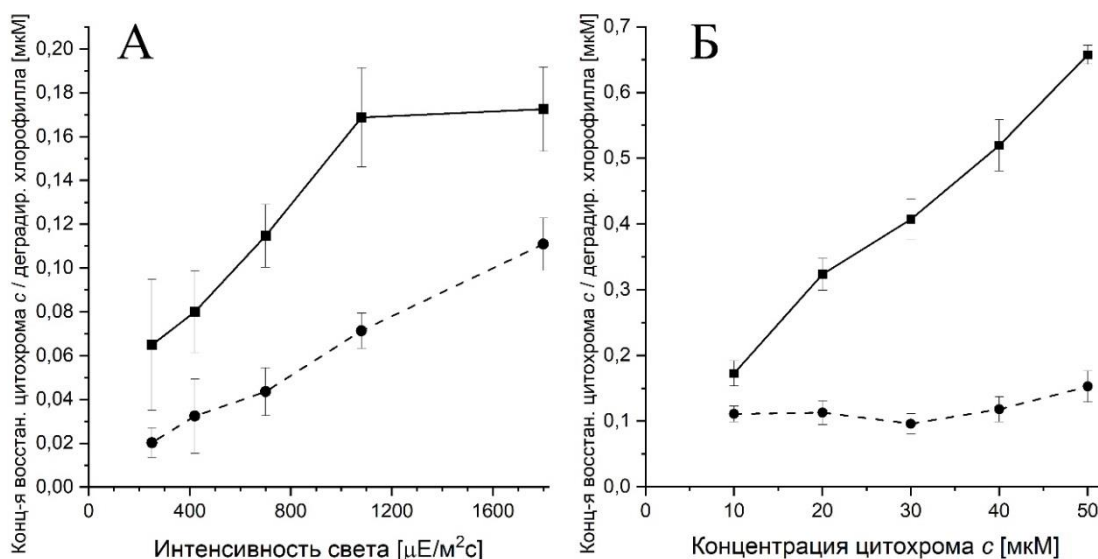


Рис. 2. Зависимость концентрации восстановленного цитохрома *c* (сплошная линия, ■) и деградировавшего Хл в составе ПБК ВоWSCP (пунктир, ●) от интенсивности облучения (А) и концентрации цитохрома *c* (Б) после четырёх минут облучения (вклад темнового восстановления цитохрома *c* заранее вычтен)

Количество восстановленного цитохрома *c* возрастало быстрее, чем количество фотоокисленного Хл в составе ПБК, при интенсивностях облучения менее 1080  $\mu\text{E}/\text{m}^2\text{s}$ ; наблюдаемая далее нелинейность световой кривой может свидетельствовать о снижении эффективности переноса электрона от ПБК к цитохрому *c* вследствие диффузионных ограничений. Причиной данного эффекта является, очевидно, относительно небольшое время жизни триплетно-возбужденного состояния Хл (до 2 мс в анаэробной среде), участвующего в фотохимической реакции. Количество восстановленного цитохрома *c* линейно возрастало с ростом концентрации

цитохрома *c*, что свидетельствует в пользу прямого взаимодействия цитохрома *c* с ПБК WSCP. При этом количество деградировавшего хлорофилла с ростом концентрации цитохрома *c* не возрастало и было меньше количества восстановленного цитохрома *c*. Это подтверждает роль ПБК WSCP в качестве катализатора и указывает, что он не является основным источником электронов для восстановления цитохрома *c*.

На основании полученных результатов можно заключить, что димеры Хл в составе ПБК WSCP могут осуществлять восстановление цитохрома *c* под воздействием света.

Следующей задачей стало выяснение способности димера Хл в составе ПБК сенсibilизировать окисление молекул донора электрона – НАДН и аскорбата. В стандартизованных условиях проведения опыта (одинаковое количество ПБК ВоWSCP/LvWSCP в пробе, соответствующее  $OD_{673/663}=0,1$ , концентрация НАДН 100 мкМ, интенсивность возбуждающего света 1800  $\mu E/m^2 \cdot c$  ( $\lambda > 650$  нм; поглощаем только Хл в составе ПБК), буфер – 10мМ Трис-НСl рН = 8, объём проб 2 мл) фотоокисление НАДН, о котором судили по падению пика поглощения при 340 нм (Рис. 1), данными двумя видами ПБК происходило с примерно одинаковой скоростью (Рис. 2А и 2Б). Фотоокисление НАДН комплексами ВоWSCP/LvWSCP происходит с участием активных форм кислорода, о чём в том числе свидетельствует ингибирующее действие на фотопроецесс 300 и 600 мкМ азида натрия (тушителя триплетного состояния хлорофилла и синглетного состояния кислорода), и не происходит в бескислородной среде.

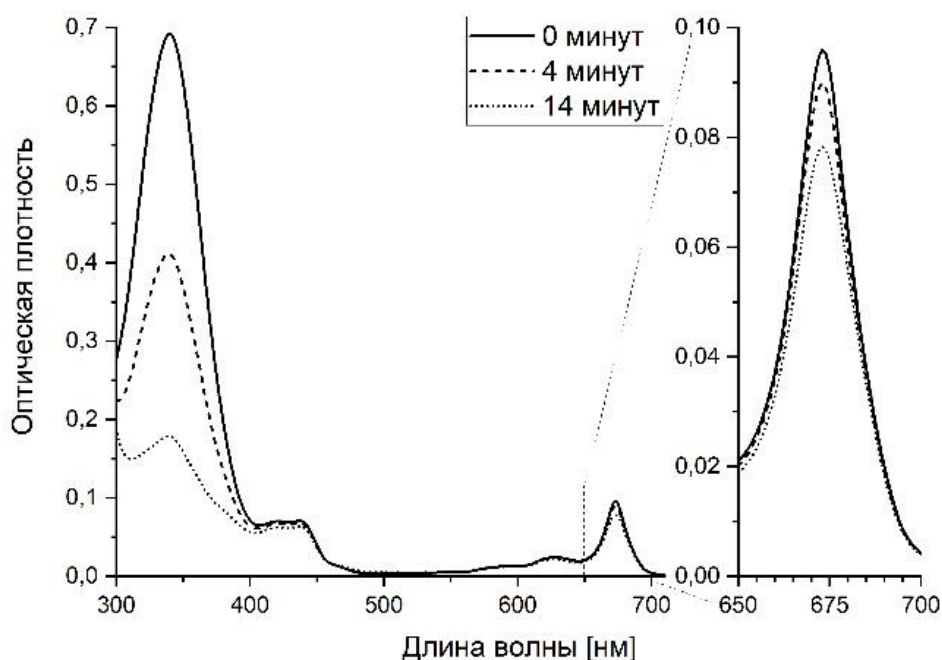


Рис. 3. Спектры поглощения смеси ПБК ВоWSCP с НАДН до облучения, после 4 и 15 минут облучения красным светом

Также ПБК VoWSCP ( $OD_{673}=0,1$ ) при облучении светом интенсивностью  $700 \mu E/m^2 c$  ( $\lambda > 650 \text{ nm}$ ) окислял аскорбат, на что указывало снижение интенсивности пика поглощения этого донора электрона при 265 нм. При этом на воздухе в равных условиях окисление аскорбата происходило быстрее, чем окисление НАДН, а в бескислородной среде не окислялись оба донора электрона (Рис. 2В).

Таким образом, мы показали, что Хл, присутствующий в составе ПБК VoWSCP и ПБК LvWSCP в водном растворе, сенсibiliзирует фотохимическое окисление таких доноров электрона, как НАДН и аскорбат за счёт генерации синглетного кислорода. Сенсibiliзирующая активность ПБК данных белков была одинакова. Окисление аскорбата происходило быстрее, чем окисление НАДН.

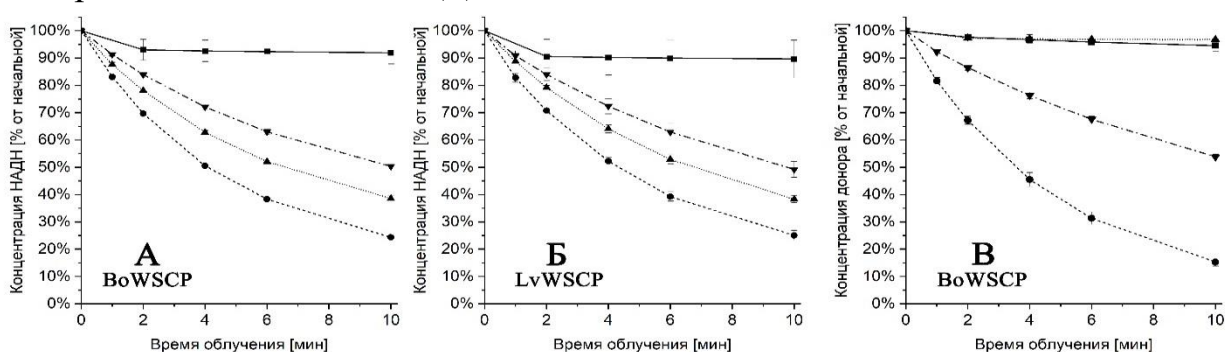


Рис. 4. (А) Кинетика фотоокисления донора электрона НАДН (в исходной концентрации 100 мкМ) с ПБК VoWSCP в атмосфере аргона (сплошная линия, ■), в присутствии только кислорода (пунктир, ●), в присутствии кислорода с 300 мкМ азиды натрия (точки, ▲) и 600 мкМ азиды натрия (пунктир с точкой, ▼); (Б) – Кинетика, аналогичная «А», но с ПБК LvWSCP; (В) - Кинетика фотоокисления донора электрона НАДН (в исходной концентрации 100 мкМ) с ПБК VoWSCP в атмосфере аргона (точки, ▲) и в присутствии кислорода (пунктир с точкой, ▼), а также кинетики фотоокисления аскорбата (в исходной концентрации 100 мкМ) с ПБК VoWSCP в атмосфере аргона (сплошная линия, ■) и в присутствии кислорода (пунктир, ●)

На основании полученных результатов можно заключить, что димеры Хл в составе ПБК WSCP под воздействием света могут не только осуществлять восстановление акцепторов электрона (в наших опытах - цитохрома *c*), но и окислять доноры электрона (например, НАДН и аскорбат) за счёт генерации синглетного кислорода. Наблюдавшаяся меньшая скорость фотоокисления НАДН по сравнению с аскорбатом (при том, что НАДН является более сильным восстановителем) говорят о важности стерического фактора, влияющего на доступность редокс-агентов к фотокаталитическому центру тетрамеров WSCP. Полученные результаты, демонстрирующие фотосенсibiliзирующую активность димера Хл в составе ПБК на основе белков семейства WSCP важны для характеристики этих белков как возможных моделей РЦ ФС.

## Литература

1. Обухов Ю.Н. Исследование фотобиохимических свойств водорастворимых хлорофилл-связывающих белков WSCP // Сборник тезисов отчётной конференции аспирантов ФИЦ Биотехнологии РАН: направление подготовки 06.06.01 Биологические науки (24-28 июня 2019 г.) / под ред. В.О. Попова, К.Г. Скрыбина; сост. Е. С. Титова. – Москва: МАКС Пресс. – 2019. – С. 28-32.
2. Обухов Ю.Н. Биоинформатический анализ водорастворимых хлорофилл-связывающих белков WSCP в контексте различия их фотохимических свойств // Сборник тезисов отчётной конференции аспирантов ФИЦ Биотехнологии РАН: направление подготовки 06.06.01 Биологические науки (22-30 июня 2020 г.) / под ред. В.О. Попова, А.Н. Фёдорова; сост. Е.С. Титова. – М.: МАКС Пресс. – 2020. – С. 47-53.
3. Обухов Ю.Н. Водорастворимые хлорофилл-связывающие белки семейства WSCP: сенсбилизация фотохимических взаимодействий с экзогенными донорами и акцепторами электрона // Сборник тезисов отчётной конференции аспирантов ФИЦ Биотехнологии РАН: направление подготовки 06.06.01 Биологические науки (21-25 июня 2021 г.) / под ред. В.О. Попова, А.Н. Фёдорова; сост. Е.С. Титова. – М.: ВАШ ФОРМАТ. – 2021. – С. 71-79.
4. Takahashi S., Yanai H., Nakamaru Y., Uchida A., Nakayama K., Satoh H. Molecular cloning, characterization and analysis of the intracellular localization of a water-soluble Chl-binding protein from Brussels sprouts (*Brassica oleracea* var. *gemmifera*) // Plant and Cell Physiology. – 2012. – Vol. 53 (5). – P. 879-891.
5. Horigome D., Satoh H., Itoh N., Mitsunaga K., Oonishi I., Nakagawa A., Uchida A. Structural mechanism and photoprotective function of Water-Soluble Chlorophyll-binding Protein // Journal of Biological Chemistry. – 2007. – Vol. 282 (9). – P. 6525-6531.

## Список публикаций по теме работы

### Статьи

1. Малеева Ю.В., Неверов К.В., Обухов Ю.Н., Крицкий М.С. Водорастворимые хлорофиллсвязывающие белки растений: структура, свойства и функции // Молекулярная биология. – 2019. – Т. 53. – № 6. – С. 998-1011.
2. Обухов Ю.Н., Неверов К.В., Малеева Ю.В., Крицкий М.С. Исследование фотохимических свойств и филогении растительных белков семейства WSCP // Евразийский Союз Ученых. – 2020. – Т. 3. – № 11 (80). – С. 38-43.



### Тезисы докладов

1. Обухов Ю. Н. Исследование свойств водорастворимых хлорофилл-связывающих белков растений // Материалы Международного молодежного научного форума ЛОМОНОСОВ-2019 / Отв. ред. И.А. Алешковский, А.В. Андриянов, Е.А. Антипов. – Т. 1.– Москва: М – 2019. (постерный доклад).
2. Обухов Ю.Н. Исследование фотобиохимических свойств водорастворимых хлорофилл-связывающих белков WSCP // Сборник тезисов отчётной конференции аспирантов ФИЦ Биотехнологии РАН: направление подготовки 06.06.01 Биологические науки (24-28 июня 2019 г.) / под ред. В.О. Попова, К.Г. Скрыбина; сост. Е. С. Титова. – Москва: МАКС Пресс, 2019. – С. 28-32. (тезисы и устный доклад)
3. Обухов Ю.Н., Неверов К.В., Малеева Ю.В., Крицкий М.С. Получение и свойства водорастворимых хлорофилл-связывающих белков (WSCP) из *Brassica oleracea* и *Lepidium virginicum* // IX съезд общества физиологов растений России и всероссийская научная конференция с международным участием «Физиология растений – основа создания растений будущего». Казань, Россия. 18-24 сентября 2019. – 2019. – С. 319-319. (постерный доклад).
4. Обухов Ю.Н., Неверов К.В., Малеева Ю.В., Крицкий М.С. Исследование свойств водорастворимых хлорофилл-связывающих белков высших растений // Актуальные вопросы биологической физики и химии. БФФХ-2019: материалы XIV международной научной конференции, г. Москва, 21-24 ноября 2019 г. – Москва-Севастополь, 2019. – С. 123-124. (постерный доклад)
5. Обухов Ю.Н., Малеева Ю.В., Неверов К.В., Крицкий М.С. Водорастворимые хлорофилл-связывающие белки WSCP класса II: анализ разнообразия и филогенетического родства // Молекулярные, мембранные и клеточные основы функционирования биосистем: тез. докл. междунар. науч. конф., Четырнадцатого съезда Белорус. обществ. об-ния фотобиологов и биофизиков, Беларусь, Минск, 17-19 июня 2020 г. / Белорус. гос. ун-т; редкол.: И. Д. Волотовский (отв. ред.) [и др.]. – Минск: БГУ, 2020. (постерный доклад)
6. Обухов Ю.Н. Водорастворимые хлорофилл-связывающие белки семейства WSCP: сенсбилизация фотохимических взаимодействий с экзогенными донорами и акцепторами электрона // Сборник тезисов отчётной конференции аспирантов ФИЦ Биотехнологии РАН: направление подготовки 06.06.01 Биологические науки (22-30 июня 2020 г.) / под ред. В.О. Попова, А.Н. Фёдорова; сост. Е.С. Титова. – М.: МАКС Пресс. – 2020. – С. 47-53. (тезисы и устный доклад)

7. Обухов Ю.Н. Водорастворимые хлорофилл-связывающие белки семейства WSCP: сенсibilизация фотохимических взаимодействий с экзогенными донорами и акцепторами электрона // Сборник тезисов отчётной конференции аспирантов ФИЦ Биотехнологии РАН: направление подготовки 06.06.01 Биологические науки (21-25 июня 2021 г.) / под ред. В.О. Попова, А.Н. Фёдорова; сост. Е.С. Титова. – М.: ВАШ ФОРМАТ. – 2021. – С. 71-79. (тезисы и устный доклад)
8. Обухов Ю.Н., Неверов К.В., Малеева Ю.В., Крицкий М.С. Водорастворимые хлорофилл-связывающие белки (WSCP) высших растений: получение и фотохимические свойства (постерный доклад) // Всероссийская научная конференция с международным участием и школа для молодых ученых «Экспериментальная биология растений и биотехнология: история и взгляд в будущее». Материалы докладов, Москва, – 2021. – С. 98-98.

### **Основные достижения**

Диплом за лучший доклад на ежегодной отчетной конференции аспирантов ФИЦ Биотехнологии РАН, 2019 г.

**Obukhov Yuri Nikolayevich**  
**RESEARCH CENTRE OF BIOTECHNOLOGY RAS**

## **WATER- SOLUBLE CHLOROPHYLL-BINDING PROTEINS OF THE WSCP FAMILY: SENSITIZATION OF PHOTOCHEMICAL INTERACTIONS WITH EXOGENIC DONORS AND ELECTRON ACCEPTORS**

### **Abstract**

The proteins of WSCP family have the ability to bind chlorophyll (Chl) and form water-soluble tetrameric Chl-protein complexes that are not involved in process of photosynthesis. Chl in class II WSCP protein complexes is packaged as dimers, the structure of which is similar to the so-called Chl “special pair” in the reaction centers of photosystems (RC PS). This similarity makes class II WSCPs a promising object for modeling photobiochemical systems based on Chl.

In a bioinformatics study, we identified differences in amino acid sequence and phylogenetic origin between WSCPs of two different subclasses IIA and IIB [2]. In the course of photochemical studies, we have shown the ability of two members of the WSCP family, belonging to subclasses IIA and IIB, sensitize electron transfer reactions with NADH [1] and ascorbate, and also to reduce cytochrome c [3] under the influence of light. The recovery rate depended both on the amount of light absorbed by the WSCP complexes and on the concentration of

cytochrome c itself. The chlorophyll in the WSCP complexes was a catalyst for the reduction of cytochrome c, but not a source of electrons. The fact that, under the influence of light, WSCP complexes can interact not only with donors, but also with electron acceptors, is important for the characterization of Chl-WSCP protein complexes as models of PS RCs.

**Keywords:** WSCP, photochemistry, redox reactions, absorption spectroscopy, cytochrome C, ascorbate

**Острик Альбина Александровна**

аспирант ФИЦ Биотехнологии РАН 4 года обучения

профиль 1.5.4. Биохимия

e-mail: abillymartiny@gmail.com

Научный руководитель

**Салина Елена Геннадьевна**

доктор биологических наук,

в.н.с. лаборатории биохимии стрессов микроорганизмов



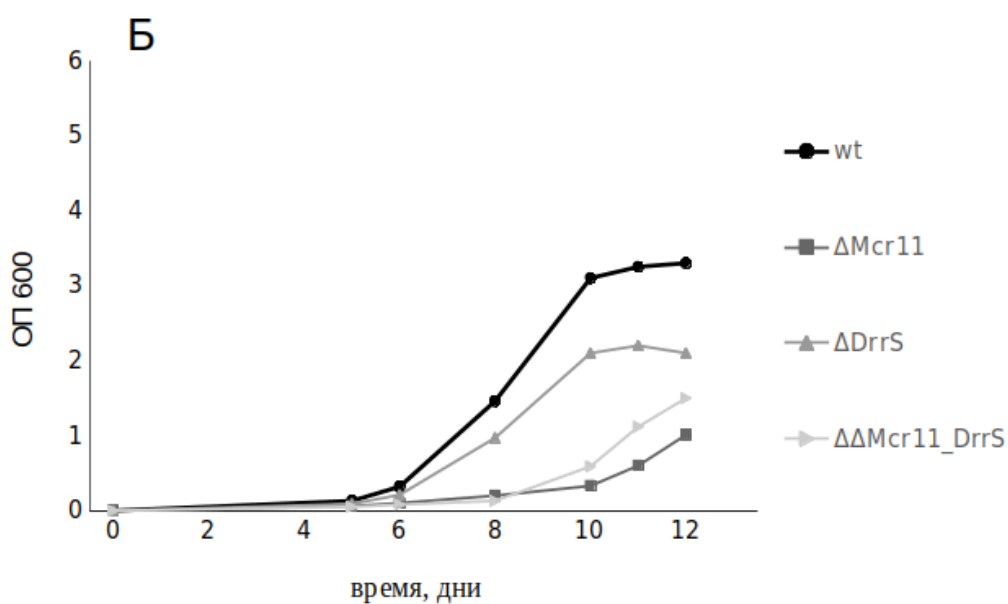
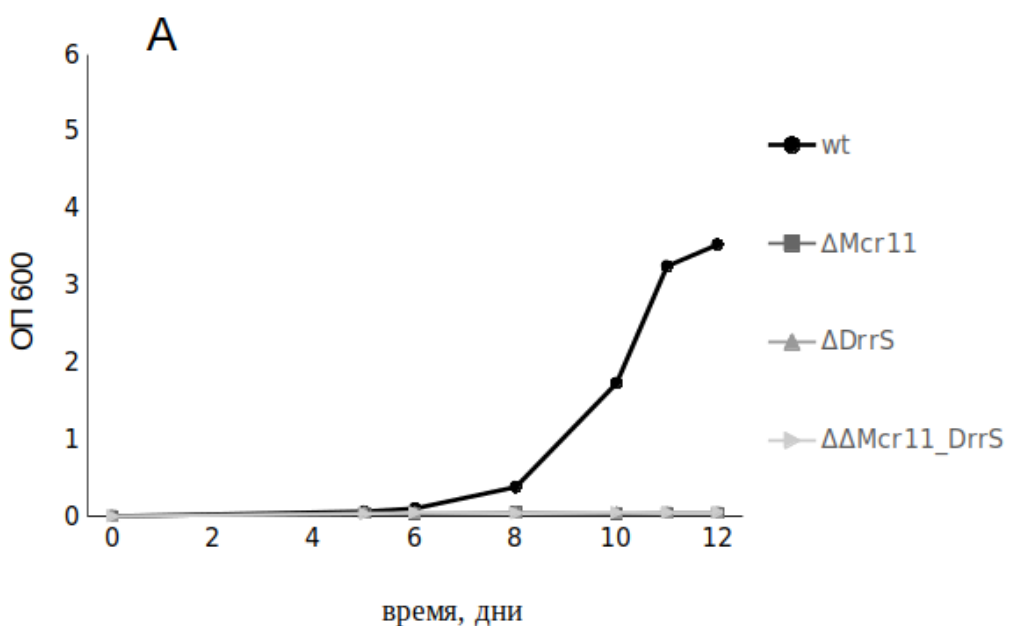
## **РЕГУЛЯТОРНЫЕ МАЛЫЕ НЕКОДИРУЮЩИЕ РНК Mcr11 И DrrS MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS КАК ФАКТОРЫ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ «ПАТОГЕН – ХОЗЯИН»**

**Аннотация.** Механизмы приспособления *Mycobacterium tuberculosis* к внешнему неблагоприятному воздействию основаны на адаптации метаболизма и включают в себя регуляцию экспрессии генов посредством малых некодирующих РНК. Малые РНК DrrS и Mcr11 – это потенциальные факторы регуляции взаимодействия *M. tuberculosis* с организмом хозяина при инфекции. Их делеция меняет фенотипические характеристики роста культуры *in vitro* только после пассирования мутантных штаммов *in vivo* и выявляется как проявление феномена «глицериновой токсичности».

**Ключевые слова:** малые РНК, *M. tuberculosis*, нокаут, «глицериновая токсичность», инфекция мышей

Малые некодирующие РНК являются важными регуляторами генной экспрессии у бактерий и позволяют быстро адаптироваться к меняющимся внешним условиям. Возбудитель туберкулеза *Mycobacterium tuberculosis* – это внутриклеточная паразитическая бактерия, приспособленная к жизни внутри организма человека. Отличительной особенностью микобактерий является способность к длительному переживанию неблагоприятных факторов, действующих на них со стороны иммунной системы человека. Считается, что быстрая адаптация метаболизма и возможность перехода в покоящееся состояние в ответ на неоптимальные внешние условия – это основной механизм, способствующий повсеместной распространенности латентного носительства туберкулёзной инфекции. В модели покоящегося состояния *in vitro* [1] и модели мышинной инфекции *in vivo* [2] в транскриптом *M. tuberculosis* малые некодирующие РНК DrrS и Mcr11 обнаружены в числе наиболее представленных транскриптов, что отражает их участие во взаимодействии с организмом хозяина.

На основе штамма *M. tuberculosis* H37Rv были получены штаммы с делециями генов малых РНК DrrS ( $\Delta$ DrrS), Mcr11 ( $\Delta$ Mcr11), а также штамм с двойной делецией ( $\Delta\Delta$ Mcr11\_DrrS). Оказалось, что делеции этих генов не изменяли характер роста микобактерий *in vitro*, и не влияли на устойчивость полученных штаммов к стрессовому воздействию по сравнению с диким типом. Однако после выделения мутантных штаммов из органов инфицированных мышей линии Black6c их рост на стандартных лабораторных средах существенно зависел от типа источника углерода и его концентрации. Штаммы  $\Delta$ DrrS,  $\Delta$ Mcr11 и в наибольшей степени штамм  $\Delta\Delta$ Mcr11\_DrrS характеризовались задержкой роста на плотной питательной среде Сотона, при том что их рост на среде Миддлбука не отличался от дикого типа.



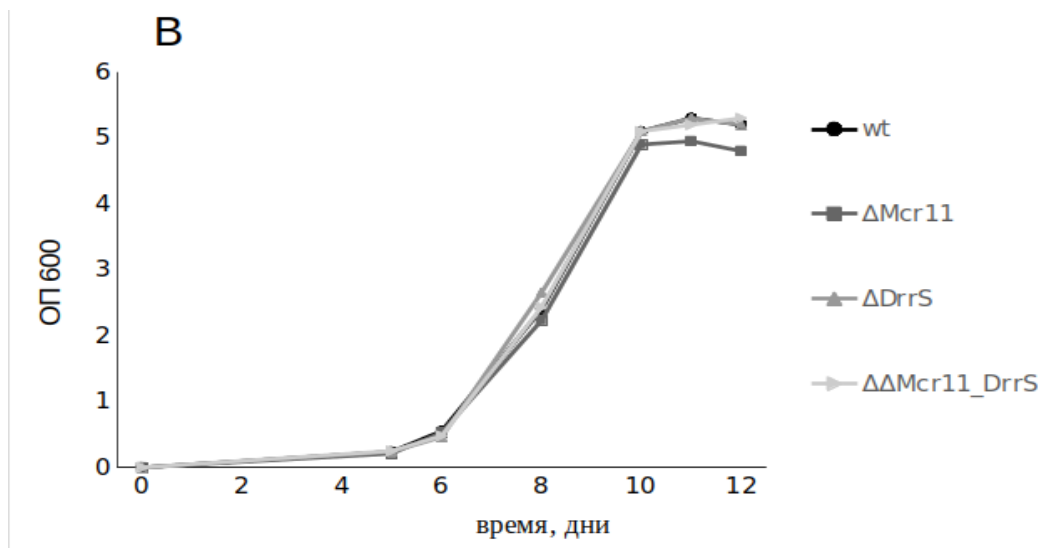


Рис. 1. Рост штаммов  $\Delta$ DrrS,  $\Delta$ Mcr11 и  $\Delta\Delta$ Mcr11\_DrrS *in vitro* после пассирования в мышцах на среде Сотона (А), на среде Сотона со сниженной концентрацией глицерина до 0,6 об. % и на среде Миддлбрука (В)

На жидкой среде Сотона все штаммы с делециями малых РНК не были способны к росту (Рис. 1А), при сохранении нормального роста на среде Миддлбрука (Рис. 1В). Основным отличием в составе сред является концентрация глицерина, которая составляет 6 об. % в среде Сотона и 0,5 об. % в среде Миддлбрука. Действительно, рост мутантных штаммов в среде Сотона частично восстанавливался при уменьшении концентрации глицерина в среде до 0,6 об. % (Рис. 1Б).

Одним из возможных факторов негативного влияния глицерина на микобактерии может быть повышенное внутриклеточное продукция токсичного метаболита глицерина метилглиоксаля, либо дефект систем его дезактивации. Однако, культивирование штаммов  $\Delta$ DrrS,  $\Delta$ Mcr11 и  $\Delta\Delta$ Mcr11\_DrrS в присутствии пролина, способствующего уменьшению токсического влияния метилглиоксаля, не восстановило рост культур на среде Сотона, что указывает на иные механизмы «глицериновой токсичности». Из данных литературы известно, что подобный фенотип наблюдался у штаммов *M. tuberculosis* с делецией генов Rv3679-Rv3680 после пассирования в мышцах [3]. С помощью программы CopraRNA была проанализирована возможность взаимодействия малых РНК DrrS и Mcr11 с этими генами, и оказалось, что мРНК гена Rv3679 в 5'-нетранслируемой области содержит участок связывания с малой РНК DrrS, что делает мРНК этого гена её потенциальной мишенью.

**Основные выводы.** Малые РНК DrrS и Mcr11 не оказывают влияния на фенотипические свойства *M. tuberculosis* в лабораторных условиях, но меняют метаболизм микобактерий при инфекции, что отражается на их дальнейшем культивировании *in vitro*, и проявляется в повышенной

чувствительности штаммов с делецией малых РНК к глицерину. Одной из возможных мишеней малой РНК DrrS является мРНК гена Rv3679, однако эта гипотеза требует дальнейшего экспериментального подтверждения.

### Литература

1. Ignatov D.V., Salina E.G., Fursov M.V., Skvortsov T.A., Azhikina T.L., Kaprelyants A.S. Dormant non-culturable *Mycobacterium tuberculosis* retains stable low-abundant mRNA // BMC Genomics. – 2015. – Vol. 16. – P. 954.
2. Arnvig K.B., Comas I., Thomson N.R., Houghton J., Boshoff H., Croucher N.J., Rose G., Perkins T.T., Parkhill J., Dougan G., Young D.B. Sequence-based analysis uncovers an abundance of non-coding RNA in the total transcriptome of *Mycobacterium tuberculosis* // PLoS Pathogens. – 2011. – Vol. 7 (11). – P. e1002342.
3. Whitaker M., Ruecker N., Hartman T., Klevorn T., Andres J., Kim J., Rhee K., Ehrt S. Two interacting ATPases protect *Mycobacterium tuberculosis* from glycerol and nitric oxide toxicity // Journal of Bacteriology. – 2020. – Vol. 202 (16). – P. e00202-20.

### Список публикаций по теме работы

#### Статьи

1. Salina E., Grigorov A., Skvortsova Y., Majorov K., Bychenko O., Ostrik A., Logunova N., Ignatov D., Kaprelyants A., Apt A., Azhikina T. MTS1338, A Small *Mycobacterium tuberculosis* RNA, Regulates Transcriptional Shifts Consistent With Bacterial Adaptation for Entering Into Dormancy and Survival Within Host Macrophages // Frontiers in Cellular and Infection Microbiology. – 2019. – Vol. 9 – P. 405.
2. Острик А.А., Салина Е.Г., Скворцова Ю.В., и др. Малые РНК *Mycobacterium tuberculosis* в адаптации к стрессовым условиям, моделирующим инфекцию *in vitro* // Прикладная биохимия и микробиология. – 2020. – Т. 56. – № 4. – С. 336-341.
3. Острик А.А., Ажикина Т.Л., Салина Е.Г. Малые некодирующие РНК и их роль в патогенезе *Mycobacterium tuberculosis* // Успехи биологической химии, – 2021. – Т. 61. – С. 229-252.
4. Bychenko O., Skvortsova Y., Ziganshin R., Grigorov A., Aseev L., Ostrik A., Kaprelyants A., Salina E.G., Azhikina T. *Mycobacterium tuberculosis* Small RNA MTS1338 Confers Pathogenic Properties to Non-Pathogenic *Mycobacterium smegmatis* // Microorganisms. – 2021. – Vol. 9 (2). – P. 414.
5. Острик А.А., Григоров А.С., Бочарова И.В., Капрельянц А.С., Ажикина Т.Л., Салина Е.Г. Малые РНК Mcr11 и DrrS *Mycobacterium tuberculosis* как

возможные регуляторы метаболизма глицерина // Прикладная биохимия и микробиология. – 2022. – Т. 58. – № 4. – С. 1-6.

*Тезисы докладов*

1. Острик А.А. Создание и характеристика мутантных штаммов *M. tuberculosis* по генам малых РНК // Сборник тезисов отчётной конференции аспирантов ФИЦ Биотехнологии РАН: направление подготовки 06.06.01 Биологические науки (24–28 июня 2019 г.) / под ред. В.О. Попова, К.Г. Скрябина; сост. Е.С. Титова. – М.: МАКС Пресс. – 2019. – С. 33-35. (тезисы и устный доклад)
2. Скворцова Ю.В., Быченко О.С., Зиганшин Р.Х., Григоров А.С., Салина Е.Г., Острик А.А., Ажикина Т.Л. Малая РНК MTS1338 *Mycobacterium tuberculosis* способствует выживанию микобактерий в макрофагах путём замедления созревания фаголизосом // II Объединённый научный форум, VI съезд биохимиков России. (1-6 октября 2019 г.) Сочи – Дагомыс, Россия. – Спецвыпуск ActaNaturae. – 2019. – Т. 2. – С. 26.
3. Острик А.А. Влияние гиперэкспрессии малых некодирующих РНК *Mycobacterium tuberculosis* на выживание в стрессовых условиях // Сборник тезисов отчётной конференции аспирантов ФИЦ Биотехнологии РАН: направление подготовки 06.06.01 Биологические науки (22-30 июня 2020 г.) / под ред. В.О. Попова, А.Н. Фёдорова; сост. Е.С. Титова. – М.: МАКС Пресс. – 2020. – С. 54-57. (тезисы и устный доклад)
4. Острик А.А., Салина Е.Г. Перспективы использования малых некодирующих РНК *M. tuberculosis* для диагностики туберкулёзной инфекции // Сборник тезисов конференции «Молекулярная диагностика и биобезопасность». – 2020. – С. 59-60.
5. Острик А.А., Григоров А.С., Ажикина Т.Л., Салина Е.Г. Малая РНК MTS1338 – потенциальный фактор вирулентности *Mycobacterium tuberculosis* // XXXIII зимняя молодежная научная школа «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии» Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, 8-11 февраля 2021. (тезисы и устный доклад)
6. Острик А.А. Малая РНК MTS1338 – потенциальный фактор вирулентности *Mycobacterium tuberculosis* // Сборник тезисов отчётной конференции аспирантов ФИЦ Биотехнологии РАН: направление подготовки 06.06.01 Биологические науки (21-25 июня 2021 г.) / под ред. В.О. Попова, А.Н. Фёдорова; сост. Е.С. Титова. – М.: ВАШ ФОРМАТ. – 2021. – С. 80-84. (тезисы и устный доклад)
7. Острик А.А., Григоров А.С., Скворцова Ю.В. и др. Регуляторные малые некодирующие РНК Mcr11 и DrrS *Mycobacterium tuberculosis* и их



роль во взаимодействии «патоген-хозяин» // III Объединённый научный форум, VII съезд биохимиков России. (3-8 октября 2021 г.). – М.: Издательство «Перо». – 2021. – Т. 2. – С. 38.

8. Быченко О.С., Скворцова Ю.В., Григоров А.С., Асеев Л.В., Острик А.А., Салина Е.Г., Ажикина Т.Л. Малая РНК *Mycobacterium tuberculosis* MTS1338 как фактор вирулентности микобактерий // III Объединённый научный форум, VII съезд биохимиков России. (3-8 октября 2021 г.). – М.: Издательство «Перо». – 2021. – Т. 2. – С. 23.

9. Григоров А.С., Салина Е.Г., Быченко О.С., Скворцова Ю.В., Острик А.А., Свирщевская Е.В., Капрельянц А.С., Ажикина Т.Л. Малые некодирующие РНК *Mycobacterium tuberculosis* MTS1338 и MTS0997 модулируют иммунный ответ при инфекции макрофагов // III Объединённый научный форум, VII съезд биохимиков России. (3-8 октября 2021 г.). – М.: Издательство «Перо». – 2021. – Т. 2. – С. 13.

10. Григоров А.С., Острик А.А., Салина Е.Г., Ажикина Т.Л. РНК-таргетом белка CspA *Mycobacterium tuberculosis* // III Объединённый научный форум, VII съезд биохимиков России. (3-8 октября 2021 г.). – М.: Издательство «Перо». – 2021. – Т. 2. – С. 33.

#### **Основные достижения**

Диплом за лучший доклад на ежегодной отчетной конференции аспирантов ФИЦ Биотехнологии РАН, 2020 г.

**Ostrik Albina Alexandrovna**  
**RESEARCH CENTRE OF BIOTECHNOLOGY RAS**

#### **REGULATORY SMALL NONCODING RNAs Mcr11 AND DrrS OF *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* AS “HOST-PATHOGEN” INTERACTION FACTORS**

##### **Abstract**

*Mycobacterium tuberculosis* adaptation to hostile environment mechanisms rely on metabolism adjustment and includes gene expression regulation by small noncoding RNAs. sRNAs DrrS and Mcr11 are potential regulation factors of *M. tuberculosis* and host organism interaction during infection. Deletion of these sRNAs changes phenotypic characteristics of an in vitro growing culture only after in vivo passaging, which comes out as a “glycerol toxicity” phenomenon.

**Keywords:** small RNAs, *M. tuberculosis*, knockout, “glycerol toxicity”, mouse infection

## ПРОФИЛЬ 1.5.6. БИОТЕХНОЛОГИЯ

**Бубнова Анастасия Николаевна**

*аспирант ФИЦ Биотехнологии РАН 1 года обучения*

*профиль 1.5.6. Биотехнология*

*e-mail: an\_bubnova@mail.ru*

Научный руководитель

**Камионская Анастасия Михайловна**

*кандидат биологических наук,*

*заместитель директора по научной работе,*

*руководитель группы биоинженерии растений*



### **ОЦЕНКА И ОТБОР ПОТЕНЦИАЛЬНО НОВЫХ ПРОМОТОРНЫХ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ В ГЕНОМЕ РИСА *ORYZA SATIVA* ИЗ БАЗЫ ДАННЫХ DATABASE OF POTENTIAL PROMOTER ДЛЯ ПОСЛЕДУЮЩЕЙ ПРОВЕРКИ IN VIVO**

**Аннотация.** В данной работе исследовались последовательности 1-й хромосомы генома риса *Oryza sativa* из базы данных *Database of Potential promoter sequences* [1], предсказанные, как промоторные элементы с помощью математического метода предсказания последовательностей, основанного на множественных выравниваниях [2]. Предсказанные промоторные последовательности были проверены на наличие за ними транскрибируемых участков ДНК. Также был проведён сравнительный анализ дистанций до ближайших транскриптов между исследуемыми промоторами и промоторами из другой базы данных с целью отбора пары промоторов для дальнейшей экспериментальной проверки *in vivo*.

**Ключевые слова:** *промотор, рис, геном, Oryza Sativa, транскрипция*

Точная идентификация промоторных последовательностей остаётся серьёзной проблемой в биоинформатике, так как даже лучшие алгоритмы могут выдавать ложные, не отличимые от истинных, результаты. Исследуемые потенциальные промоторные последовательности, предоставленные в базе *Database of Potential promoter sequences*, были предсказаны с помощью алгоритма, основанного на множественных выравниваниях и математическом методе расчета статистически значимых классов промоторных последовательностей. Дальнейшее более детальное изучение потенциальных промоторных областей должно проводиться комплексно на основании их свойств, таких как: наличие транскрипции,

возможности связывания транскрипционных факторов, метилирования ДНК и наличие специфических гистоновых меток.

В данной работе был проведён анализ 126 потенциальных промоторных последовательностей 1-й хромосомы риса *Oryza Sativa* на наличие за ними транскрипции путём поиска ближайших аннотированных транскриптов в пределах 5000 пар оснований в направлении 3' (*downstream*) с помощью *bedtools closest*. В результате поиска было выявлено, что за 36 потенциальными промоторами в пределах 5000 нуклеотидов на той же цепи находятся аннотированные транскрипты, что косвенно подтверждает роль этих последовательностей, как промоторов. За остальными 90 предсказанными промоторами транскрипции в пределах выше указанного расстояния обнаружено не было, из чего можно предположить, что за этими промоторами может происходить транскрипция ещё не аннотированных последовательностей (на момент аннотации генома риса 17 ноября 2021 года), либо эти последовательности могут являться другими регуляторными элементами генома [3; 4].

Также был проведён сравнительный анализ расстояний до ближайших аннотированных транскриптов исследуемых промоторов с промоторами из базы данных PlantRegMap [5], выбранной по принципу наличия файла с последовательностями всех предсказанных промоторов нужного генома. В ходе сравнения было выявлено, что из 126 исследуемых потенциальных промоторов 15 располагаются к известным транскриптам ближе, чем аннотированные промоторы из базы данных PlantRegMap. Из этих 15 пар промоторов 7 пар находятся на достаточно большом расстоянии друг от друга (расстояние от исследуемых промоторов до промоторов из аннотации PlantRegMap составляет от ~3000 до ~22000 нуклеотидов), что делает возможным проведение экспериментальной проверки *in vitro* и *in vivo*; 3 пары промоторов располагаются перед не белок-кодирующими генами, у 3 пар гены и белковые продукты не достаточно хорошо охарактеризованы. Для дальнейшего анализа выбрана пара промоторов, за которыми располагается хорошо охарактеризованный ген *Nek5* (*OsNek5*) – серин/треонин протеинкиназа.

### Литература

1. RegSite Database of Potential promoter sequences. Available online: <http://victoria.biengi.ac.ru/cgi-bin/dbPPS/index.cgi?orgChr=or-sa-chr1;recordIDFrom=;recordIDTo=;segmentFrom=;segmentTo=;matrFrom=;matrTo=;signFrom=;signTo=;fmaxFrom=;fmaxTo=;matrNum=;strDNA=;te=21960;pg=1>.

2. Korotkov E.V. et al. Mathematical Algorithm for Identification of Eukaryotic Promoter Sequences // *Symmetry*. – 2021. – Vol. 13 (6). – P. 917.
3. Andersson R., Sandelin A. Determinants of enhancer and promoter activities of regulatory elements // *Nature Reviews Genetics*. – 2020. – Vol. 21 (2). – P. 71-87.
4. Dao L.T.M., Spicuglia S. Transcriptional regulation by promoters with enhancer function // *Transcription*. – 2018. – Vol. 9 (5). – P. 307-314.
5. Tian F. et al. PlantRegMap: charting functional regulatory maps in plants // *Nucleic Acids Research*. – 2020. – Vol. 48 (D1). – P. D1104-D1113.

**Bubnova Anastasiya Nikolaevna**  
**RESEARCH CENTER OF BIOTECHNOLOGY RAS**

**C EVALUATION AND SELECTION OF POTENTIALLY NEW  
PROMOTER SEQUENCES IN THE GENOME OF RICE *Oryza Sativa*  
FROM THE DATABASE OF POTENTIAL PROMOTERS  
FOR SUBSEQUENT EXPERIMENTAL VERIFICATION**

**Abstract**

The sequences from the 1<sup>st</sup> chromosome of the rice genome *Oryza Sativa* from the Database of potential promoter sequences [1] predicted as promoters with aid of mathematical method “prediction of sequences based on multiple alignments” [2] were studied in this work. The predicted promoter elements were tested for the presence of downstream transcription. A comparative analysis of the distances to the nearest transcripts between promoters from Database of potential promoter sequences and promoters from other database was also carried out in order to select pairs of promoters for subsequent verification *in vivo*.

**Keywords:** promoter, rice, genome, *Oryza Sativa*, transcription

**Кулакова Анастасия Владимировна**

аспирант ФИЦ Биотехнологии РАН 1 года обучения

профиль 1.5.6. Биотехнология

e-mail: kulakova\_97@mail.ru

Научный руководитель

**Кочиева Елена Зауровна**

доктор биологических наук, профессор,

зав. лабораторией системной биологии растений



## **СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА НОВЫХ ГЕНОВ-ГОМОЛОГОВ АЛЬФА- И БЕТА-АМИЛАЗ И ИХ ИНГИБИТОРОВ, ОПРЕДЕЛЯЮЩИХ УСТОЙЧИВОСТЬ КАРТОФЕЛЯ К ХОЛОДОВОМУ СТРЕССУ**

**Аннотация.** Важные хозяйственно-ценные признаки картофеля, такие как крахмалистость клубней и подверженность холодовому осахариванию, напрямую зависят от активности альфа- и бета-амилаз, а также их ингибиторов, поэтому представляется актуальным определение их последовательности и структурно-функциональной характеристики. Были впервые получены полногеномные последовательности гомологов гена ингибитора амилаз AI у образцов 12 видов картофеля секции *Petota*, которые были депонированы в генбанк NCBI. Также был определен профиль экспрессии генов-гомологов ингибитора амилаз AI в различных органах образцов видов картофеля *S. tuberosum* (сорт «Надежда»), *S. rybinii*, *S. chacoense* и *S. kurtzianum*, отличающихся уровнем холодоустойчивости. Показано, что в вегетативных частях растений (стебель, лист, корень) а также в бутоне и цветке наблюдался низкий уровень транскрипции гена AI, тогда как в клубнях уровень экспрессии резко увеличивался. Полученные результаты, однако, не выявили корреляции непосредственно между уровнем экспрессии гена ингибитора амилаз в листьях и холодоустойчивостью. Анализ экспрессионного паттерна гена альфа-амилазы *StAmy23* в различных (фотосинтезирующих и нефотосинтезирующих) органах трех сортов картофеля, различающихся содержанием крахмала в клубнях, позволил обнаружить положительную корреляцию между уровнем транскрипции *StAmy23* и содержанием крахмала.

**Ключевые слова:** виды и сорта картофеля, холодостресс, распад крахмала,  $\alpha$ -амилаза, ингибитор амилаз

Крахмал является основной формой хранения углерода в растениях и основным компонентом во многих запасающих органах растений [1]. Содержание крахмала определяет основу питательной и технологической ценности клубней такой важной сельскохозяйственной культуры как картофель (*Solanum tuberosum* L.) [2;3]. Процесс биосинтеза крахмала, начиная с образования моносахаридных субстратов до формирования крахмального зерна, включает множество реакций и требует координированной работы большого числа ферментов. Наиболее важные хозяйственно-ценные признаки картофеля, такие как крахмалистость клубней и подверженность холодовому осахариванию, напрямую зависят от активности альфа- и бета-амилаз, а также ингибиторов амилаз, которые напрямую контролируют распад крахмала [4;5]. Изучение возможных корреляций вариабельности генов амилаз и их ингибиторов с холодостойкостью видов и сортов картофеля позволит уточнить регуляцию метаболизма крахмала в процессе развития растения и его реакции на стресс [6]. Несмотря на значимость этих ферментов для углеводного обмена в клубнях и их участии в холодовом осахаривании на сегодняшний день, эти гены (полногеномные последовательности, структура, полиморфизм, экспрессия в различных органах и тканях) у видов и сортов картофеля либо не описаны, либо описаны только для нескольких сортов.

В связи с этим представляется актуальным определение последовательности и структурно-функциональная характеристика новых генов-гомологов альфа- и бета-амилаз и их ингибиторов для определения аллельного разнообразия этих генов у широкого круга образцов дикорастущих видов, сортов и селекционных линий картофеля и выявления возможных аллельных вариантов, сцепленных с хозяйственно-ценными признаками, а также для определения роли этих генов в формировании признака холодоустойчивости у картофеля.

Целью диссертационной работы станет идентификация и структурно-функциональная характеристика генов, влияющих на состав углеводов (крахмала и редуцирующих сахаров) в клубнях видов и сортов картофеля и устойчивость клубней к пониженным температурам.

Целью первого года была биохимическая характеристика сортов (содержание крахмала и сахаров в листьях и клубнях), а также идентификация и структурно-функциональный анализ генов биосинтеза и распада крахмала альфа-амилазы *Amy23* и ингибитора амилаз *AI* в фотосинтезирующих и нефотосинтезирующих органах у 36 сортов и 12 диких видов картофеля.

Начаты работы по биохимическому анализу пяти сортов картофеля, различающихся по содержанию крахмала (Барин, Надежда, Красавчик, Северное Сияние, Утро) в нормальных условиях и в условиях длительного холодного стресса (хранение при +40С в течение 8 месяцев). На первом этапе работы выявлена зависимость падения количества содержания крахмала и редуцирующих сахаров к шестому месяцу (февраль) хранения, по сравнению с изначальными показателями (сентябрь). В дальнейшем, после получения образцов сортов к восьмому месяцу хранения (апрель), удастся провести полный биохимический анализ содержания углеводов в клубне при длительном холодном стрессе.

Была проведена идентификация полногеномных последовательностей гомологов гена ингибитора амилаз *AI* у 12 видов картофеля секции *Petota*, включающие как культивируемый вид *S. tuberosum* (10 сортов), так и дикорастущие виды, используемые в селекции сортов. Полученные последовательности были депонированы в генбанк NCBI. Были охарактеризованы их структуры, аллельные варианты и аминокислотный полиморфизм кодируемых белков. Всего для анализируемых генов-гомологов *AI* было выявлено 36 аллельных вариантов гена и 31 вариант белка.

Впервые определен профиль экспрессии генов-гомологов ингибитора амилаз *AI* в различных органах образцов видов картофеля *S. tuberosum*, *S. rybinii*, *S. chacoense* и *S. kurtzianum*, отличающихся уровнем холодоустойчивости. Показано, что в вегетативных частях растений (стебель, лист, корень) а также в бутоне и цветке наблюдался низкий уровень транскрипции гена *AI*, тогда как в клубнях уровень экспрессии резко увеличивался. Полученные результаты, однако, не выявили корреляции непосредственно между уровнем экспрессии гена *AI* в листьях и холодоустойчивостью.

Также был определен уровень экспрессии гена альфа-амилазы *StAmy23* у сортов Сатурна, Барин, Гала, различающихся содержанием крахмала в шести различных органах растений картофеля: плодах, стеблях, листьях, столонах, корнях и клубнях (мякоть и кожура). Было показано, что уровень экспрессии *StAmy23* в клубнях значительно превышал уровень экспрессии в листьях. Уровень транскрипции *StAmy23* в корнях и столонах был аналогичен экспрессии в клубнях, либо значительно превышал. Также относительно высокая экспрессия наблюдалась в фотосинтезирующих стеблях и плодах. Выявлена положительная корреляция между уровнем транскрипции *StAmy23* и содержанием крахмала в клубнях.

**Основные выводы.** В первый год обучения в аспирантуре были начаты работы по биохимическому анализу пяти сортов картофеля в нормальных условиях и в условиях длительного холодового стресса. Получены последовательности гомологов гена ингибитора амилаз *AI* у 12 видов и 10 сортов картофеля и депонированы в генбанк NCBI. Также, в различных органах четырех видов картофеля был впервые определен профиль экспрессии генов-гомологов ингибитора амилаз *AI*. Впервые определен профиль экспрессии генов-гомологов ингибитора амилаз *AI* в различных органах образцов видов картофеля, а также гена альфа-амилазы *StAmy23* в шести различных органах четырех сортов растений картофеля.

### Литература

1. Li Ch., Huang Y., Huang R., Wu Y., Wang W. The genetic architecture of amylose biosynthesis in maize kernel // *Plant Biotechnology Journal*. – 2018. – Vol. 1 (2). – P. 688-695.
2. Camire M.E., Kubow S., Donnelly D.J. Potatoes and human health // *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. – 2009. – Vol. 49 (10). P. 823-840.
3. Robertson T.R., Alzaabi A.Z., Robertson M.D., Fielding B.A. Starchy carbohydrates in a healthy diet: the role of the humble potato // *Nutrients*. – 2018. – Vol.10 (11). – P. 1764.
4. Preiss J. Regulation of the biosynthesis and degradation of starch // *Annual Review of Plant Biology*. – 1982. – Vol 33 (1). – P. 431-454.
5. Solomos T., Mattoo A.K. Starch-sugar metabolism in potato (*Solanum tuberosum* L.) tubers in response to temperature variations. In: *Genetic improvement of Solanaceous crops* / M.K. Razdan, A.K. Mattoo (eds.). // Science Publishers, Plymouth. – 2005.
6. Wu A.C., Ral J-P., Morell M.K., Gilbert R.G. New perspectives on the role of a-and b-amylases in transient starch synthesis // *PLoS ONE*. – 2014 – Vol. 9 (6). – P. e100498.

### Список публикаций по теме работы

#### Статьи

1. Дьяченко Е.А., Кулакова А.В., Мелешин А.А., Щенникова А.В., Кочиева Е.З. Ингибитор амилаз *SBAI* видов картофеля: варибельность структуры и профиля экспрессии // *ГЕНЕТИКА*. – 2021. – Т. 57. – № 1. – С. 44-55.
2. Кулакова А.В., Мелешин А.А., Щенникова А.В., Кочиева Е.З. Экспрессия гена  $\alpha$ -амилазы *StAmy23* в фотосинтезирующих и нефотосинтезирующих тканях растений сортов картофеля *Solanum tuberosum* L. // *Сельскохозяйственная биология*. – 2021. – Т. 56. – № 5, С. 899-909.



3. Дьяченко Е.А., Кулакова А.В., Щенникова А.В., Кочиева Е.З. Вариабельность генома отечественных сортов картофеля: данные NBS-маркирования // Сельскохозяйственная биология. – 2021. – Т. 56. – № 1. – С. 32-43.
4. Дьяченко Е.А., Кулакова А.В., Щенникова А.В., Кочиева Е.З. Вариабельность генома отечественных сортов картофеля: данные AFLP-анализа // Сельскохозяйственная биология. – 2020. – Т. 55, – № 3. – С. 499–509.

**Kulakova Anastasia Vladimirovna**  
**RESEARCH CENTRE OF BIOTECHNOLOGY RAS**

**STRUCTURAL AND FUNCTIONAL CHARACTERISTICS  
OF NEW GENES-HOMOLOGUES OF ALPHA- AND BETA-AMYLASES  
AND THEIR INHIBITORS THAT DETERMINE THE RESISTANCE  
OF POTATOES TO COLD STRESS**

**Abstract**

Important traits of potatoe, such as starch content and susceptibility to cold-induced sweetening, directly depend on the activity of alpha- and beta-amylases, as well as their inhibitors. For the first time, in 12 potato species sequences of amylase inhibitor (*AI*) homologues were obtained, characterized and deposited in the NCBI gene bank. Also the expression pattern of *AI* was determined in various tissue among potato species *S. tuberosum* (variety Nadezhda), *S. rybinii*, *S. chacoense*, and *S. kurtzianum*, which were differ in the level to cold tolerance. It was shown that in the vegetative parts of plants (stem, leaf, root), as well as in the bud and flower the *AI* expression showed a lower level, while in tubers *AI* expression level increased sharply. The obtained results, however, did not reveal a direct correlation between the expression level of *AI* in leaves and cold tolerance. The analysis of alpha-amylase *StAmy23* expression pattern in various (photosynthetic and non-photosynthetic) tissues of three potato cultivars with different starch content in tubers showed a positive correlation between the level of *StAmy23* transcription and starch content.

**Keywords:** types and varieties of potatoes, cold stress, starch degradation,  $\alpha$ -amylase, amylase inhibitor

**Тимофеева Татьяна Алексеевна**

*аспирант ФИЦ Биотехнологии РАН 1 года обучения*

*профиль 1.5.6. Биотехнология*

*e-mail: timofeyka2033@mail.ru*

Научный руководитель

**Варламов Валерий Петрович**

*доктор химических наук, профессор,*

*зав. лабораторией инженерии биополимеров*



## **ИЗУЧЕНИЕ АКТИВНОСТИ ГИДРОЛИЗАТА ХИТОЗАНА В ОТНОШЕНИИ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ, УЧАСТВУЮЩИХ В СТРЕССОВЫХ РЕАКЦИЯХ У ТОМАТА**

**Аннотация.** *Фунгицидная и антибактериальная активность хитозана вместе с его биологической безопасностью создают нишу для применения хитозана в агрономии. Было показано, что хитозан также действует как элиситор и стимулятор роста растений. В работе представлены результаты воздействия низкомолекулярного гидролизата хитозана (НГХ) на экспрессию некоторых генов томатов сортов Черри и Лель через 30 минут, 24 и 48 часов. Обработка проростков НГХ снижает экспрессию ААОЗ и АМІІ. Активность МУС2 повышается через 30 минут после обработки, снижаясь со временем. Экспрессия РLТ2 снижается через 24 часа, активность восстанавливается только для томата Черри. Экспрессия WOX5 через 48 часов после внесения НГХ повышается в 2,7 раз для Черри и в 9,5 раз для Лель.*

**Ключевые слова:** *гидролизат хитозана, томат, Solanum lycopersicum, экспрессия гена, фитогормоны, покоящийся центр*

Спектр биологической активности хитозана и его олигомеров широк, но всё еще не полностью изучен. В области сельского хозяйства этот полимер привлекает внимание в связи с выявлением его фунгицидных свойств [1], а также проявлением антибактериальной и противовирусной активности [2; 3]. Обработка растений хитозаном и изучение механизмов его действия показали, что хитозан не только подавляет активность патогенов, но и действует как активатор защитных механизмов самого растения, усиливая его способность противостоять заражению [4]. Хитозан может действовать как стимулятор роста растения [5].

В работе использовался низкомолекулярный гидролизат хитозана (НГХ) со средней молекулярной массой 33 кДа (индекс полидисперсности =

2,1), степень дезацетилирования 95%, концентрация исходного раствора 10 мг/мл, рН 5,1. Гидролизат хитозана был получен путем химической деполимеризации высокомолекулярного хитозана азотной кислотой [6]. Изучалось влияние низкомолекулярного гидролизата хитозана на экспрессию генов, участвующих в путях биосинтеза фитогормонов, и факторов транскрипции покоящегося центра в корнях *Solanum lycopersicum* сортов Черри и Лель. Предыдущие исследования показали, что НГХ действует как стимулятор роста для томатов, способствуя увеличению длины проростков томата после замачивания семян в растворе гидролизата хитозана [7]. Также низкомолекулярный гидролизат хитозана проявлял фунгицидную активность против грибов-возбудителей болезней томата: *Botrytis cinerea*, *Alternaria solani*, *Fusarium solani*. Обработка томата сорта Черри НГХ снижала пораженность растений фузариозом, а обработка плодов снижала их пораженность серой гнилью [8].

Для исследования были выбраны следующие гены: ААО3, АМ11, МУС 2, РЛТ2, ВОХ5. В качестве референсного гена был выбран EF1 $\beta$ 2. Для всех генов были подобраны праймеры и условия для проведения полимеразной цепной реакции в реальном времени. Семена томата сортов Черри и Лель проращивали в чашках Петри на фильтровальной бумаге, смоченной дистиллированной водой [7]. Эксперимент проводили на восьмидневных проростках. В чашку Петри добавлял НГХ в концентрации 2 мг/мл. Корни на анализ собирали через 30 минут, 24 часа и 48 часов. Образцы ткани измельчали в жидком азоте для выделения суммарной РНК (extractRNA). Обработывали ДНКазой для удаления геномной ДНК (QIAGEN). Очищали на колонках (CleanRNA Standard). После измерения концентрации с помощью спектрофотометра (Eppendorf BioSpectrometer) использовали полученную РНК для получения кДНК методом обратной транскрипции. qRT-PCR проводили на CFX96 Real-time System BioRad Laboratories.

Данные экспрессии генов были статистически проанализированы с помощью Microsoft office Excel [9]. Результаты выражали как среднее  $\pm$  стандартное отклонение из трех технических и трех биологических повторностей для каждого варианта опыта. Результаты образцов, обработанных водой, использовали в качестве эталонных значений экспрессии по сравнению со всеми другими образцами.

Ген ААО3 кодирует абсцизовую альдегидоксидазу, катализирующую последнюю стадию биосинтеза абсцизовой кислоты [10]. При обработке проростков томата экспрессия ААО3 в корнях незначительно снижается через 30 минут (Рис. 1). МУС2 является положительным фактором транскрипции в сигнальном пути жасмоновой кислоты [11]. В корнях томата

сорта Черри экспрессия этого гена возрастала в 1,6 раз через 30 минут после обработки НГХ, опускаясь ниже контрольных значений при экспозиции 24 и 48 часов. У томата сорта Лель через 30 минут экспрессия МУС2 возрастала в 2,9 раз, и опускалась до контрольных значений только при экспозиции в 48 часов (Рис. 2).

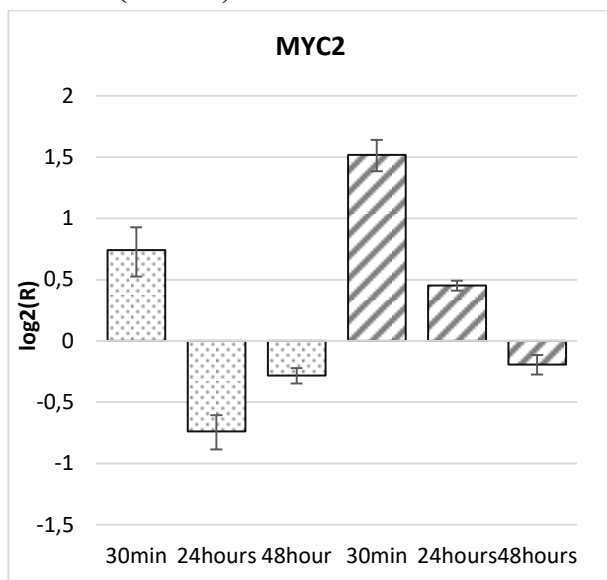


Рис. 1. Относительный коэффициент экспрессии гена ААО3 при различной экспозиции НГХ в корнях томатов сорта Черри (слева) и сорта Лель (справа)

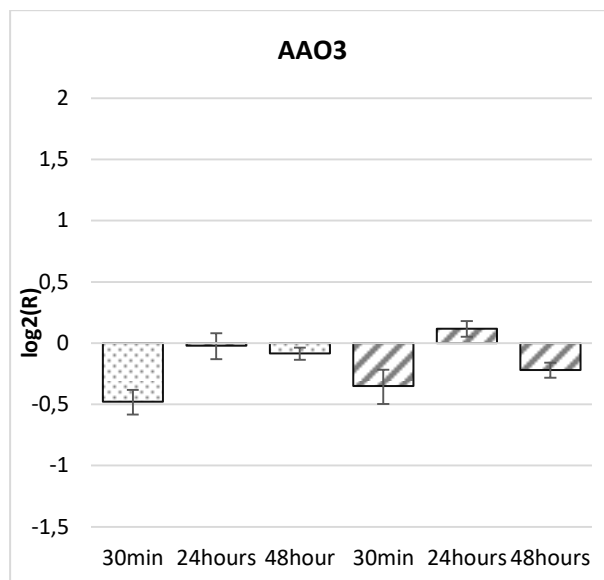


Рис. 2. Относительный коэффициент экспрессии гена МУС2 при различной экспозиции НГХ в корнях томатов сорта Черри (слева) и сорта Лель (справа)

АМІ1 кодирует амидаза-подобный белок, который участвует в пути биосинтеза индолил-уксусной кислоты [12]. Экспрессия АМІ1 в корнях обоих сортов томата незначительно снижалась, достигая самых низких значений через 24 часа после добавления раствора НГХ (Рис. 3).

PLT2 – фактор транскрипции, необходимый для спецификации покоящегося центра (QC) и активности стволовых клеток корней растения. PLT2 транскрибируется в ответ на накопление ауксина и зависит от факторов транскрипции ауксинового ответа. Экспрессия этого гена снижается в присутствии гидролизата хитозана, однако в образцах сорта Черри через 48 часов уровень экспрессии восстанавливается до уровня контроля, а у сорта Лель остается сниженным в 1,5 раза (Рис. 4).

WOX5 – фактор транскрипции, который также участвует в спецификации и поддержании стволовых клеток покоящегося центра апикальной меристемы корня [13]. Экспрессия WOX5 в присутствии НГХ повышалась в 2,7 раз через 48 часов для корней томата сорта Черри и в 9,5 раз для сорта Лель (Рис. 5).

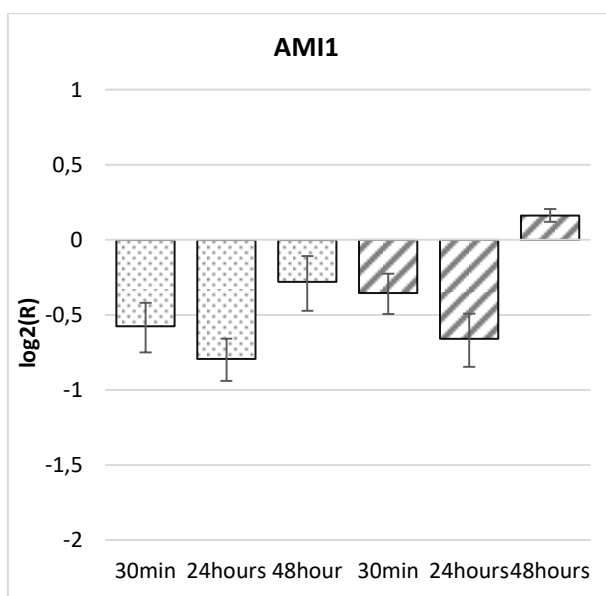


Рис. 3. Относительный коэффициент экспрессии гена AMI1 при различной экспозиции НГХ в корнях томатов сорта Черри (слева) и сорта Лель (справа)

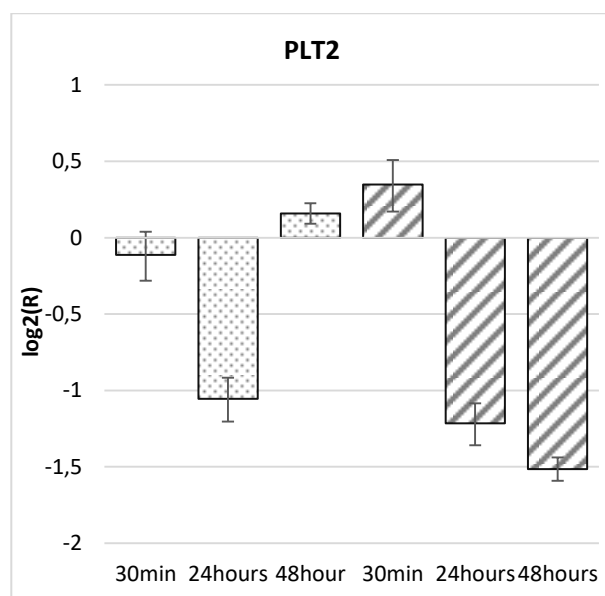


Рис. 4. Относительный коэффициент экспрессии гена PLT2 при различной экспозиции НГХ в корнях томатов сорта Черри (слева) и сорта Лель (справа)

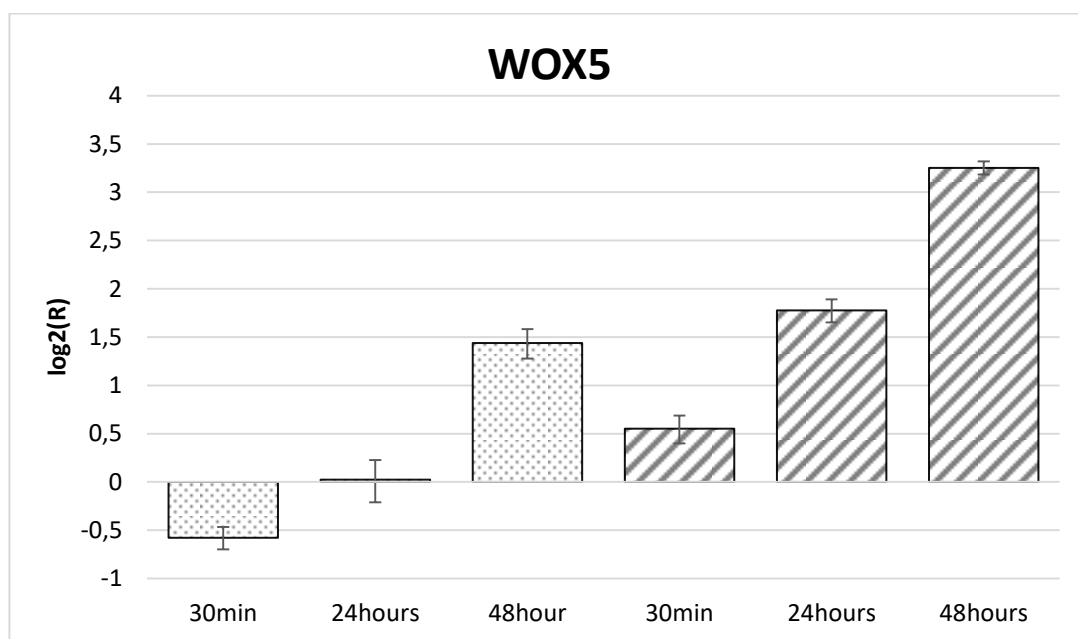


Рис. 5. Относительный коэффициент экспрессии гена WOX5 при различной экспозиции НГХ в корнях томатов сорта Черри (слева) и сорта Лель (справа)

**Основные выводы.** Низкомолекулярный гидролизат хитозана стимулирует активность покоящегося центра апикальной меристемы корней томата, не затрагивая при этом пути биосинтеза ауксина и абсцизовой кислоты. Внесение гидролизата хитозана запускает также сигнальный путь жасмоновой кислоты, однако его влияние нивелируется при длительной экспозиции. Стоит отметить, что эффект от внесения низкомолекулярного гидролизата хитозана отличается у сортов томата Черри и Лель.

## Литература

1. Allan C.R., Hadwiger L.A. The fungicidal effect of chitosan on fungi of varying cell wall composition // *Experimental mycology*. – 1979. – Vol. 3 (3). – P. 285-287.
2. Bautista-Baños S. et al. Chitosan as a potential natural compound to control pre and postharvest diseases of horticultural commodities // *Crop protection*. – 2006. – Vol. 25 (2). – P. 108-118.
3. Iriti M., Varoni E.M. Chitosan-induced antiviral activity and innate immunity in plants // *Environmental Science and Pollution Research*. – 2015. – Vol. 22 (4). – P. 2935-2944.
4. Katiyar D., Hemantaranjan A., Singh B. Chitosan as a promising natural compound to enhance potential physiological responses in plant: a review // *Indian Journal of Plant Physiology*. – 2015. – Vol. 20 (1). – P. 1-9.
5. Pichyangkura R., Chadchawan S. Biostimulant activity of chitosan in horticulture // *Scientia Horticulturae*. – 2015. – Vol. 196. – P. 49-65.
6. Varlamov V.P. et al. Chitin/chitosan and its derivatives: fundamental problems and practical approaches // *Biochemistry (Moscow)*. – 2020. – Vol. 85 (1). – P. 154-176.
7. Timofeeva T. et al. The Effect of Chitosan Hydrolysate on *Solanum Lycopersicum* Plant Growth // *KnE Life Sciences*. – 2022. – P. 435-442.
8. Timofeeva T.A. et al. Low molecular weight chitosan hydrolyzate inhibits the growth of some phytopathogenic Ascomycota fungi // *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*. – IOP Publishing, 2021. – Vol. 839 (4). – P. 042027.
9. Pfaffl M.W. Relative quantification // *Real-time PCR*. – Taylor & Francis, 2007. – P. 89-108.
10. Seo M. et al. The *Arabidopsis* aldehyde oxidase 3 (AAO3) gene product catalyzes the final step in abscisic acid biosynthesis in leaves // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2000. – Vol. 97 (23). – P. 12908-12913.
11. Du M. et al. MYC2 orchestrates a hierarchical transcriptional cascade that regulates jasmonate-mediated plant immunity in tomato // *The Plant Cell*. – 2017. – Vol. 29 (8). – P. 1883-1906.
12. Pollmann S. et al. Subcellular localization and tissue specific expression of amidase 1 from *Arabidopsis thaliana* // *Planta*. – 2006. – Vol. 224 (6). – P. 1241-1253.
13. Lopez-Moya F. et al. Induction of auxin biosynthesis and WOX5 repression mediate changes in root development in *Arabidopsis* exposed to chitosan // *Scientific reports*. – 2017. – Vol. 7 (1). – P. 1-14.

## Список публикаций по теме работы

### Статьи

1. Timofeeva T. et al. The Effect of Chitosan Hydrolysate on *Solanum Lycopersicum* Plant Growth // *KnE Life Sciences*. – 2022. – P. 435-442.
2. Timofeeva T. A. et al. Low molecular weight chitosan hydrolyzate inhibits the growth of some phytopathogenic Ascomycota fungi // *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*. – IOP Publishing. – 2021. – Vol. 839 (4). – P. 042027.

### Тезисы докладов

1. Timofeeva T., Shagdarova B., Zakurin A. Effect of chitosan hydrolysate on tomato seed germination and seedling growth // *FEBS Open Bio*. – 2021. – Vol. 11 (S1). – P. 290. (постерный доклад)
2. Тимофеева Т.А., Штанько Д.А., Закурин А.О. Изучение влияния гидролизата хитозана на развитие проростков *Solanum lycopersicum* // Сборник тезисов докладов конференции молодых ученых «Биотехнология в растениеводстве, животноводстве и сельскохозяйственной микробиологии» – Москва, 2020, – С. 187-188 (устный доклад)

## TIMOFEEVA TATIANA ALEXEEVNA RESEARCH CENTER OF BIOTECHNOLOGY RAS

### THE EFFECT OF CHITOSAN HYDROLYSATE ON TOMATO GENES EXPRESSION INVOLVED IN STRESS RESPONSES

#### Abstract

The fungicidal and antibacterial activity of chitosan and its biological safety creates an opportunity for the chitosan application in agronomy. Chitosan has been shown to act as an elicitor and plant growth inductor. The paper presents the effect of low molecular weight chitosan hydrolyzate (LCH) on the expression of some genes of tomato varieties Cherry and Lel after 30 minutes, 24 and 48 hours. Treatment of seedlings with LCH reduces the expression of AAO3 and AMI1. MYC2 activity rises 30 minutes after treatment and decreases over time. PLT2 expression decreases after 24 hours, activity is normalized only for Cherry tomato. The expression of WOX5 48 hours after the introduction of LCH increased by 2.7 times for Cherry and 9.5 times for Lel.

**Keywords:** Chitosan hydrolyzate, tomato, *Solanum lycopersicum*, gene expression, phytohormones, quiescent center

**Нежданова Анна Владимировна**

аспирант ФИЦ Биотехнологии РАН 2 года обучения

профиль 1.5.6. Биотехнология

e-mail: [anna-negdanova@mail.ru](mailto:anna-negdanova@mail.ru)

Научный руководитель

**Щенникова Анна Владимировна**

кандидат химических наук,

с.н.с. лаборатории системной биологии растений



## **CRISPR/CAS9 РЕДАКТИРОВАНИЕ ГЕНА *PHO1A* КРАХМАЛФОСФОРИЛАЗЫ КАРТОФЕЛЯ ИЗМЕНЯЕТ МЕТАБОЛИЗМ КРАХМАЛА**

**Аннотация.** Проведен функциональный анализ гена *PHO1a*, кодирующего один из ключевых ферментов метаболизма крахмала, путем получения и характеристики растений картофеля с редактированным геномом. Сконструирована CRISPR/Cas9-плазмида, несущая gRNA для изменения гена *PHO1a*. С ее использованием проведена агробактериальная трансформация пяти сортов картофеля с различной чувствительностью к холодному осахариванию клубней. Получены независимые линии картофеля с мутацией в кодирующей последовательности *PHO1a*. Растения характеризуются изменениями в гравитропизме корней, развитии надземной части, метаболизме крахмала и ответе на холодовый стресс.

**Ключевые слова:** геномное редактирование, CRISPR/Cas9, *Solanum tuberosum*, крахмалфосфорилаза *PHO1a*, метаболизм крахмала

Технология направленного редактирования генома с помощью системы CRISPR/Cas9 активно используется для получения растений с измененными признаками [1]. Крахмалфосфорилаза *PHO1a* – один из ключевых ферментов метаболизма крахмала [2]. Цель исследования – функциональный анализ гена *PHO1a* путем получения и характеристики растений картофеля с измененной (с использованием CRISPR/Cas9) последовательностью гена. Анализ гена *PHO1a* с помощью программ CRISPRdirect [3] и CRISPR MultiTargeter [4] определил консервативный участок последовательности, пригодный в качестве гидовой РНК [5]. Получена CRISPR/Cas9-конструкция на основе бинарного вектора pYLCRISPR/Cas9P35S-N (Addgene #66191) и челночного вектора pUC119-gRNA (Addgene #52255). Кассета gRNA для гена *PHO1a* находится под контролем промотора *AtU6-1*. Получен штамм агробактерии, несущий плазмиду pYLCRISPR-*PHO1a*-gRNA и проведена трансформация



стеблевых эксплантов пяти сортов картофеля (Red Scarlett, Мишка, Люкс, Жуковский и Терра) с различной чувствительностью к холодовому осахариванию клубней. Селекция регенерантов на среде с канамицином (50 мг/л) выявила 233 канамицин-устойчивых регенеранта, которые были дополнительно проанализированы с помощью ПЦР на присутствие кассеты gRNA в геноме. В результате получено 40 независимых линий (Red Scarlett – 1, Мишка – 6, Люкс – 17, Жуковский – 5; и Терра – 11). Секвенирование участка редактирования обнаружило несинонимичную замену G1→T1 (координаты в редактируемом участке) в двух аллелях из четырех, которая привела к радикальному замещению G261V в белковой последовательности функционального домена GT35\_Glycogen\_Phosphorylase domain. В сравнении с контролем (исходными образцами сортов) мутантные линии характеризовались нарушениями гравитропизма корней и развития надземной части растений, а также и содержанием крахмала в корнях и листьях. Воздействие холодового стресса по-разному влияло на содержание крахмала и экспрессию генов распада крахмала у растений дикого типа и мутантных растений.

#### **Основные выводы:**

1. Внесение замены G1→T1, соответствующей замещению G261V, в последовательность гена *PHO1a* сопровождается изменением содержания крахмала, а также уровня экспрессии гена *PHO1a* и генов гидролиза крахмала – *VAM1* и *VAM9*, в том числе, в ответ на холод.
2. Радикальная мутация G261V в последовательности *PHO1a* может изменять активность крахмалфосфорилазы и, как следствие, работу других ферментов катаболизма крахмала, как в нормальных условиях, так и при воздействии холода.

#### **Литература**

1. Arora L., Narula A. Gene editing and crop improvement using CRISPR/Cas9 system // Front Plant Sci. – 2017. – Vol. 8. – P. 1932.
2. Slugina MA, et al. The expression pattern of the *Pho1a* genes encoding plastidic starch phosphorylase correlates with the degradation of starch during fruit ripening in green-fruited and red-fruited tomato species // Functional Plant Biology. – 2019. – Vol. 46 (12). – P. 1146-1157.
3. Naito Y., Hino K., Bono H., Ui-Tei K. CRISPRdirect: software for designing CRISPR/Cas guide RNA with reduced off-target sites // Bioinformatics. – 2015. – Vol. 31 (7). – P. 1120-1123.

4. Prykhozhij S.V., Rajan V., Gaston D., Berman J.N. CRISPR multitargeter: a web tool to find common and unique CRISPR single guide RNA targets in a set of similar sequences // PLoS One. – 2015. – Vol. 10 (3). – P. e0119372.
5. Ma X., Zhang Q., Zhu Q., Liu W., Chen Y., Qiu R., Wang B., Yang Z., Li H., Lin Y., Xie Y., Shen R., Chen S., Wang Z., Chen Y., Guo J., Chen L., Zhao X., Dong Z., Liu Y. G. A robust CRISPR/Cas9 system for convenient, high-efficiency multiplex genome editing in monocot and dicot plants // Molecular plant. – 2015. – Vol. 8 (8). – P. 1274-1284.

### Список публикаций по теме работы

#### Статьи

1. Щенникова А.В., Камионская А.М., Нежданова А.В., Гаврилова К.С., Филюшин М.А., Кочиева Е.З., Скрыбин К.Г. Факторы транскрипции MhyFIL1 и MhyFIL3 (*Monotropa hypopitys*) определяют асимметричное развитие боковых органов надземной части растения // Вавиловский журнал генетики и селекции. – 2019. – Т. 23. – № 4. – С. 405-411.
2. Korotkov E.V. et al. Mathematical Algorithm for Identification of Eukaryotic Promoter Sequences // Symmetry. – 2021. – Т. 13. – № 6. – С. 917.
3. Timofeeva T. A. et al. Low molecular weight chitosan hydrolyzate inhibits the growth of some phytopathogenic Ascomycota fungi // IOP Conference Series: Earth and Environmental Science. – 2021. – Т. 839. – № 4. – С. 042027.
4. Нежданова А.В., Щенникова А.В. Факторы транскрипции семейства MADS растений: связь с признаками доместикации и перспективы для селекции (обзор) // Сельскохозяйственная биология. – 2021. – Т. 56. – № 5. – С. 823-842.
5. Нежданова А.В. и др. Структурно-функциональный анализ MADS-бокс гена SIMADS5 томата *Solanum lycopersicum* L. // Вавиловский журнал генетики и селекции. – 2021. – Т. 25. – № 5. – С. 492-501.

#### Тезисы докладов

1. Нежданова А.В., Камионская А.М., Щенникова А.В. Суперэкспрессия гена хризантемы CDM44 повышает устойчивость растений табака к пониженным температурам // Сборник тезисов конференции «Биотехнология: наука и практика». Актуальная биотехнология. – 2020. – № 3 (34). – С. 193-194. (постерный доклад)
2. Нежданова А.В., Камионская А.М., Слугина М.А., Кочиева Е.З., Эльдаров М.А., Щенникова А.В. Получение растений табака с редактированным геномом: оценка влияния выключения активности гена фитоен-десатуразы на развитие растения // Сборник тезисов конференции

- «Биотехнология: состояние и перспективы развития». – 2020. – С. 346-349. (постерный доклад)
3. Nezhdanova A.V. et al. Chrysanthemum SEP3-like gene CDM44 overexpression does not affect transgenic tobacco flowering, whereas enhances its tolerance to cold stress // FEBS OPEN BIO. – 111 RIVER ST, HOBOKEN 07030-5774, NJ USA: WILEY, – 2021. – Vol. 11. – P. 287-287. (постерный доклад)
4. Slugina M. et al. Constitutive expression of tomato TF LeMADS5 gene in tobacco plants alters flower morphology // FEBS OPEN BIO. – 111 RIVER ST, HOBOKEN 07030-5774, NJ USA: WILEY, – 2021. – Vol. 11. – P. 287-287. (постерный доклад)
5. Nezhdanova A.V. et al. Functional analysis of *Solanum lycopersicum* L. MADS-box gene *SIMADS5* // Plant Genetics, Genomics, Bioinformatics, and Biotechnology. – 2021. – С. 156-156. (постерный доклад)
6. Нежданова А.В. и др. Получение растений картофеля с редактированным геномом и измененным метаболизмом крахмала// сборник тезисов конференции «Биотехнология: состояние и перспективы развития». – 2021. – С. 363–365. (постерный доклад)
7. Нежданова А.В., Камионская А.М., Щенникова А.В. Идентификация и характеристика семейства генов MADS-box перца *Capsicum annuum* L. // сборник тезисов конференции «Биотехнология: наука и практика». Актуальная биотехнология. – 2021. – № 1 (35). – С. 87-90. (постерный доклад).
8. Нежданова А.В. Гены транскрипционных факторов MADS-box и YABBY и их роль в регуляции сельскохозяйственно ценных признаков: идентификация, характеристика и функциональный анализ // Сборник тезисов отчётной конференции аспирантов ФИЦ Биотехнологии РАН: направление подготовки 06.06.01 Биологические науки (21-25 июня 2021 г.) / под ред. В.О. Попова, А.Н. Фёдорова; сост. Е.С. Титова. – М.: ВАШ ФОРМАТ. – 2021. – С. 114-119.

### **Основные достижения**

1. Диплом за лучший доклад на ежегодной отчетной конференции аспирантов ФИЦ Биотехнологии РАН, 2021 г.
2. Лауреат стипендии Правительства Российской Федерации на 2022/2023 учебный год.

**Nezhdanova Anna Vladimirovna**  
**RESEARCH CENTER OF BIOTECHNOLOGY RAS**

**CRISPR/Cas9 EDITING OF POTATO STARCH PHOSPHORYLASE  
GENE *PHO1a* CHANGES STARCH METABOLISM**

**Abstract**

A functional analysis of the *PHO1a* gene, encoding one of the key enzymes of starch metabolism, was carried out by obtaining and characterizing genome-edited potato plants. A CRISPR/Cas9 plasmid carrying gRNA to modify the *PHO1a* gene was constructed. With its use, agrobacterial transformation of five potato varieties with different sensitivity to cold-induced sweetening of tubers was performed. Independent potato lines with a mutation in the *PHO1a* coding sequence were obtained. Plants are characterized by changes in root gravitropism, aerial part development, starch metabolism, and response to cold stress.

**Keywords:** genome editing, CRISPR/Cas9, *Solanum tuberosum*, starch phosphorylase PHO1a, starch metabolism

**Печенов Павел Юрьевич**

аспирант ФИЦ Биотехнологии РАН 3 года обучения

профиль 1.5.6. Биотехнология

e-mail: [peshenov.p@gmail.com](mailto:peshenov.p@gmail.com)

Научный руководитель

**Летаров Андрей Викторович**

доктор биологических наук,

зав. лабораторией вирусов микроорганизмов



## РАЗРАБОТКА ЭФФЕКТИВНОГО МЕТОДА РЕДАКТИРОВАНИЯ ГЕНОМА ПРОМЫШЛЕННО-ЦЕННЫХ МОЛОЧНОКИСЛЫХ БАКТЕРИЙ

**Аннотация.** Был разработан новый инструмент для редактирования генома лактококков, основанный на нуклеаза-дефективной CRISPR/Cas системе ассоциированной с транспозоном представленный на двух плаزمиде. Он позволяет быстро и точно редактировать геном *Lactococcus lactis* с целью инсерции больших участков ДНК. Для оптимизации экспрессии системы редактирования были протестированы варианты конститутивных промоторов, заменены сайты связывания рибосомы перед каждым из белков.

**Ключевые слова:** молочнокислые бактерии, редактирование генома, CRISPR/Cas

*Lactococcus. lactis* – один из важных и широко распространенных в промышленности микроорганизмов, использующийся в процессах производства пищевых продуктов и метаболитов. Благодаря своему малому геному (2.3 Мбаз) и успешному развитию методов генной инженерии для данного вида: экспрессионным кастомизируемым системам и клонированию, данный вид стал модельным организмом молочнокислых бактерий (МКБ). Таким образом необходимы различные подходы для генетической модификации, в том числе: точечных мутаций, делетирования и вставки целевых генов [1]. Развитие подходов к редактированию генома данного вида может обеспечить новые возможности в исследовании и перенаправлении биосинтетических путей в желаемую сторону, в улучшении понимания функционирования генов и усилении пробиотических свойств [2].

Мы адаптировали уже известную систему для редактирования генома *Escherichia coli*, в которой Tn7-подобный транспозон ассоциирован с нуклеаза-дефективной CRISPR/Cas системой, катализирующей РНК-

направляемую интеграцию мобильного генетического элемента в геном. Данная система организована в виде оперона, транскрибируемого в одну полицистронную мРНК, кодирующего семь белков TniQ, Cas8, Cas7, Cas6, TnsA, TnsB, TnsC. Интегрируемая область заключена между плечами транспозона и содержит ген устойчивости к хлорамфениколу без промоторной области [3].

С целью обеспечения эффективной экспрессии данной системы в *L. lactis* перед каждым из генов системы были заменены сайты связывания рибосомы. Для обеспечения эффективного редактирования мы создали варианты плазмид, эспрессирующих систему под контролем разных конститутивных промоторов и разное расположение локуса с которого происходит транскрипция направляющей РНК. Для получения плазмиды несущей мини-транспозон и селективный маркер для отбора интегрантов была собрана плаزمида pLcDonorU, несущая после ориджина репликация рAM-beta терминаторы trnBT1T2, мультиклонинг сайт, плечи транспозона и маркер резистентности к хлорамфениколу под контролем сайта связывания рибосомы, транслирующегося в молочнокислых бактериях, без промотора между сайтами lox66 и lox71 для его удаления после интеграции в геном Cre-рекомбиназой. Проверка работоспособности системы после всех изменений проводилась в культуре клеток *L. lactis* IL1403. Эффективность редактирования гена бета-галактозидазы составила  $5,6 \cdot 10^{-6}$  (Рис. 1)

С целью определения эффективности интеграции больших последовательностей была собрана плазмида pLcDonorU\_10kb путем клонирования в вектор pLcDonorU систем рестрикции-модификации и гена NoxE. В результате вставка для интеграции составила 10350 п.о. Эффективность редактирования данной конструкции составила (Рис. 1).

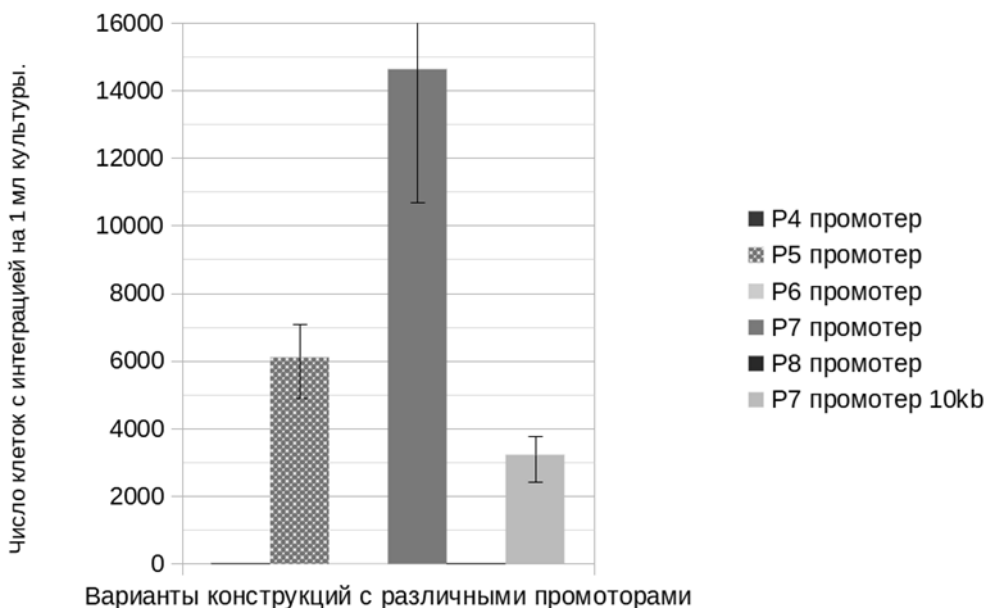


Рис. 1. Эффективность редактирования вариантами системы

В дальнейшем нами планируется создать кассету несущую системы защиты от бактериофагов для использования в защите промышленно-ценных штаммов *L. lactis* с получением культур без маркеров устойчивость к антибиотикам путем использования системы Cre/Lox.

**Основные выводы.** Для редактирования *L. lactis* адаптирована новая система редактирования генома на основе нуклеаза-дефективной CRISPR/Cas системе ассоциированной с транспозоном, в виде двухплазмидной системы. Наиболее эффективным для редактирования вариантом является клонирование системы под конститутивный промотор P7. При сепаратной экспрессии направляющей РНК редактирование в *L. lactis* не происходит.

### **Литература**

1. Börner R.A., Kandasamy V., Axelsen A., Nielsen A., Bosma E. Genome editing of lactic acid bacteria: opportunities for food, feed, pharma and biotech // FEMS Microbiology Letters. – 2019. – Vol. 366 (1) – P. 291.
2. Guo T., Xin Y., Zhang Y., Gu X., Kong J. A rapid and versatile tool for genomic engineering in *Lactococcus lactis* // Microbial Cell Factories. – 2019. – Vol. 18 (1) – P. 22.
3. Klompe S.E., Vo P.L.H., Halpin-Healy T.S. et al. Transposon-encoded CRISPR–Cas systems direct RNA-guided DNA integration // Nature. – 2019. – Vol. 571 – P. 219-225.

### **Список публикаций по теме работы**

#### *Тезисы докладов*

1. Печенов П.Ю. Гетерологичная экспрессия противофаговой системы BREX // Сборник тезисов отчётной конференции аспирантов ФИЦ Биотехнологии РАН: направление подготовки 06.06.01 Биологические науки (22-30 июня 2020 г.) / под редакцией В.О. Попова, А.Н. Фёдорова; сост. Е.С. Титова. – М.: МАКС Пресс. – 2020. – С. 105–108. (тезисы и устный доклад)
2. Печенов П.Ю. разработка эффективного метода редактирования генома промышленно-ценных молочнокислых бактерий // Сборник тезисов отчётной конференции аспирантов ФИЦ Биотехнологии РАН: направление подготовки 06.06.01 Биологические науки (21-25 июня 2021 г.) / под ред. В.О. Попова, А.Н. Фёдорова; сост. Е.С. Титова. – М.: ВАШ ФОРМАТ. – 2021. – С. 124-127. (тезисы и устный доклад)

**Pechenov Pavel Yurievich**  
**FEDERAL CENTRE OF BIOTECHNOLOGY RAS**

**DEVELOPMENT OF AN EFFECTIVE METHOD FOR GENOME  
EDITING OF INDUSTRIALLY VALUABLE LACTIC ACID BACTERIA**

**Abstract.**

The method is based on the transposon-associated CRISPR/Cas system. This approach can be an effective tool for introducing target genes into the genome of lactic acid bacteria (LAB). At present moment, we constructed a two plasmid genome editing system for *L. lactis*: carrying an operon adapted for the ribosome binding sites and the promoter region plasmid pLc\_P7INT\_nt, by studying the effects of different promoters, the efficiency of integration was optimized. Also was constructed a donor vector (pLcDonorU), containing a selective marker without the promoter region between two Cre-recombinase sites for its removing, as well as MCS for cloning cargo, flanked by the arms of the transposon.

**Keywords:** lactic acid bacteria, genome editing, CRISPR/Cas



**Синегубова Мария Валерьевна**

*аспирант ФИЦ Биотехнологии РАН 4 года обучения*

*профиль 1.5.6. Биотехнология*

*e-mail: mvsineg@gmail.com*

Научный руководитель

**Воробьев Иван Иванович**

*доктор биологических наук,*

*зав. лабораторией биоинженерии клеток млекопитающих*



## **ПОЛУЧЕНИЕ КЛЕТОЧНОЙ ЛИНИИ-ПРОДУЦЕНТА ХОРИОНИЧЕСКОГО ГОНАДОТРОПИНА ЧЕЛОВЕКА**

**Аннотация.** *Хорионический гонадотропин человека (ХГч) – гетеродимерный гормон семейства гонадотропинов, состоящий из  $\alpha$ - и  $\beta$ -цепей. В настоящее время синтезируется рекомбинантным способом в клетках яичника китайского хомячка (СНО) и применяется в качестве терапевтического средства в рамках вспомогательных репродуктивных технологий. На основе клеточной линии СНО DG44 и векторной плазмиды p1.1-Tr2 получен продуцент ХГч с высокой продуктивностью, при этом для балансировки относительных уровней секреции цепей ХГч был реализован подход вспомогательной трансфекции конструкцией, кодирующей недостающую цепь ( $\beta$ -цепь) ХГч. В оптимизированных условиях достигается урожай продукта не менее 80 мг/л при культивировании в периодическом режиме с подпиткой.*

**Ключевые слова:** *биофармацевтики, клетки яичника китайского хомячка, экспрессионный вектор p1.1, гонадотропные гормоны, хорионический гонадотропин человека (ХГч)*

Хорионический гонадотропин человека (ХГч) – гетеродимерный гормон семейства гонадотропинов, вырабатываемый плацентой и обеспечивающий благополучное протекание беременности. В настоящее время ХГч получают рекомбинантным способом в культуре клеток яичника китайского хомячка (СНО) и применяют в качестве лекарственного средства в комплексе вспомогательных репродуктивных технологий (в т.ч. для экстракорпорального оплодотворения). Все гормоны семейства имеют общую  $\alpha$ -цепь и специфическую  $\beta$ -цепь, определяющую их биологическую активность. Эквимолярная экспрессия генов обеих цепей является общей проблемой экспрессии гетеродимерных белков. Ранее при помощи координированной ко-экспрессии пары генов нами были созданы линии

СНО, секретирующие родственные ХГч фолликулостимулирующий гормон [1] и лютеинизирующий гормон человека. Было установлено, что система экспрессии с реинициацией трансляции второго целевого гена при помощи сайта внутреннего связывания рибосом (IRES) значительно более продуктивна, чем система экспрессии с двумя независимыми оперонами.

В случае ХГч мы получили две трицистронные плазмиды, кодирующие  $\alpha$ - и  $\beta$ -цепи ХГч в генетической кассете формата «промотор гена EEF1A1 –  $\alpha$ -цепь – IRES –  $\beta$ -цепь – IRES – селекционный маркер» и различающиеся только порядком расположения цепей (hCG A1B и hCG B1A). При трансфекции плазмид в клетки СНО транзientная экспрессия наблюдалась только в случае конструкции hCG A1B, поэтому для дальнейшей работы был выбран данный вариант. Была получена стабильно трансфицированная популяция клеток при действии селекционного агента – ингибитора дигидрофолатредуктазы – метотрексата (MTX) в концентрации 200 нМ, затем была проведена амплификация под действием возрастающих концентраций MTX (2 мкМ и 8 мкМ). Для популяции клеток, полученной при действии 8 мкМ MTX, титр полноразмерного ХГч достигал 2-3 мг/л, однако исследование культуральной среды методами иммуоферментного анализа и иммуноблоттинга (Рис. 1) показало, что в среду наряду с гетеродимером секретируется значительный избыток свободной  $\alpha$ -цепи.

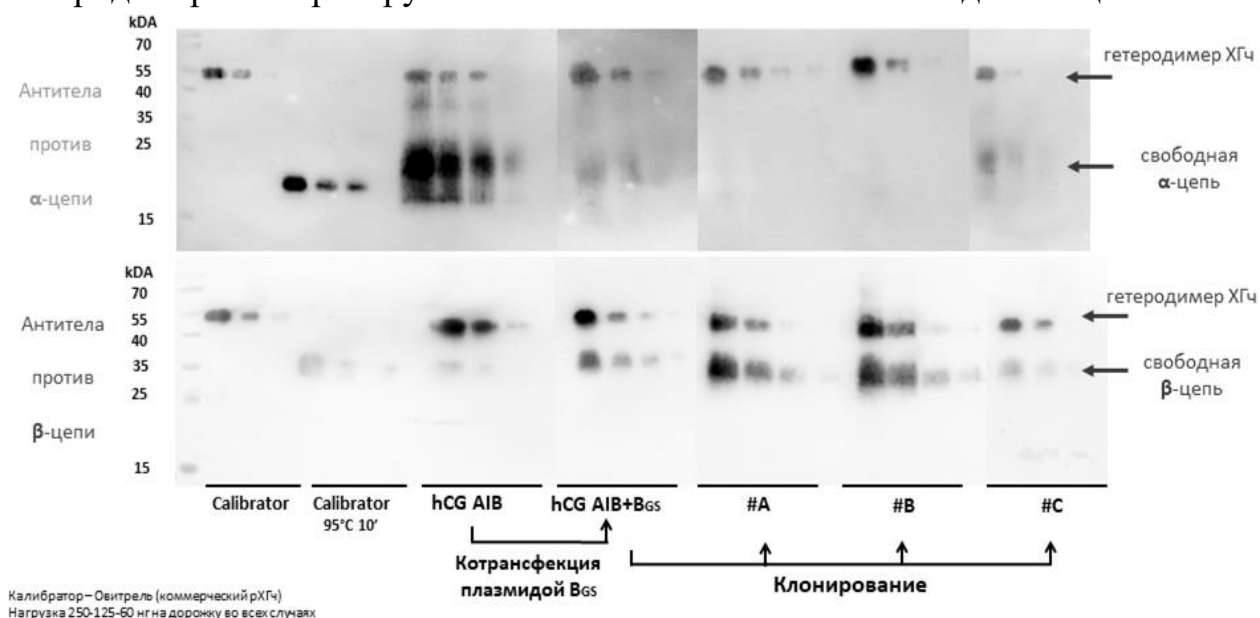


Рис. 1\*. Оценка доли секреции гетеродимера и свободных цепей ХГч в культуральной среде методом вестерн-блоттинга (\*верхняя панель – детекция антителами против  $\alpha$ -цепи ХГч; нижняя панель – детекция антителами против  $\beta$ -цепи ХГч; калибратор – «Овитрель» (рХГч); hCG A1B – поликлональный продуцент hCG A1B, полученный при селекционном давлении 8 мкМ MTX; hCG A1B+B<sub>GS</sub> – поликлональный продуцент hCG A1B 8 мкМ MTX, котрансфицированный конструкцией, кодирующей бета-цепь ХГч); стартовая нагрузка – 250 нг гетеродимера на дорожку, далее серия двукратных разведений)

Для компенсации избыточного уровня секреции  $\alpha$ -цепи была проведена котрансфекция плазмидой p1.2- $V_{GS}$ , кодирующей  $\beta$ -цепь ХГч и маркер устойчивости глутаминсинтазу (GS), получена стабильная линия при действии 25 мкМ метионилсульфоксимида – ингибитора GS. За счет котрансфекции вспомогательной плазмидой продуктивность клеток по гетеродимеру была увеличена вдвое, был достигнут титр ХГч 5-7 мг/л за три дня простого периодического процесса. Для данной поликлональной популяции было проведено клонирование, три кандидатные моноклональные линии были охарактеризованы по признакам продуктивности, уровням секреции мономеров цепей (Рис. 1), копийности трансгена. Для наиболее перспективного клона #В был достигнут титр гетеродимера ХГч 9,1 мг/л по результатам трех дней простого периодического процесса, при этом уровень секреции цепей был близок к балансу с небольшим преобладанием в среде свободной бета-цепи (Рис. 1). Анализ копийности вставки трансгена в геноме клона #В обнаружил 110 копий альфа-цепи на 1 геном CHO. Для клона #В был осуществлен подбор оптимальных условий культивирования в культуральных средах от трех различных производителей, титр в длительном цикле культивации до падения жизнеспособности ниже 70-80% (10-14 дней) составил 30 мг/л в среде ProCHO5 (Lonza, Швейцария), 120 мг/л в среде 4CellXtraCHO Production Medium (Sartorius, Германия), 145 мг/л в среде CDMB (Китай).

**Основные выводы:** На основе клеточной линии CHO DG44 и векторной плазмиды p1.1-Tr2 получена клональная линия-продуцент ХГч, конечный титр целевого продукта которой составляет не менее 80 мг/л при культивировании в периодическом режиме с подпиткой. Найденный в работе способ балансировки уровня биосинтеза и секреции цепей гетеродимерных гонадотропных гормонов позволяет достичь высоких титров целевого белка может быть применен и для других гормонов данного семейства.

### **Литература**

Orlova N.A. et al. High-level expression of biologically active human follicle stimulating hormone in the Chinese hamster ovary cell line by a pair of tricistronic and monocistronic vectors // PLoS One. Public Library of Science. – 2019. – Vol. 14 (7). – P. e0219434.

### **Список публикаций по теме работы**

#### *Статьи*

1. Sinegubova M.V., Orlova N.A., Kovnir S.V., Dayanova L.K., Vorobiev I.I. High-level expression of the monomeric SARS-CoV-2 S protein RBD 320-537 in

stably transfected CHO cells by the EEF1A1-based plasmid vector // PLoS One. – 2021. – Vol. 16 (2). – P. e0242890.

2. Sinegubova M., Vorobiev I., Klishin A., Eremin D., Orlova N., Orlova N., Polzиков M. Purification Process of a Recombinant Human Follicle Stimulating Hormone Biosimilar (Primapur®) to Yield a Pharmaceutical Product with High Batch-to-Batch Consistency // *Pharmaceutics*. – 2022. – Vol. 14 (1). – P. 96.

*Тезисы докладов*

1. Синегубова М.В., Орлова Н.А., Ползиков М.А., Воробьёв И.И. Исследование промышленной пригодности процессов выделения и очистки рекомбинантного фолликулостимулирующего гормона человека // Сборник тезисов XXXI Зимней молодёжной научной школы «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии» (11–14 февраля 2019 г.). – М.: Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН. – С. 135. (тезисы и постерный доклад)

2. Синегубова М.В., Ковнир С.В., Орлова Н.А., Ползиков М.А., Воробьёв И.И. Исследование параметров культивации клеточной линии CHO C-P1.3-FSH-G4 – продуцента рекомбинантного фолликулостимулирующего гормона человека // Сборник тезисов 23-й Международной Пущинской школы-конференции молодых ученых «Биология – наука XXI века» (15–19 апреля 2019 г.), Пущино [Электронный ресурс]. URL: [http://www.biology21.ru/files/upload/history/sbornik\\_2019.pdf](http://www.biology21.ru/files/upload/history/sbornik_2019.pdf) – 2019. – С. 148. (тезисы и устный доклад)

3. Синегубова М.В., Орлова Н.А., Ковнир С.В., Воробьёв И.И. 5'-нетранслируемый участок ДНК размером 2,5 т.п.о. из области гена EEF1A1 является необходимым и достаточным для сохранения продуктивности стабильно трансфицированных клеток CHO при их культивации в неселективных условиях в течение 60 дней // Тезисы докладов ежегодной научной конференции Федерального исследовательского центра «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук 03-05 марта 2020 г. (тезисы и устный доклад)

4. Синегубова М.В., Орлова Н.А., Ковнир С.В., Воробьёв И.И. Получение рецептор-связывающего домена шиповидного белка SARS-CoV-2 в стабильно трансфицированных клетках линии CHO // Сборник тезисов XXXI Зимней молодёжной научной школы «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии» (8–11 февраля 2021 г.) – М.: Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН. – С. 166. (устный доклад, диплом призера конкурса работ молодых ученых)

5. Синегубова М.В. Получение рецептор-связывающего домена RBDv2 шиповидного белка SARS-CoV-2 в стабильно трансфицированных клетках линии CHO // Сборник тезисов отчетной конференции аспирантов ФИЦ Биотехнологии РАН: направление подготовки 06.06.01 Биологические науки (21-25 июня 2021 г.) / под ред. В.О. Попова, А.Н. Фёдорова; сост. Е.С. Титова. – М.: ВАШ ФОРМАТ. – 2021. – С. 29–34. (тезисы и устный доклад)
6. Колесов Д.Э., Синегубова М.В., Даянова Л.К., Орлова Н.А., Воробьёв И.И. Суррогатный метод определения вирус-нейтрализующих антител к вирусу SARS-CoV-2 при помощи конъюгата ангиотензин-превращающего фермента 2 с пероксидазой хрена и интактного рецептор-связывающего домена шиповидного белка // XXXIV Зимняя молодёжная научная школа «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии». Сборник тезисов. – Москва, 8-11 февраля 2022 г. – С. 107. (тезисы и устный доклад)
7. Синегубова М.В., Орлова Н.А., Кочина Я.А., Воробьёв И.И. Балансировка относительного уровня экспрессии цепей рекомбинантных гонадотропинов // XXXIV Зимняя молодёжная научная школа «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии». Сборник тезисов. – Москва, 8-11 февраля 2022 г. – С. 118. (тезисы и устный доклад)

#### **Основные достижения**

1. Диплом II место в секции «Биотехнология и приборостроение» за устный доклад «Исследование параметров культивации клеточной линии CHO C-P1.3-FSH-G4 – продуцента рекомбинантного фолликулостимулирующего гормона человека» 23-я Международная Пущинская школа-конференция молодых ученых БИОЛОГИЯ – НАУКА XXI ВЕКА. 15–19 апреля 2019 г. Пущино, Россия
2. Диплом за лучший доклад на ежегодной отчетной конференции аспирантов ФИЦ Биотехнологии РАН, 2019 г.
3. Диплом за лучший доклад на ежегодной отчетной конференции аспирантов ФИЦ Биотехнологии РАН, 2020 г.
4. Диплом призера конкурса работ молодых ученых за работу «Получение рецептор-связывающего домена шиповидного белка SARS-CoV-2 в стабильно трансфицированных клетках линии CHO» XXXI Зимняя молодёжная научная школа «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии» (8-11 февраля 2021 г.)

**HIGH-LEVEL EXPRESSION OF THE HETERODIMERIC HUMAN  
CHORIONIC GONADOTROPIN IN STABLY  
TRANSFECTED CHO CELLS**

**Abstract**

Human chorionic gonadotropin (hCG), a heterodimeric hormone of the gonadotropin family consisting of  $\alpha$ - и  $\beta$ -chains, is produced in Chinese hamster ovary (CHO) cell culture and is used for infertility treatment in assisted reproductive technologies. Using a CHO DG44 cell line and a p1.1-Tr2 vector plasmid, we obtained a hCG producer cell line with high productivity. The approach of compensating transfection with a construct encoding the lacking chain ( $\beta$ -chain) of hCG was used to balance the relative hCG subunits secretion levels. In the optimized culture conditions we achieved a product yield of at least 80 mg/L when cultivating in a fed-batch mode.

**Keywords:** biopharmaceuticals, Chinese hamster ovary (CHO) cell culture, p1.1 expression plasmid, gonadotropins, human chorionic gonadotropin (hCG)

## ПРОФИЛЬ 1.5.8. МАТЕМАТИЧЕСКАЯ БИОЛОГИЯ, БИОИНФОРМАТИКА

**Михайлов Иван Максимович**

*аспирант ФИЦ Биотехнологии РАН 2 года обучения  
профиль 1.5.8. Математическая биология,  
биоинформатика*

*e-mail: mikhailovivan27@gmail.com*

Научный руководитель

**Медведева Юлия Анатольевна**

*кандидат биологических наук,  
руководитель группы регуляторной транскриптомики  
и эпигеномики*



### СОЗДАНИЕ КОМПЛЕКСНОЙ СИСТЕМЫ ОЦЕНКИ ГЕНОТОКСИЧНОСТИ ХИМИЧЕСКИХ ВЕЩЕСТВ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ВЫСОКОПРОИЗВОДИТЕЛЬНОГО СЕКВЕНИРОВАНИЯ

**Аннотация.** Алгоритм для оценки генотоксичности с использованием высокопроизводительного секвенирования на основе независимого картирования парноконцевых прочтений, разработанный ранее был дополнен был доработан для возможности определения как внутривромосомных перестроек, так и транслокаций. Разработанный алгоритм был использован для оценки генотоксического воздействия пищевых красителей.

**Ключевые слова:** генотоксичность, высокопроизводительное секвенирование, секвенирование с низким покрытием, анализ данных, цитотоксичность

#### Результаты исследования

Было проведено исследование генотоксичности пищевых добавок, относящихся к классу азосоединений: 3 образца Понсо 4R (называемые в рамках данной работы Понсо 4R 1, Понсо 4R 2, Понсо 4R 3), Тартразин, Кармуазин и Желтый солнечный закат. Исследование проводили на культуре клеток человека wi-38 [1]. В качестве отрицательного контроля использовали воду, в качестве положительного контроля – противоопухолевый антибиотик блеомицин.

Клетки рассаживали на 6-луночный планшеты со средой DMEM 10 % FBS и культивировали при 37 °С в атмосфере 5 % CO<sub>2</sub>. Эксперимент для каждого из исследуемых веществ, положительных и отрицательных контролей проводили в 2-х повторах. Через 24 часа среду заменяли на рабочую и далее среду заменяли каждые 24 часа. Также, каждые 24 часа отбирали аликвоты клеток для выделения генетического материала. Снятие клеток проводили двумя способами: с использованием трипсина и смеси трипсина и р-ра Версена в соотношении 50:50. Проводили измерение контроля клеток, для оценки пролиферативной активности строили кинетические кривые роста (Рис. 1).



Рис. 1. Кинетические кривые роста контрольных образцов

ДНК из всех образцов выделяли набором Blood&Tissue Qiagen в соответствии с рекомендациями производителя. Концентрацию ДНК измеряли с использованием флуориметра Qubit 4 с набором dsDNA High Sensitivity.

Проводили пробоподготовку синтетических контрольных образцов. Для этого генетический материал контрольного образца, полученного после культивирования на протяжении 24 часов (данный образец был выбран во избежание возможного накопления хромосомных aberrаций во время культивирования) подвергали неспецифической фрагментации с использованием набора Ion Xpress Plus (Thermo Fisher). Время фрагментации составило 15 секунд. После фрагментации генетический материал подвергали кинированию с использованием киназы NEB РТК, а затем – лигированию с использованием лигазы NEB T4 DNA Ligase в соответствии с рекомендациями производителя.



Картирование проводили программой *bwa mem*, в качестве референсной последовательности использовали GRCh38 [2]. Для валидации корректной работы алгоритма анализа применяли программу *TransIndel* [3], для каждого из контролей количество aberrаций коррелировало с долей генетического материала, подвергнувшегося неспецифической фрагментации и последующему лигированию (данные не приводятся). Данные о количестве прочтений с инделами и транслокациями, полученные с использованием разработанного алгоритма приведены на (Рис. 2).

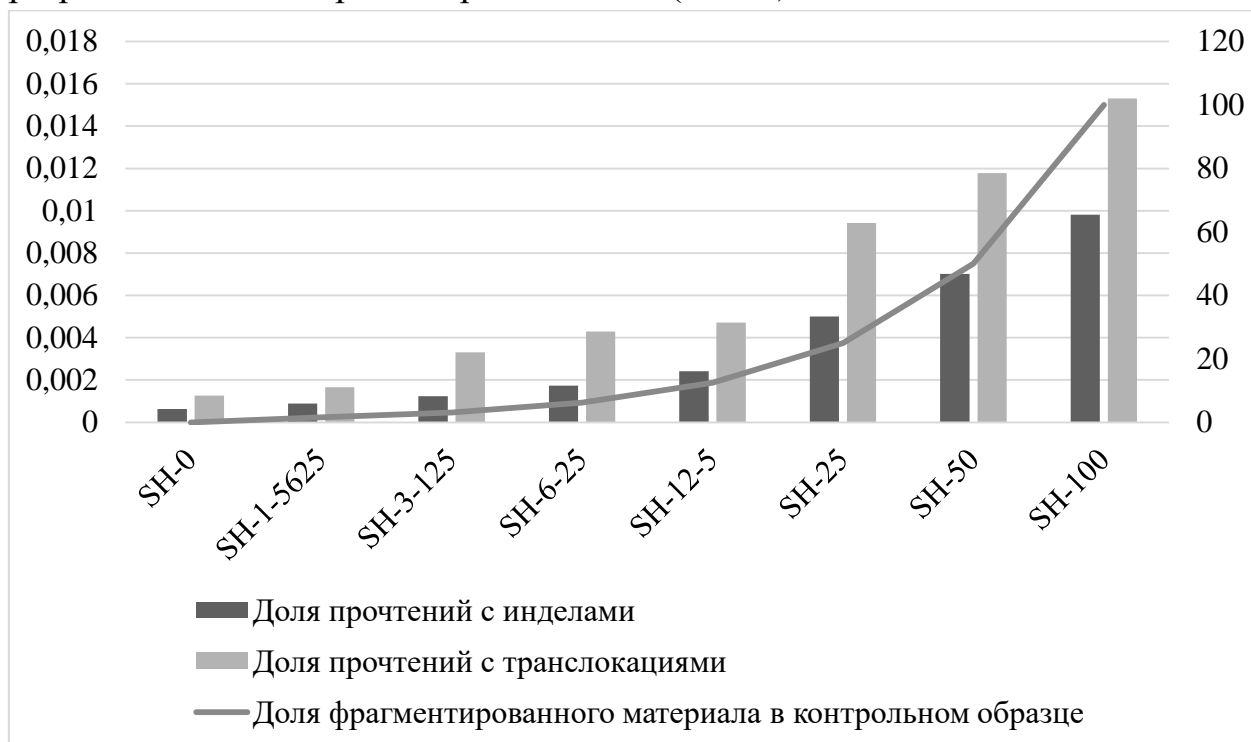


Рис. 2. Доля генетического материала, содержащего внутри- и межхромосомные перестройки

Был проведен анализ на основе:

- 1) Improperly paired парноконцевых прочтений;
- 2) Properly paired mate unmapped парноконцевых прочтений;
- 3) Properly paired read unmapped парноконцевых прочтений;
- 4) Properly paired парноконцевых прочтений, для которых размер вставки больше медианной для данной пробоподготовки;
- 5) Improperly paired парноконцевых прочтения с картированием соответственного реверсного прочтения на другую хромосому, чем форвардное.

Анализ проводили с использованием программы *Samtools* [4]. Для валидации работы алгоритма был проведен анализ инделов и транслокаций в контрольных образцах. Полученные результаты для блеомицина и отрицательного контрольного образца приведены на (Рис. 3). Было показано,

что блеомицин индуцирует транслокации, в то время как доля внутрихромосомных перестроек значительно не увеличивалась.

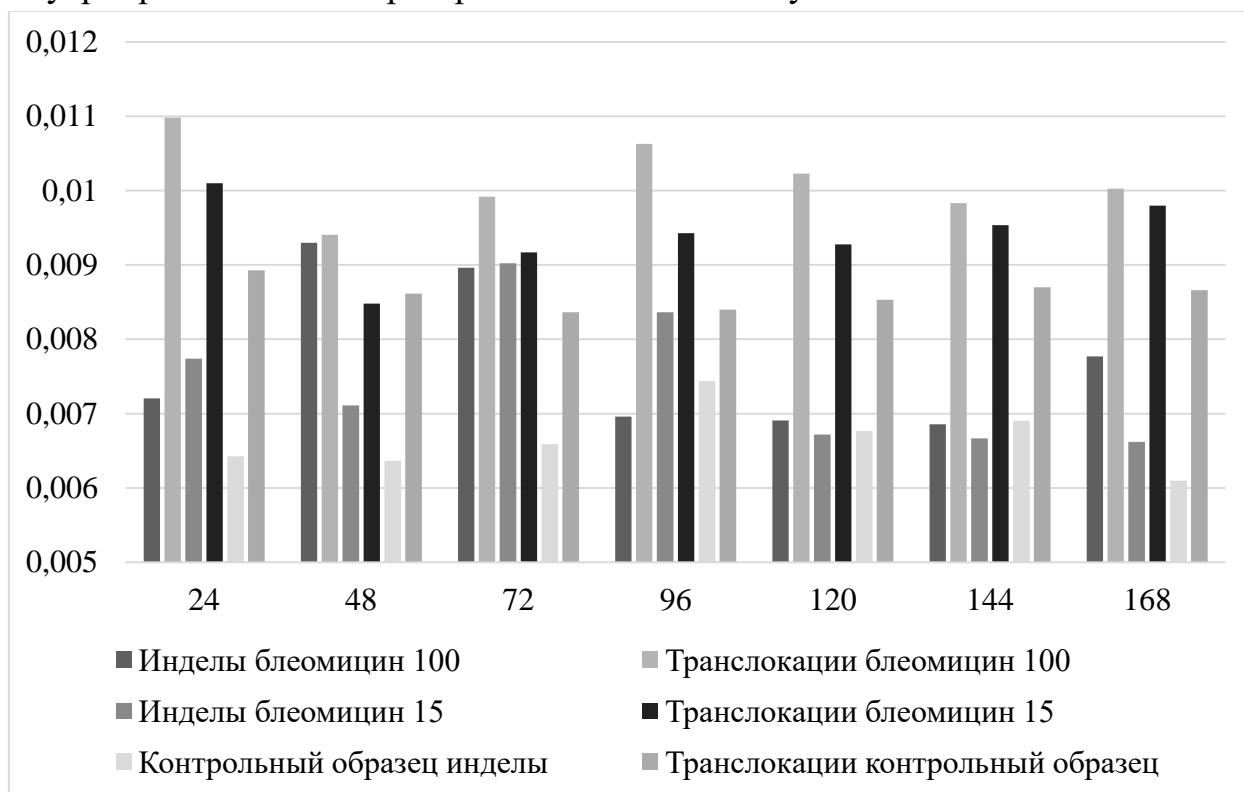


Рис. 3. Количественный анализ хромосомных aberrаций в контрольных образцах

Для всех исследуемых образцов был проведен аналогичный анализ. Результаты приведены на (Рис. 4).



Рис. 4. Хромосомные aberrации в генетическом материале клеток, культивирование которых осуществляли с добавлением пищевых добавок

Было показано, что пищевые красители Понсо 4R, Тартразин и Желтый солнечный закат индуцируют образование транслокаций и обладают генотоксическим эффектом, что было подтверждено микроядерным тестом на полихроматофильных эритроцитах.

**Основные выводы.** Разработанный алгоритм для анализа хромосомных aberrаций был дополнен возможностью анализа транслокаций. Была подтверждена корректность работы алгоритма. С использованием разработанного алгоритма было проведено исследование генотоксического эффекта пищевых красителей, относящихся к классу азосоединений. Было показано, что пищевые красители Понсо 4R, Тартразин и Желтый солнечный закат индуцируют образование транслокаций и обладают генотоксическим эффектом.

### **Литература**

1. Wolosewick J.J., Porter K.R. Observations on the morphological heterogeneity of WI-38 cells // American Journal of Anatomy. – 1977. – Vol. 149 (2). – P. 197-225.
2. Li H. Aligning sequence reads, clone sequences and assembly contigs with BWA-MEM // arXiv: Genomics. – 2013.
3. Yang R., Van Etten J.L., Dehm S. M. Indel detection from DNA and RNA sequencing data with transIndel // BMC genomics. – 2018. – Vol. 19 (1). – P. 1-11.
4. Li H. et al. The sequence alignment/map format and SAMtools // Bioinformatics. – 2009. – Vol. 25 (16). – P. 2078-2079.

### **Список публикаций по теме работы**

#### *Тезисы докладов*

1. Михайлов И.М. Выбор и получение объектов для разработки методики определения генотоксичности с использованием высокопроизводительного секвенирования // Труды 63-й Всероссийской научной конференции МФТИ. – 2020. – С. 14-15 (устный доклад)
2. Михайлов И.М. Создание комплексной системы оценки генотоксичности химических веществ с использованием высокопроизводительного секвенирования // Сборник тезисов отчётной конференции аспирантов ФИЦ Биотехнологии РАН: направление подготовки 06.06.01 Биологические науки (21-25 июня 2021 г.) / под ред. В.О. Попова, А.Н. Фёдорова; сост. Е.С. Титова. – М.: ВАШ ФОРМАТ. – 2021. – С. 147-150. (тезисы и устный доклад)

**Mikhaylov Ivan Maximovich**  
**RESEARCH CENTER OF BIOTECHNOLOGY RAS**

**DESIGN OF COMPLEX SYSTEM FOR GENOTOXICITY  
EVALUATION OF CHEMICAL COMPOUNDS USING NGS**

**Abstract**

In this study an algorithm for analysis of low coverage sequencing data based on independent mapping of paired-end reads was refined to detect not only indels, but also translocations. An algorithm developed was used for evaluating genotoxic effect of food dyes.

**Keywords:** genotoxicity, NGS, low coverage sequencing, data analysis, cytotoxicity

## ПРОФИЛЬ 1.5.11. МИКРОБИОЛОГИЯ

**Галуза Олеся Александровна**

*аспирантка ФИЦ Биотехнологии РАН 1 года обучения*

*профиль 1.5.11. Микробиология*

*e-mail: olesya\_galuza@mail.ru*

Научный руководитель

**Николаев Юрий Александрович**

*доктор биологических наук,*

*зав. лабораторией выживаемости микроорганизмов*



### **ВЫЖИВАЕМОСТЬ МОЛОЧНОКИСЛЫХ БАКТЕРИЙ В ГЕЛЯХ ОРГАНИЧЕСКОГО И СМЕШАННОГО СОСТАВА**

**Аннотация.** Проблема выживаемости микроорганизмов является центральной в микробиологии и её прикладным аспектом является разработка способов длительного сохранения жизнеспособности молочнокислых бактерий (МКБ) в процессе хранения молочной продукции и биопрепаратов, а также повышения их сроков годности, что обуславливает актуальность исследования для пищевой промышленности и медицины.

Работа направлена на поиск новых эффективных способов сохранения высокого титра жизнеспособных клеток молочнокислых бактерий в течение длительного времени. Впервые предложено пролонгированное хранение МКБ при иммобилизации в гели двух типов - силанольно-гуминовые гели с разными органическими кислотами и желатин. Для *Enterococcus faecium* наилучшим эффектом обладали яблочная, молочная, лимонная кислоты. Для *Lactobacillus paracasei* – аскорбиновая, яблочная, молочная и лимонная кислоты. Выживание клеток *E. faecium* (в 12 раз лучше, чем в контроле) достигнуто при их иммобилизации в желатиновый гель.

**Ключевые слова:** молочнокислые бактерии, выживаемость, длительное хранение, силанольно-гуминовые гели, желатиновый гель, биопрепараты

Молочнокислые бактерии – это одна из распространённых групп микроорганизмов, которые существуют в различных природных биотопах, входят в состав микробиома желудочно-кишечного тракта человека и животных как бактерии-пробиотики, образуют симбиоз с растениями, и интенсивно используются при промышленном производстве кисломолочных продуктов, пробиотических добавок и различных биопрепаратов сельскохозяйственного назначения [1].

Одной из главных проблем молочной промышленности является снижение качества кисломолочной продукции на основе МКБ при хранении из-за высокой скорости гибели клеток [2]. Зачастую, сроки хранения данной продукции, при которых титр жизнеспособных клеток сохраняется на требуемом уровне ( $10^6$ - $10^8$  КОЕ/мл), составляет не более 2-4 недель, при этом за данный промежуток времени он снижается в 10 и более раз [3]. Для пролонгирования функциональной активности микроорганизмов в биотехнологии используют иммобилизацию бактерий в гели, являющейся аналогом нахождения клеток бактерий в составе биопленок [4]. Однако, механизмы выживания бактерий в гелях исследованы недостаточно.

Цель работы заключалась в разработке способов длительного поддержания жизнеспособности молочнокислых бактерий при их иммобилизации в гели двух типов: силанольно-гуминовые и желатиновые, а также исследовании механизмов длительного поддержания жизнеспособности.

В работе использованы два типа гелей: органического происхождения – желатин в концентрации 100 г/л и гель из силанольных производных гуминовых веществ на основе гуматов Фульвигрейн Классик (ООО РодАгро, Россия), (10%), и 3-аминопропилтриэтоксисилана (АПТС) (3-5%). В качестве титранта для обеспечения pH на уровне 7,0-6,0 использовали различные органические кислоты. *Объекты исследования* – штаммы молочнокислых бактерий *Lactobacillus paracasei* АК508 и *Enterococcus faecium* М3185.

Желатин – это стабилизатор-загуститель, используемый в промышленном производстве. Его целесообразно применять для иммобилизации пробиотических культур микроорганизмов, так как он представляет систему открытых пор с хорошими условиями для газообмена и обладает хорошими диффузными качествами, является источником глутаминовой кислоты и аргинина. Иммобилизация клеток в желатиновый гель повышает их устойчивость к желчи в ЖКТ [5]. Ранее не было известно об использовании желатина для длительного сохранения жизнеспособности МКБ.

Настоящее исследование базируется на ранее сделанном исследовании, в ходе которого описанный тип биосовместимого геля на основе гуматов, модифицированных органосиланами, для иммобилизации бактерий в целях пролонгирования их жизнеспособности [6]. Силанольные производные гуминовых веществ формируются при взаимодействии гуматов и аминоалкоксисиланов в водной среде при закислении [7]. Для достижения оптимальных показателей pH, необходимых для застывания геля, используют неорганические и органические кислоты. Именно последние обуславливают

длительное поддержание жизнеспособности клеток [6]. В работе впервые исследовали влияние разных органических кислот в составе гелей на выживаемость молочнокислых бактерий при длительном хранении.

Исследование выживаемости клеток *E. faecium*, иммобилизованных в желатиновом геле в течение четырёх недель, показало, что средняя скорость их отмирания составляла 0,007 lg КОЕ/мл сут и была в 5 раз меньше, чем в контрольном варианте (0,04 lg КОЕ/мл сут) (Рис. 1).

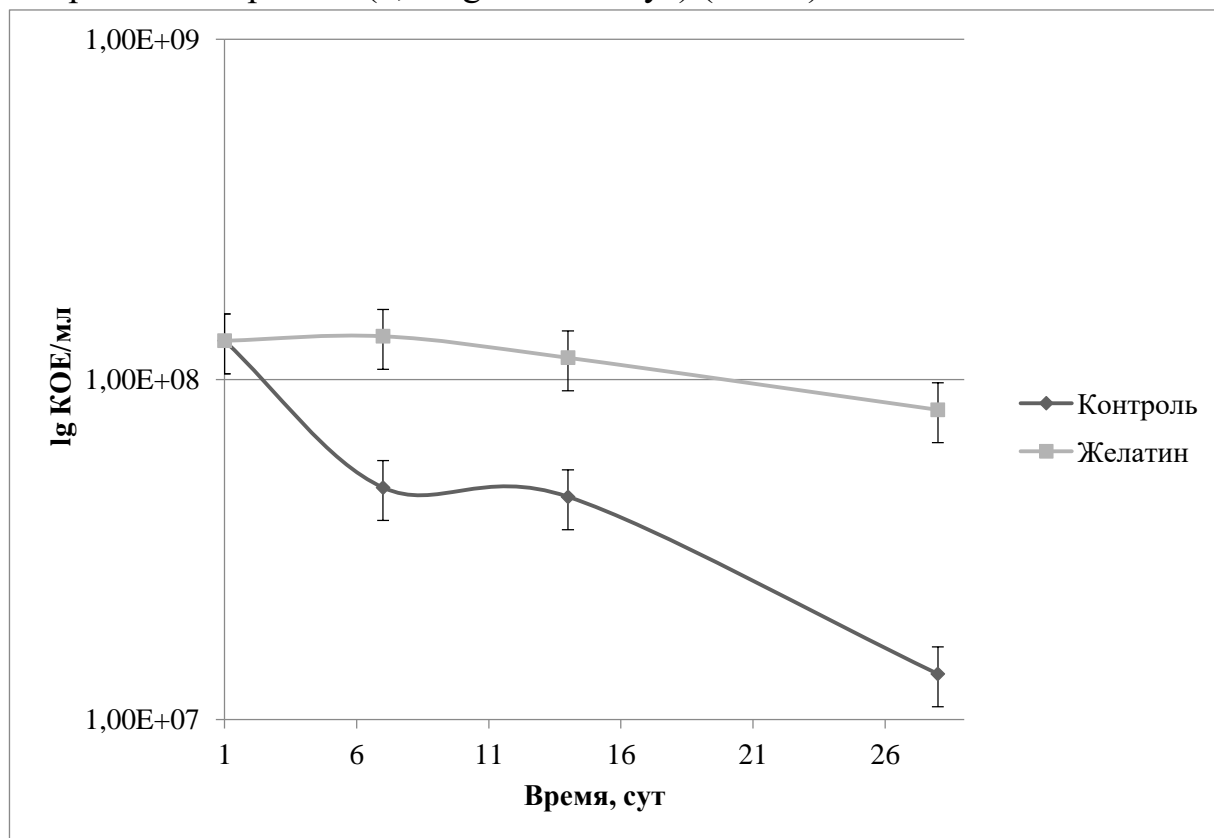


Рис. 1. Изменение численности жизнеспособных клеток *E. faecium*, выращенных в LB и иммобилизованных в желатин, при хранении в течение месяца

Доля выживших клеток через месяц хранения в желатине превысила в 12 раз их количество в контроле (при  $p < 0,05$ ) и составила 31,5%, доля выживших клеток для контроля была на уровне 2,7 %.

Таким образом, можно сделать вывод о том, что иммобилизация и последующее хранение клеток *E. faecium* в желатиновом геле концентрации 100 г/л очень эффективна и позволяет сохранять титр жизнеспособных клеток в течение месяца на порядок более высоким, чем в контроле. Этот уровень превышает рекомендованный для титра жизнеспособных клеток МКБ ( $10^6$ - $10^8$  КОЕ/мл).

Иммобилизация клеток *E. faecium* и *L. paracasei* в силанольно-гуминовые гели различного состава (по типу использованных органических кислот) показала, что сохранению титра жизнеспособных клеток бактерий зависело от типа кислоты. Доля выживших клеток *E. faecium* через 30 сут

хранения при внесении яблочной кислоты сохранялась на уровне 6,9%, что в 6 раз превышает их содержание в контроле (1,1 %), а добавление молочной и лимонной кислот способствовало сохранению клеток в пределах 3%, что в 3 раза больше, чем в контрольном образце (Рис. 2).

При иммобилизации клеток *L. paracasei* в силанольно-гуминовые гели с добавлением аскорбиновой кислоты титр жизнеспособных клеток сохранялся на уровне 32% (в 32 раза больше, чем в контроле), при внесении яблочной кислоты – на уровне 16% (в 16 раз больше, чем в контроле), молочной и лимонной – на уровне 4,5-5% (в 4,5-5 раз больше, чем в контроле) (Рис.2).

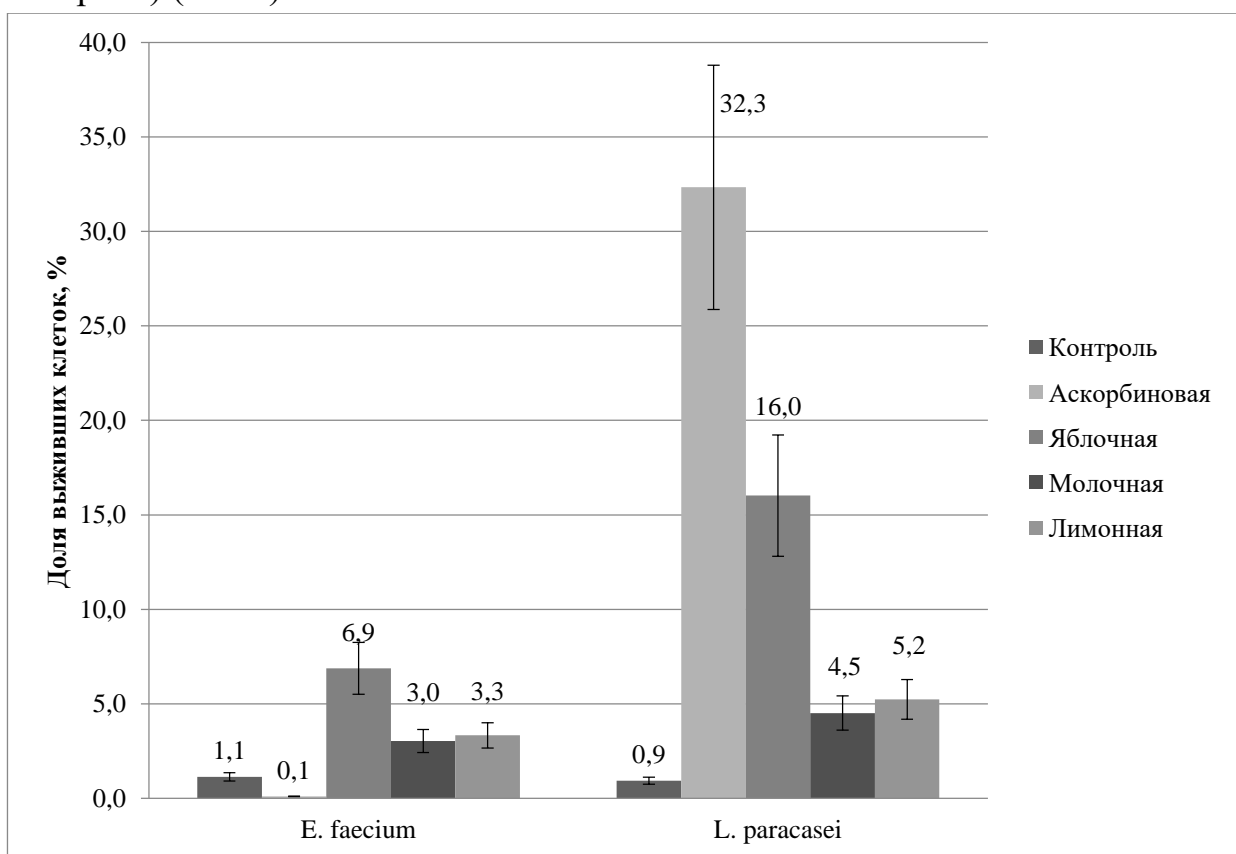


Рис. 2. Доля выживших клеток *E. faecium* и *L. paracasei*, выращенных в среде LB и иммобилизованных в силанольно-гуминовые гели с различными органическими кислотами, при хранении в течение одного месяца, %

**Основные выводы.** Иммобилизация клеток МКБ в гели является эффективным приёмом поддержания их жизнеспособности при длительном хранении в неоптимальных условиях (комнатная температура, доступ кислорода). Иммобилизация клеток МКБ в желатиновые и силанольно-гуминовые гели повышает титр КОЕ относительно нестабилизированного контрольного препарата в течение месяца на 1 порядок. Эффективность поддержания жизнеспособности зависит от микроорганизма и типа использованного источника углерода (в случае использования органических кислот). Причиной эффективного поддержания жизнеспособности МКБ



является обеспечение их доступным источником углерода и энергии, обладающим антиоксидантными свойствами, а также переход клеток МКБ в особое малоисследованное состояние покоя (изучению которого будут посвящены следующие работы).

### **Литература**

1. Светлакова Е.В. Использование молочнокислых бактерий в биотехнологических процессах [Электронный ресурс] // Современные проблемы науки и образования. – 2015. – № 3. URL: <https://science-education.ru>
2. Ng E.W. Effects of yogurt starter cultures on the survival of *Lactobacillus acidophilus* / E.W. Ng, M. Yeung, P.S. Tong // Food Microbiology. – 2011. – Vol. 145(1). – P. 169-175.
3. Shin H. Viability of bifidobacteria in commercial dairy products during refrigerated storage / H. Shin, J. H. Lee, J.J. Pestka, Z.P. Ustinol // Food Protection. – 2000. – Vol. 63(3). – P. 327-331.
4. Имобилизованные клетки: биокатализаторы и процессы: монография / Под ред. д-ра биол. наук, профессора Е.Н. Ефременко. – М.: РИОР, 2018. – 523 с.
5. Измайлова В.Н. Гелеобразование в желатине и многокомпонентных системах на её основе / В. Н. Измайлова, С. Р. Деркач, М. А. Саквелидзе [и др.] // Высокомолекулярные соединения. – 2004. – Т. 46. – № 12. – С. 2216-2240.
6. Nikolaev Yu.S. Immobilization of Cells of Hydrocarbon-oxidizing Bacteria for Petroleum Bioremediation Using New Materials / Yu. S. Nikolaev, I. Borzenkov, G. El-Registan et. al. // International Journal of Environmental Research. – 2021. – Vol. 15. – P. 971-984.
7. Targeted design of water-based humic substances-silsesquioxane soft materials for nature-inspired remedial / A.B. Volikov, S.A. Ponomarenko, A. Gutsche et. al. // RSC advances. – 2016. – V. 6. – P. 48222-48230.

**Galuzha Olesya Alexandrovna**  
**RESEARCH CENTER OF BIOTECHNOLOGY RAN**

### **SURVIVAL OF LACTIC ACID BACTERIA IN ORGANIC AND MIXED GELS**

#### **Abstract**

The problem of microbial survival is central in microbiology and its applied aspect is the development of methods for long-term preservation of the viability of lactic acid bacteria (LAB) during the storage of dairy products and biological products, as well as increasing their shelf life, which determines the relevance of research for the food industry and medicine.

The work is aimed at finding new effective ways to maintain a high amount of viable cells of lactic acid bacteria for a long time. For the first time, prolonged storage of LAB during immobilization in two types of gels – silanol-humic gels with different organic acids and gelatin. For *Enterococcus faecium*, malic, lactic, and citric acids had the best effect. For *Lactobacillus paracasei* – ascorbic, malic, lactic and citric acids. The survival of *E. faecium* cells (12 times better than in the control) was achieved when they were immobilized in gelatin gel.

**Keywords:** lactic acid bacteria, survival, long-term storage, silanol-humic gels, gelatin gel, biological products

**Кузнецов Александр Сергеевич**

*аспирант ФИЦ Биотехнологии РАН 1 года обучения*

*профиль 1.5.11. Микробиология*

*e-mail: alexbluesking@gmail.com*

Научный руководитель

**Летаров Андрей Викторович**

*доктор биологических наук,*

*зав. лабораторией вирусов микроорганизмов*



## **ИНФЕКЦИЯ ЛЯМБДОИДНЫМ БАКТЕРИОФАГОМ Ф24В ШТАММОВ С НАРУШЕННЫМ СИНТЕЗОМ ЭКЗОПОЛИСАХАРИДА И ПОЛУЧЕНИЕ РЕКОМБИНАНТНЫХ ФОРМ ФАГОВОГО БЕЛКА-АДГЕЗИНА**

**Аннотация.** *Stx-конвертирующий лямбдоидный колифаг ф24В способен инфицировать широкий спектр лишенных полноценного O-антигена лабораторных штаммов Escherichia coli, при этом естественные лизогены по этому фагу обычно представлены O-антиген-синтезирующими формами. Вероятно, пока не известный в деталях механизм адсорбции фага ф24В на поверхности клеток бактерий-хозяев включает в себя фазу преодоления слоя O-антигена, определяющее спектр хозяев фага в природных системах. Для исследования адсорбционных свойств этого вируса нами был получен препарат бактериофага, показан характер его размножения на различных штаммах E. coli, в том числе мутантных по генам синтеза экзополисахаридов (ЭПС), а также изучены рекомбинантные варианты предположительного рецептор-распознающего белка исследуемого бактериофага.*

**Ключевые слова:** *бактериофаги, лизогенная конверсия, фаговая адсорбция, рецептор-распознающие белки, рецептор фага, O-антиген, экзополисахариды, рекомбинантные белки*

С точки зрения современного здравоохранения важными объектами исследований представляются бактериофаги, которые осуществляют лизогенную конверсию, направленную на приобретения бактериальной клеткой различных факторов патогенности, таких как устойчивость к антибиотикам [1] или продукция токсинов [2]. Лизогенная конверсия широко распространена среди лямбда-подобных вирусов. Лямбдоидные Stx-конвертирующие бактериофаги способны превращать клетку-хозяина в потенциального продуцента шигаподобного токсина (Stx) [3]. Клетки

*Escherichia coli*, несущие Stx-профаги, вызывают серьезные токсикоинфекции человека [4] и сельскохозяйственных животных [5].

Несмотря на высокую практическую значимость Stx-конвертирующих бактериофагов, остаются не выясненными принципы адсорбции, определяющие инфекцию и, следовательно, Stx-конверсию.

Бактериофаг ф24В способен инфицировать широкий спектр rough-штаммов, при этом наличие полноценного O-антигена на поверхности клетки подавляет адсорбцию этого фага [6]. Несмотря на это, природные варианты лизогенов по ф24В обладают O-антигеном, что может говорить о способе преодоления фагом полисахаридного слоя при взаимодействии с пока не идентифицированным первичным рецептором, вероятно, определяющим истинный спектр хозяев данного фага. Недавние исследования [7] показали, что бактериофаг N4 в качестве первичного рецептора распознает молекулу экзополисахаридов (ЭПС), и нельзя исключать аналогичный способ обратимой адсорбции для фага ф24В. Литическая инфекция Stx-конвертирующих фагов усиливается при понижении в клетке ppGpp [8], что может оказаться важным при выборе оптимального штамма хозяина для получения высококонцентрированных препаратов фага ф24В.

Задачами данной работы стали исследование роста ф24В на мутантах по генам синтеза ЭПС и ppGpp, а также проведение экспрессии и проверка растворимости рекомбинантных вариантов фагового рецептор-распознающего белка gr56, что необходимо для дальнейшего исследования этого адгезина.

Лизаты бактериофага ф24В получали индукцией профагов из лизогенов, а также разными вариантами экстракции фага с зон «сетчатого лизиса» на бактериальном газоне. Также получили лизат фага λ, который использовался в качестве контрольного объекта. Лизаты обрабатывали хлороформом, осветляли и фильтровали. Биологический титр фагов определяли методом двухслойного агара по Грациа (Рис. 1).

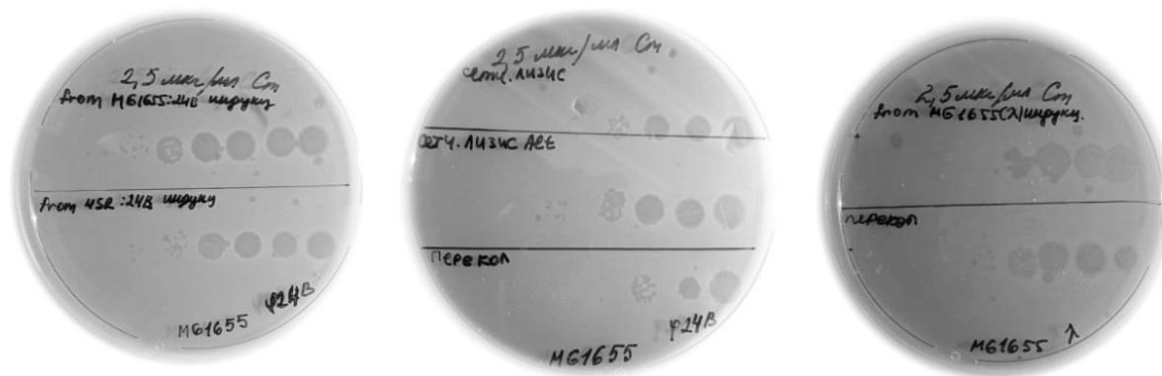


Рис. 1. Титрование фаговых лизатов; биологические титры используемых лизатов:  $4,8 \times 10^9$  БОЕ/мл (ф24В);  $6,4 \times 10^7$  БОЕ/мл (λ)

Далее мы определяли биологический титр полученных лизатов на наборе штаммов, представленном мутантами *E. coli* K-12 substr. MG1655 по различным генам синтеза ЭПС. Результаты титрований показывают отсутствие достоверных различий в характере роста фага на разных штаммах (Табл. 1), что говорит против гипотезы об ЭПС как о первичном рецепторе адсорбции исследуемого вируса.

Таблица 1

Значения биологического титра фагов на различных бактериальных культурах, БОЕ/мл. Для контрольных титрований использовали бактериальные культуры штаммов MG1655 и 4sR

	φ24В	λ		φ24В	λ
MG1655	$7,2 \times 10^9$	$9,2 \times 10^7$	JW0376 ( $\Delta dgcC$ )	$5,2 \times 10^{10}$	$1 \times 10^8$
JW1528 ( $\Delta dgcZ$ )	$3,6 \times 10^{10}$	$9,2 \times 10^7$	JW0818 ( $\Delta dgcI$ )	$6,8 \times 10^{10}$	$7,6 \times 10^7$
JW5291 ( $\Delta dgcJ$ )	$3,2 \times 10^{10}$	$9,2 \times 10^7$	JW0307 ( $\Delta pdeL$ )	$5,2 \times 10^{10}$	$9,6 \times 10^7$
JW5292 ( $\Delta dgcP$ )	$6,4 \times 10^{10}$	$8,8 \times 10^7$	JW0817 ( $\Delta pdeI$ )	$2,8 \times 10^{10}$	$8,4 \times 10^7$
JW5241 ( $\Delta dgcO$ )	$4,8 \times 10^{10}$	$7,2 \times 10^7$	JW0557 ( $\Delta nfrA$ )	$8,8 \times 10^{10}$	$8,4 \times 10^7$
JW5206 ( $\Delta dgcM$ )	$9,2 \times 10^{10}$	$7,6 \times 10^7$	JW2164 ( $\Delta pdeN$ )	$3,2 \times 10^{10}$	$1 \times 10^8$
JW5062 ( $\Delta pdeB$ )	$8 \times 10^{10}$	$1,1 \times 10^8$	JW5825 ( $\Delta dgcF$ )	$2,4 \times 10^{10}$	$7,6 \times 10^7$
JW1484 ( $\Delta pdeO$ )	$4,4 \times 10^{10}$	$9,6 \times 10^7$	JW2052 ( $\Delta dgcE$ )	$7,2 \times 10^{10}$	$9,2 \times 10^7$
JW5943 ( $\Delta pdeK$ )	$6 \times 10^{10}$	$1,2 \times 10^8$	JW5832 ( $\Delta dgcQ$ )	$2,4 \times 10^{10}$	$8 \times 10^7$
JW3493 ( $\Delta pdeH$ )	$2,4 \times 10^{10}$	$7,2 \times 10^7$	JW1278 ( $\Delta pdeR$ )	$2,4 \times 10^{10}$	$1,2 \times 10^8$
JW0558 ( $\Delta nfrB$ )	$4,4 \times 10^{10}$	$4,4 \times 10^7$	JW5143 ( $\Delta dgcT$ )	$1 \times 10^{11}$	$1,2 \times 10^8$
JW5599 ( $\Delta wecC$ )	$9,6 \times 10^{10}$	$1 \times 10^8$	JW1183 ( $\Delta ycgR$ )	$4 \times 10^{10}$	$1,2 \times 10^8$
JW5600 ( $\Delta nfrC$ )	$7,6 \times 10^{10}$	$1,4 \times 10^8$	4sR	$7,2 \times 10^{10}$	$1,2 \times 10^8$

Биологический титр φ24В, однако, не оказался более высоким в случае титрования лизата на газоне, образованном культурой MG1655 $\Delta relA\Delta spoT$ , не способной синтезировать ррGpp. Интересно, что роста контрольного фага λ на клетках этой культуры не наблюдалось (Рис. 2). Мы предполагаем, что отсутствие ррGpp в клетке-хозяине либо повышает вероятность принятия фагом λ «лизогенного решения», либо делает клетки устойчивыми к инфекции этим фагом.



Рис. 2. Титрование лизатов фагов φ24В и λ на контрольном штамме MG1655 (слева) и на штамме MG1655 $\Delta relA\Delta spoT$  (посередине и справа)

С целью получения растворимых вариантов gr56 при помощи ПЦР вносили делеции и с использованием метода T4-безлигазного клонирования [9] получили делеционные экспрессионные конструкции с делециями 162 и 199 аминокислотных остатков, а также провели IPTG-индуцируемую экспрессию соответствующих генетических последовательностей.

После выделения белков в нативной форме отбирали полученный тотальный лизат, после чего центрифугировали для разделения фракций супернатанта и осадка. Образцы подвергали денатурирующему электрофорезу белков. Анализ полученных электрофореграмм (Рис. 3) говорит о том, что полученные делеционные варианты нерастворимы.

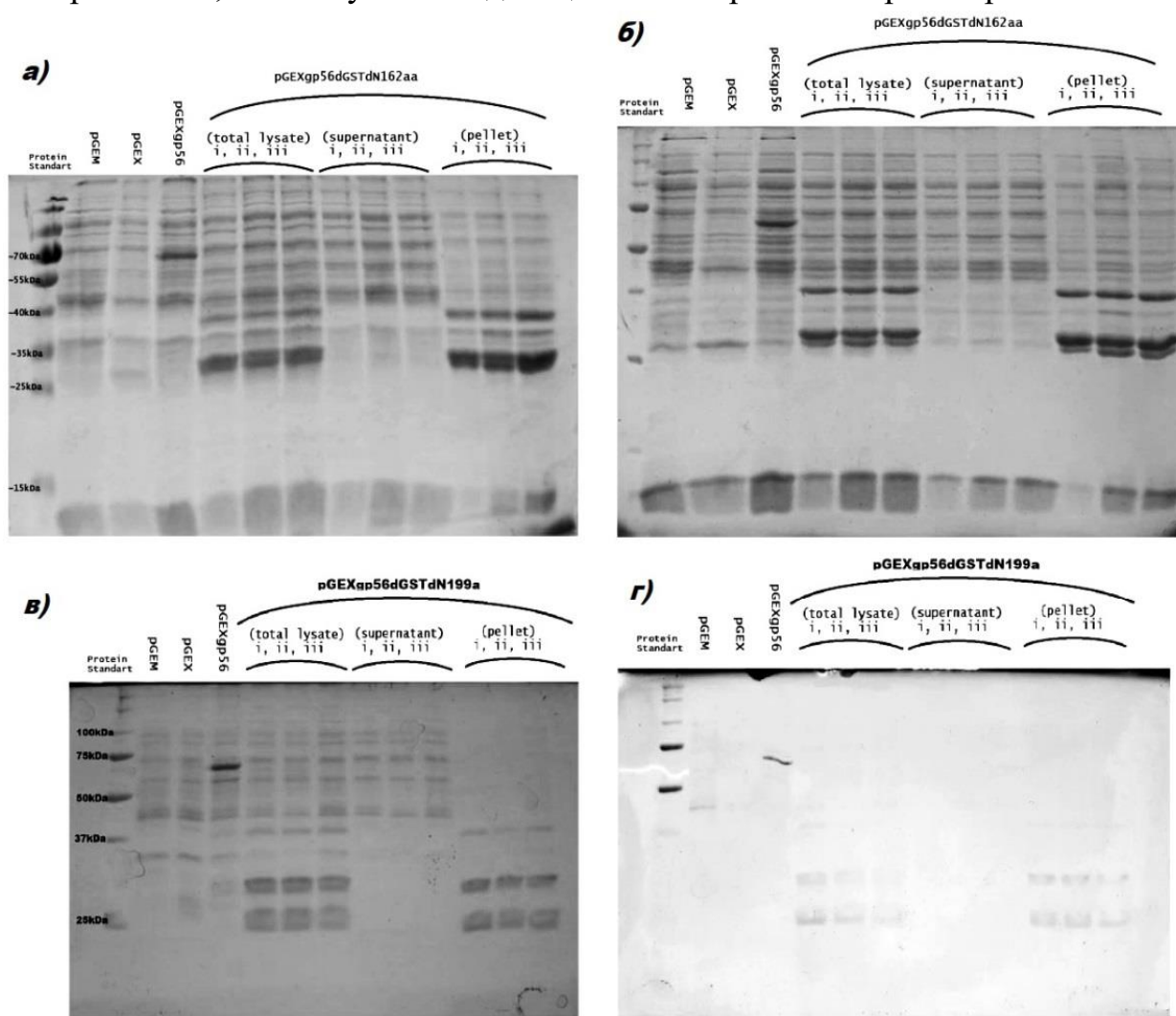


Рис. 3\*. Электрофореграмма продуктов экспрессии рекомбинантного gr56 с делетированными 162 (а, б) и 199 (в, г) аминокислотными остатками (\*В качестве контрольных образцов использовали продукты экспрессии в трансформантах по плазмиде без вставки (pGEM), с вставкой гена глутатион-S-трансферазы (pGEX), а также с вставкой трансляционно сшитого gr56-GST (pGEXgp56); часть образцов после смешивания с Sample-буфером инкубировали при +98°C в течение 10 минут (а, в), другая часть образцов не подвергалась термической обработке (б, г); окраска Coomassie Brilliant Blue G-250)

На электрофореграммах помимо нижних полос целевых белковых продуктов, имеющих молекулярную массу 27,9 кДа (Рис. 3а, 3б) и 23,7 кДа (рис. 3в, 3г), имеются также полосы, указывающие на белки массой ~37 кДа и ~30 кДа соответственно, при этом эти белки отсутствуют в контрольных образцах и, подобно целевому белку, отсутствуют во фракции супернатанта. Причины образования данного побочного продукта пока не ясны.

**Основные выводы.** Исходя из результатов роста бактериофага φ24В на мутантных по различным элементам системы синтеза ЭПС штаммах, можно предположить, что ЭПС не принимают участие в адсорбции данного вируса на клеточной поверхности. Данные мутанты были представлены только rough-штаммами, поэтому для подтверждения этого предположения необходимо зафиксировать отсутствие различий в росте или лизогенизации для О-антиген-содержащих штаммов, имеющих аналогичные мутации в ферментах синтеза ЭПС.

Полученные делеционные рекомбинантные формы адгезина gr56 являются нерастворимыми. Для получения растворимых вариантов данного белка планируется внесение более крупных делеций в кодирующую последовательность и/или создание рекомбинантной формы белка, трансляционно сшитого с доменами тримеризации.

### Литература

1. Młynarczyk G. et al. Lysogenic conversion as a factor influencing the vancomycin tolerance phenomenon in *Staphylococcus aureus* // The Journal of Antimicrobial Chemotherapy. – 1997. – Vol. 40 (1). – P. 136-137.
2. Nakayama K. et al. The complete nucleotide sequence of CTX, a cytotoxin-converting phage of *Pseudomonas aeruginosa*: implications for phage evolution and horizontal gene transfer via bacteriophages // Molecular Microbiology. – 1999. – Vol. 31 (2). – P. 399-419.
3. Sausset R. et al. New insights into intestinal phages // Mucosal Immunology. – 2020. – P. 1-11.
4. Griffin P.M., Tauxe R.V. The epidemiology of infections caused by *Escherichia coli* O157: H7, other enterohemorrhagic *E. coli*, and the associated hemolytic uremic syndrome // Epidemiologic reviews. – 1991. – Vol. 13 (1). – P. 60-98.
5. Donnenberg M.S., Whittam T.S. Pathogenesis and evolution of virulence in enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli*. // The Journal of Clinical Investigation. – 2001. – Vol. 107 (5). – P. 539-548.
6. Golomidova A.K. et al. O antigen restricts lysogenization of non-O157 *Escherichia coli* strains by Stx-converting bacteriophage phi24B // Scientific reports. – 2021. – Vol. 11 (1). – P. 1-9.

7. Junkermeier E.H., Hengge R. A Novel Locally c-di-GMP-Controlled Exopolysaccharide Synthase Required for Bacteriophage N4 Infection of *Escherichia coli* // *Mbio.* – 2021. – Vol. 12 (6). – P. e03249-21.
8. Nowicki D. et al. ppGpp-dependent negative control of DNA replication of Shiga toxin-converting bacteriophages in *Escherichia coli* // *Journal of bacteriology.* – 2013. – Vol. 195 (22). – P. 5007-5015.
9. Jeong J.Y. et al. One-step sequence-and ligation-independent cloning as a rapid and versatile cloning method for functional genomics studies // *Applied and environmental microbiology.* – 2012. – Vol. 78 (15). – P. 5440-5443.

### **Список публикаций по теме работы**

Golomidova A.K., Efimov A.D., Kulikov E.E., Kuznetsov A.S., Belalov I.S., Letarov A.V. O antigen restricts lysogenization of non-O157 *Escherichia coli* strains by Stx-converting bacteriophage phi24B // *Scientific reports.* – 2021. – Vol. 11 (1). – P. 1-9.

#### *Тезисы докладов*

1. Кузнецов А.С., Ефимов А.Д., Бойко К.М., Голомидова А.К., Куликов Е.Е., Летаров А.В. Распознавание клетки-хозяина бактериофагом φ24В //3-й Российский микробиологический конгресс – Псков, 2021. – С. 211-212. (тезисы и постерный доклад)
2. Куликов Е.Е., Голомидова А.К., Ефимов А.Д., Кузнецов А.С., Летаров А.В. Лизогенизация штаммов *Escherichia coli*, не относящихся к серотипу O157, Stx-конвертирующим бактериофагом phi24B связана с потерей O-антигена и снижением приспособленности //3-й Российский микробиологический конгресс – Псков, 2021. – С. 212. (тезисы и постерный доклад)
3. Кузнецов А.С., Куликов Е.Е., Летаров А.В. Особенности роста бактериофага λ\_2B8 // Труды 64-й Всероссийской научной конференции МФТИ. Биологическая и медицинская физика – 2021. – С. 145-146. (тезисы и устный доклад).

### **Основные достижения**

1. Диплом победителя в конкурсе молодых ученых Российского микробиологического конгресса, 2021.
2. Диплом за лучший доклад в секции биотехнологии, физико-химической и молекулярной биологии 64-й Всероссийской научной конференции МФТИ, 2021.



**Alexander Sergeyevich Kuznetsov**  
**RESEARCH CENTER OF BIOTECHNOLOGY RAS**

**LAMBDROID BACTERIOPHAGE  $\phi$ 24B GROWTH ON STRAINS  
WITH DISRUPTED EPS SYNTHESIS  
AND OBTAINING RECOMBINANT FORMS OF PHAGE ADHESIN**

**Abstract**

Stx-converting lambdoid coliphage  $\phi$ 24B has a wide range of hosts among strains of *Escherichia coli* with suppressed O antigen synthesis, while the natural lysogens carrying this phage are represented by O antigen-synthesizing variants. The mechanism of adsorption of the  $\phi$ 24B phage on the surface of target cells has not yet been determined and might involve overcoming the O-antigen layer. To study the adsorption properties of this virus, a preparation of a bacteriophage was obtained, its growth on various strains including those mutant in the genes for the synthesis of exopolysaccharides (EPS) was shown, and recombinant deletion variants of the putative receptor-recognizing protein of the studied bacteriophage were analyzed.

**Keywords:** bacteriophages, lysogenic conversion, phage adsorption, receptor-binding proteins (RBPs), receptor of phage, O antigen, bacterial exopolysaccharides, recombinant proteins

**Захарычева Алиса Павловна**

аспирант ФИЦ Биотехнологии РАН 2 года обучения

профиль 1.5.11. Микробиология

e-mail: [alice-keytown@ya.ru](mailto:alice-keytown@ya.ru)

Научный руководитель

**Хижняк Татьяна Владимировна**

доктор биологических наук,

зав. лабораторией экологии

и геохимической деятельности микроорганизмов



## **ИЗУЧЕНИЕ ГИДРОЛИТИЧЕСКИХ ФЕРМЕНТОВ ЭКСТРЕМАЛЬНО ГАЛОАЛКАЛОФИЛЬНОЙ АРХЕИ *NATRONOBIFORMA CELLULOSITROPHA***

**Аннотация.** Гиперсоленые среды – довольно простые экосистемы, населенные в основном экстремально галофильными археями. Галоархеи интересны с точки зрения изучения их биоразнообразия и адаптационных механизмов, позволяющих им выживать в условиях осмотического стресса. В биотехнологии особый интерес вызывают гидролитические ферменты галоархей, так как они могут сохранять свою активность в производственных специфических условиях схожих с естественной нишей организма. Ген гликозидазы из семейства GH5, полученный из новой галоархеи *Natronobiforma cellulositropha* AArce15, был успешно клонирован в двух различных организмах: *Escherichia coli* и *Haloferax volcanii*.

**Ключевые слова:** гиперсоленая среда, галоархеи, гидролитические ферменты, гликозидаза

К экстремофилам относится группа организмов, которые способны обитать в экстремальных условиях окружающей среды, например, при высокой/ низкой температуре, pH, солености и давлении. Экстремофильные микроорганизмы развили различные стратегии и механизмы для выживания [1], например, особенные ферменты (экстремозимы).

Среди наиболее изученных областей применения экстремофилов в биотехнологии – производство ферментов, поскольку микроорганизмы из экстремальных мест обитаний являются естественным их источником. Экстремозимы можно реализовать в различных отраслях – биопереработка растительного сырья, биоремедиация, фармацевтика, сельское хозяйство, пищевая и текстильная промышленности, в качестве стабильных биокатализаторов в жестких условиях производства. Каждый фермент

определенной группы экстремофилов способен работать в специфических условиях схожих с естественной нишей организма.

В мире отмечается возрастающий спрос и крупномасштабная торговля ферментами. В одном из отчетов отмечается, что мировой рынок специальных ферментов (включая экстремозимы) достиг \$4,0 млрд в 2018 г. [1], а в 2019 г. мировой рынок ферментов оценивался в \$8,63 млрд. Ожидается, что он достигнет \$14,5 млрд к 2027 г., т.е. рост в 6,5% с 2020 по 2027 гг. [2]. Объем производства ферментов в России невысокий и крайне узкоспециализированный, а промышленная база по получению ферментов практически отсутствует. Внутренний рынок остается ненасыщенным - потребности российской промышленности в ферментных препаратах существенно выше предложения. В 2016 г. отечественный рынок ферментов на 95,6% состоял из импорта [3].

Среди различных экстремальных мест обитаний для поиска новых микроорганизмов и изучения их ферментов гиперсоленые среды вызывают особый интерес. С экологической точки зрения подобные среды являются относительно простыми экосистемами с высокой плотностью микробных сообществ. В отложениях гиперсоленых водоемов обитают разнообразные, уникальные, еще недостаточно изученные микробные сообщества [4].

Галофильные археи класса *Halobacteria* являются доминирующей группой микроорганизмов среди обитателей гиперсоленых сред. Внутри семейства *Halobacteriaceae* описано более 40 родов и более 150 видов [5]. Большинство представителей семейства относятся к экстремальным галофилам: для роста клеток необходимо не менее 100–150 г/л соли, при этом в растворах с меньшей концентрацией клетки лизируются. Согласно современным знаниям, галоархеи – это в основном аэробные гетеротрофы, за исключением некоторых факультативных анаэробов. Для защиты от фотоокислительного повреждения их клетки, почти все без исключения, содержат розово-красный каротиноидный пигмент бактерируберин [3].

Для баланса с окружающей средой галоархеи накапливают внутри клетки некоторые неорганические соли в высокой концентрации, а также имеют место изменения клеточных структур. Белки галоархей остаются в нативной форме и функциональными: увеличены кислотные остатки преимущественно на поверхности белка, уменьшено количество гидрофобных остатков, имеются дополнительные пептидные вставки с кислыми аминокислотами [6]. Различные гидролитические ферменты (или гидролазы) галофильных архей могут сохранять свою активность и выполнять биологические функции, несмотря на низкую активность воды и высокую температуру среды. Большим потенциалом для биокатализа среди

различных гидролаз галоархей обладает класс гликозидгидролаз или гликозидаз (GH – glycoside hydrolase). В промышленности гликозидазы можно использовать при производстве моющих средств. Выделяют различных представителей этого класса: амилазы, хитиназы, целлюлазы и другие.

Цель исследования – изучение гидролитических ферментов гликозидаз на примере целлюлаз экстремально галоалкалофильной археи. Целлюлазы – это ферменты, которые гидролизуют  $\alpha$ -1,4-гликозидные связи целлюлозы и образуют первичные продукты, такие как глюкоза, целлобиоза и целлоолигосахариды. Задачи – поиск генов, кодирующих ферменты разлагающие целлюлозу; получение клонов *Escherichia coli* и *Haloferax volcanii* со вставкой целевых генов целлюлаз из галоархеи *Natronobiforma cellulositropha* со специальными метками (His6-tag и Strep-tag, соответственно); получение высокого выхода рекомбинантных ферментов при экспрессии гена, а также чистого гомогенного ферментного препарата; характеристика свойств рекомбинантных ферментов и сравнительный анализ двух экспрессионных систем (бактериальной и архейной).

Объектом работы является галоалкалофильная архея – представитель нового рода и вида *Natronobiforma cellulositropha* AArce15. Данный организм был выделен из осадка гиперсоленого щелочного озера на аморфной целлюлозе в качестве субстрата. Штамм растет при оптимальной солености в 4 М Na<sup>+</sup>, pH 8.5-9.0 и показывает высокую гидролитическую активность на средах с аморфной целлюлозой [7]. В геноме данного штамма были обнаружены гены гликозидаз, участвующие в разложении целлюлозы. Одним из таких генов был ген ID 2642502327, кодирующий фермент из семейства GH5 – одного из самых крупных семейств гликозидгидролаз по данным базы CAZy. В семейство входят ферменты с различными активностями: эндоглюканаза (целлюлаза), эндоманнаназа, экзоглюканаза, экзоманнаназа,  $\beta$ -гликозидаза и  $\beta$ -маннозидаза.

Целевой ген эндоглюканазы был клонирован и экспрессирован в двух различных организмах *Escherichia coli* 6–3\_1 BL21-CodonPlus (DE3)-RIPL (плазмида pET-46 Ek/LIC) и *Haloferax volcanii* 3-2\_1 DS70 DpugE2 (плазмида pTA1392). Два разных носителя плазмиды были выбраны для сравнения свойств белка в зависимости от используемой системы экспрессии (бактериальной и архейной). Эндоглюканазные активности рекомбинантных белков по отношению к карбоксиметил целлюлозе (КМЦ) были обнаружены во фракциях растворимых белков обоих клонов.

Для проверки первичной активности эндоглюканазы клона *H. volcanii* 3-2\_1 сверхэкспрессия триптофаном (3 мМ) проводилась при разных

температурах – 25°, 30° и 42°С. Затем клетки были разрушены ультразвуковым для получения фракции растворимых белков. Активность фермента проверялась в буфере с КМЦ через разные промежутки времени – 0, 3, 24 и 86 ч – при помощи ДНСК. Результаты опыта показали, что активность эндоглюканазы низкая – требуется длительное время инкубации фермента, а оптимальная температура сверхэкспрессии – 30°С (Рис. 1).

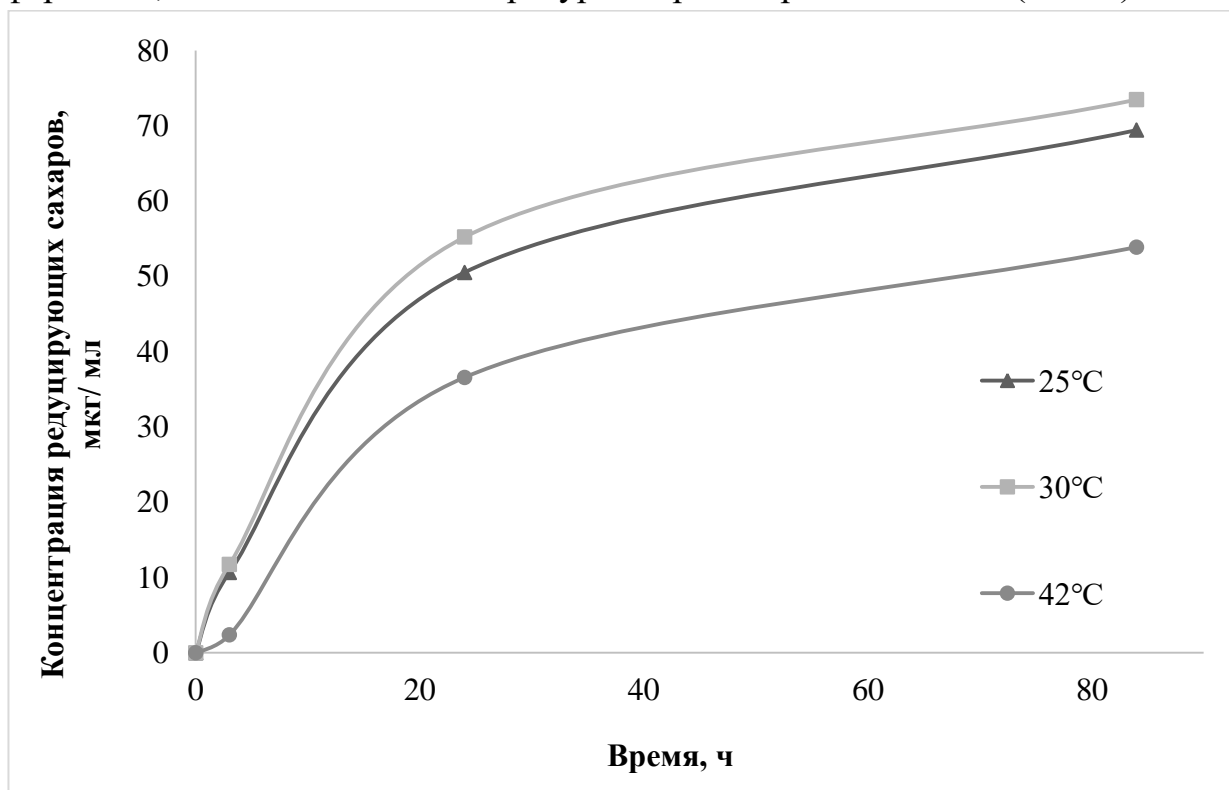


Рис. 1\*. Эндоглюканазная активность фермента в зависимости от температуры сверхэкспрессии (Инкубация фракции растворимых белков в буфере с КМЦ (2 М NaCl, 50 мМ Tris-HCl, КМЦ 0,4%, рН 7,5) при t=37 °С; активность измеряли колориметрическим методом ДНСК (динитросалициловая кислота) [8])

Для увеличения количества эндоглюканазы из клона *H. volcanii* 3-2\_1 была проведена сверхэкспрессия гена гликозидазы в различных вариантах. Исходный протокол №1 был изменен: увеличивали концентрацию индуктора (триптофан), а также время экспрессии (Табл. 1).

Далее клетки *H. volcanii* 3-2\_1 были разрушены с получением лизата, который был разделен на две фракции: растворимые белки и остатки клеток. Эффективность протоколов оценивали по активности фермента в полученных фракциях. Результаты проверки активности гликозидазы показали (Рис. 2), что увеличение концентрации индуктора не сильно, а увеличение времени экспрессии – наоборот – существенно влияют на экспрессию гена.

Протоколы сверхэкспрессии

№ протокола	Количество триптофана, мМ	Время культивации, ч
1	3	2
2	3	24
3	3, затем 1*	24, затем 2*
4	6, затем 3*	24, затем 2*

\*Дополнительное количество индуктора и дополнительное время экспрессии

Был проведен сравнительный анализ активности фермента на различных полимерах (бета-глюкан, лихенан, КМЦ) (Рис. 2). Наибольшая активность наблюдалась на бета-глюкане во всех протоколах во фракции растворимых белков. Незначительная активность была отмечена в клеточной фракции.

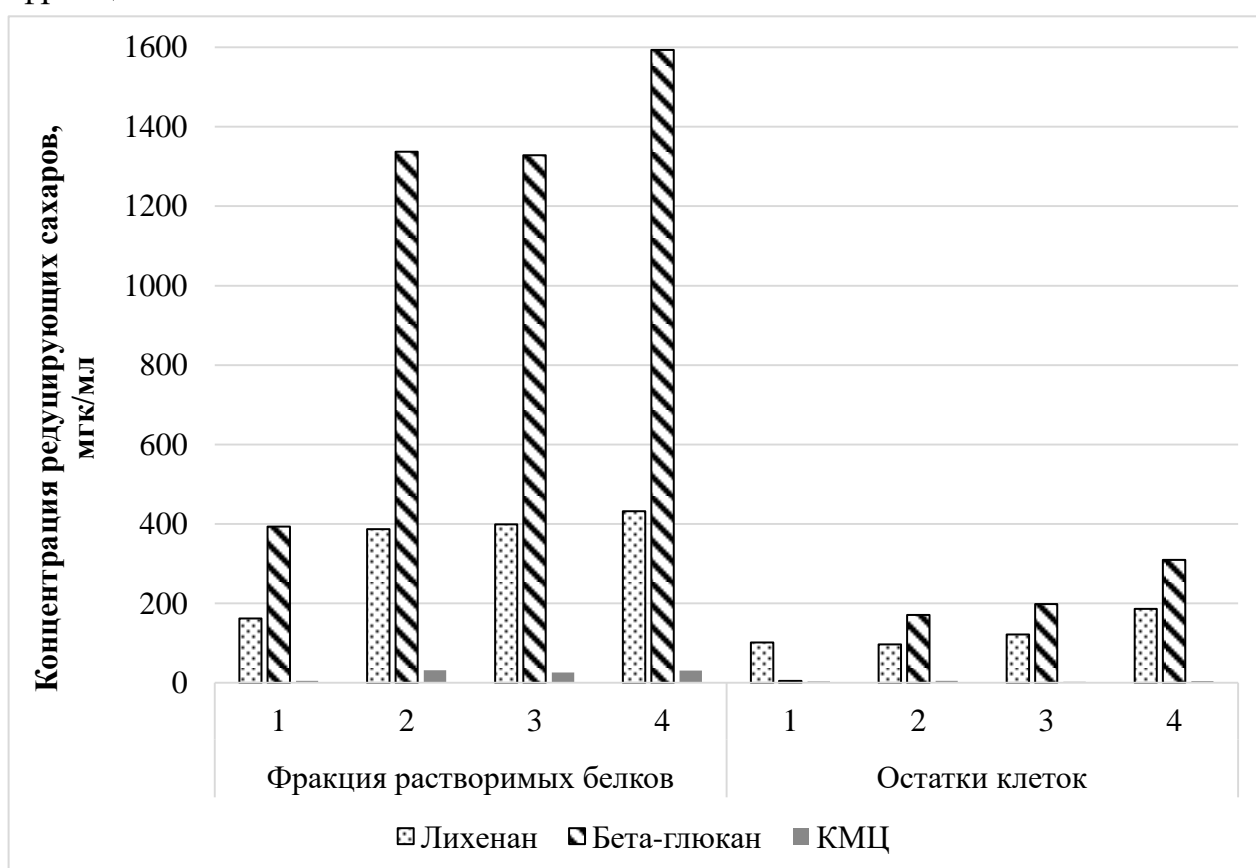


Рис. 2. Эндоглюканазная активность фермента (1, 2, 3 и 4 – номер протокола экспрессии; инкубация 24 ч в буфере с полимером (2 М NaCl, Tris-HCl 50 мМ, полимер 0,4%, pH 7,5) при t=45 °С; активность измеряли колориметрическим методом ДНСК)

Исходно плазида рТА1392 была получена в клоне *H. volcanii* 3-2\_1 со вставкой гена на С-конце со Strep II меткой. Для улучшения конструкции было решено добавить гистидиновую метку (His6-tag).

Для этого были разработаны системы праймеров с сайтами рестрикции и подобраны оптимальные условия реакции ПЦР. Для получения ПЦР-

продуктов были подобраны оптимальные температуры отжига праймеров (Рис. 3). Для каждой пары праймеров был определен диапазон температур отжига по нижней и верхней границе: 60-70°C. Оптимальная температура отжига составила 65,6 °С, т.к. при ней получается максимальный выход целевых и отсутствие побочных продуктов реакции.

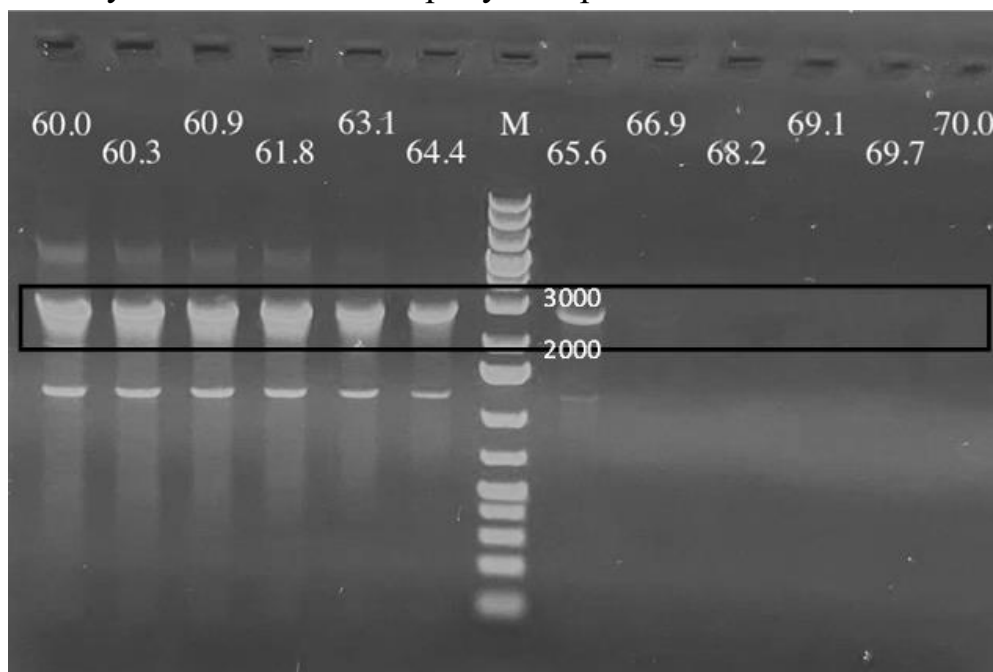


Рис. 3\*. Гель электрофорез ПЦР-продуктов плазмиды со вставкой гена фермента эндоглюканазы у *H. volcanii* 3-2\_1 (\*Температура от 60 до 70°C, М – маркер GeneRuler 1kb Plus DNA Ladder)

Также для гена эндоглюканазы было рассчитано оптимальное время элонгации в соответствии размером фрагмента – 180 секунд. Для получения фрагментов с липкими концами и последующим их лигированием была проведена рестрикция ПЦР продуктов гена гликозидазы и плазмиды рТА1392 (рестриктазы *CsiI/EcoRI* и *PciI/EcoRI*, соответственно). Проверка фрагментов в гель-электрофорезе показала, что ген гликозидазы (~3000 п.н.) разрезается на участки длиной ~1400 п.н. и ~1600 п.н. Молекулярное моделирование подтвердило, что внутри гена гликозидазы содержится дополнительный сайт рестрикции *CsiI*.

**Основные выводы.** Целевой ген эндоглюканазы из штамма AArce1 5 успешно клонирован в *E. coli* и *H. volcanii*. Сверхэкспрессия лучше проходит при температуре 30°C, активность на КМЦ низкая. Для получения большего количества рекомбинантного фермента из *H. volcanii* 3-2\_1 во фракции растворимых белков был разработан новый протокол сверхэкспрессии. Фермент проявляет наибольшую активность на бета-глюкане. Оптимальная температура отжига праймеров для гена эндоглюканазы составила 65,6°C,

время элонгации – 180 с. Для лигирования ПЦР-продукта гена гликозидазы и плазмиды необходимо подобрать новые праймеры.

### **Литература**

1. Zhu D., Adebisi W.A., Ahmad F., Sethupathy S., Danso B., Sun J. Recent development of extremophilic bacteria and their application in biorefinery // *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. – 2020. – Vol. 8 (6). – P. 1-18.
2. Espina G., Atalah J., Blamey J.M. Extremophilic oxidoreductases for the industry: five successful examples with promising projections // *Frontiers Bioengineering and Biotechnology*. – 2021. – Vol. 9 (8). – P. 1-16.
3. Tolkacheva A.A., Cherenkov D.A., Korneeva O.S., Ponomarev P. G. Enzymes of industrial purpose - review of the market of enzyme preparations and prospects for its development // *Proceedings of VSUET*. – 2018. – Vol. 79 (4). – P. 197-203.
4. Ma Y., Galinski E.A., Grant W.D., Oren A., Ventosa A. Halophiles 2010: life in saline environments // *Applied and Environmental Microbiology*. – 2010. – Vol. 76 (21). – P. 6971-6981.
5. Amoozegar M.A., Siroosi M., Atashgahi S., Smidt H., Ventosa A. Systematics of haloarchaea and biotechnological potential of their hydrolytic enzymes // *Microbiology (UK)*. – 2017. – Vol. 163 (5). – P. 623-645.
6. Reed C.J., Lewis H., Trejo E., Winston V., Evilia C. Protein adaptations in archaeal extremophiles // *Archaea*. – 2013. – Vol. 2013 (9). – P. 373275.
7. Sorokin D.Y., Khijniak T.V., Kostrikina N.A., Elcheninov A.G., Toshchakov S.V., Bale N.J., Sinninghe Damste J.S., Kublanov I.V. *Natronobiforma cellulositropha* gen. nov., sp. nov., a novel haloalkaliphilic member of the family *Natrialbaceae* (class *Halobacteria*) from hypersaline alkaline lakes // *Systematic and Applied Microbiology*. – 2018. – Vol. 41 (4). – P. 355-362.
8. Miller G.L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar // *Analytical Chemistry*. – 1959. – Vol. 31 (3). – P. 426-428.

### **Список публикаций по теме работы**

#### *Тезисы докладов*

1. Захарычева А.П., Хижняк Т.В., Ельченинов А.Г. Новые экстремально гало(алкало)фильные гидролитические эвриархеи гиперсоленых озер // 3-й Российский микробиологический конгресс (г. Псков, 26 сентября - 1 октября 2021 г.): материалы конгресса. – 2021. – С. 185-186. – ООО «Конкорд». (публикация и постерный доклад).



2. Захарычева А.П. Экстремально гало(алкало)фильные гидролитические эвриархеи гиперсоленых озер // Сборник тезисов отчётной конференции аспирантов ФИЦ Биотехнологии РАН: направление подготовки 06.06.01 Биологические науки (21-25 июня 2021 г.) / под ред. В.О. Попова, А.Н. Фёдорова; сост. Е.С. Титова. – М.: ВАШ ФОРМАТ. – 2021. – С. 151-156. (тезисы и устный доклад)

**Zakharycheva Alisa Pavlovna**  
**RESEARCH CENTRE OF BIOTECHNOLOGY RAS**

**HYDROLYTIC ENZYMES STUDY FROM THE EXTREMELY  
HALOALKALOPHILIC ARCHAEA *NATRONOBIFORMA*  
*CELLULOSITROPHA***

**Abstract**

Hypersaline environments are rather simple ecosystems inhabited mainly by extremely halophilic archaea. Haloarchaea are interesting subject for study their biodiversity and adaptation mechanisms that allow them to survive under osmotic stress. The most interest in biotechnology are the hydrolytic enzymes of haloarchaea because they can maintain their activity under specific conditions like the natural niche. Glycosidase gene GH5 was received from the new haloarchaea *Natronobiforma cellulositropha* AArce15 and successfully cloned in two different organisms, *Escherichia coli* and *Haloferax volcanii*.

**Keywords:** hypersaline environment, haloarchaea, hydrolytic enzymes, glycosidase

*Работа выполнена в рамках гранта РФФ №20-14-00250*

**Мальцева Анастасия Игоревна**

аспирант ФИЦ Биотехнологии РАН 2 года обучения

профиль 1.5.11. Микробиология

e-mail: an.malts@mail.ru

Научный руководитель

**Фролов Евгений Николаевич**

кандидат биологических наук,

н.с. лаборатории метаболизма

экстремофильных прокариот



## ИЗУЧЕНИЕ РАЗНООБРАЗИЯ ПУТЕЙ АВТОТРОФНОЙ АССИМИЛЯЦИИ УГЛЕРОДА У ТЕРМОФИЛЬНЫХ ПРОКАРИОТ

**Аннотация.** Показано одновременное функционирование пути Вуда-Льонгдаля и трансальдозного варианта цикла Кальвина у *Desulfothermobacter acidiphilus* 3408-1 в ходе автотрофного роста. Дана физиологическая и филогенетическая характеристика штамма 3907-1М, являющегося первым автотрофным представителем рода *Thermodesulfovibrio*. Показана высокая интенсивность темновой ассимиляции углекислоты в термальных источниках кальдеры Узон полуострова Камчатки, а также определён состав микробных сообществ исследуемых источников.

**Ключевые слова:** автотрофия, трансальдозный вариант цикла Кальвина, путь Вуда-Льонгдаля, *Desulfothermobacter acidiphilus*, природные сообщества, чистые культуры, *Thermodesulfovibrio*

Цикл углерода является определяющим для биосферы Земли, важнейшим этапом которого является ассимиляция углекислоты автотрофными организмами. В настоящее время описано 8 путей фиксации CO<sub>2</sub> [1-3], а интенсивность открытия новых механизмов ассимиляции углекислоты и уникальных модификаций уже известных путей постоянно возрастает. Одним из наиболее перспективных объектов исследования для поиска новых автотрофных путей являются термофильные микроорганизмы, для которых характерно необычайное разнообразие биохимических механизмов. Целью данной работы является исследование разнообразия механизмов автотрофной фиксации CO<sub>2</sub> у термофильных прокариот, в том числе поиск и изучение новых механизмов ассимиляции CO<sub>2</sub>, выявление модификаций уже известных путей автотрофной ассимиляции CO<sub>2</sub>, и исследование эволюции процессов первичной продукции органического

вещества, играющих важнейшую роль в развитии и существовании жизни на нашей планете.

На предыдущем этапе работы анализ генома *Desulfothermobacter acidiphilus* позволил выявить гены двух путей фиксации углекислоты – трансальдозного варианта цикла Кальвина и пути Вуда-Льюнгаля. Для ответа на вопрос о том, работают два пути одновременно или же по отдельности, нами был выполнен протеомный анализ. Биомассу *D. acidiphilus* 3408-1 получали при культивировании в автотрофных условиях в присутствии водорода (опыт) и в гетеротрофных условиях в присутствии глюкозы (контроль). В обоих вариантах культивирование проводили при 55°C и pH 4,5.

Анализ протеомных данных показал, что все гены, кодирующие ферменты трансальдозного варианта цикла Кальвина и пути Вуда-Льюнгаля, относились к числу up-regulated. Например, экспрессия трансальдозы (peg.1819) в автотрофных условиях увеличивалась в 8,7 раза, РубисКО (peg.1818) в 4,9 раза, ацетил-КоА синтазы в 50,7 раз, СО-дегидрогеназы в 16,8 раз. Полученные результаты чётко указывают на одновременное участие цикла Кальвина и пути Вуда-Льюнгаля в ассимиляции углекислоты у *D. acidiphilus* 3408-1 при автотрофном росте в оптимальных для данного микроорганизма условиях.

С целью доказать функционирование именно трансальдозного, а не седогептулозобисфосфатного, варианта цикла Кальвина нами было произведено измерение активностей ключевых ферментов данного пути. Было установлено, что карбоксилазная активность РубисКО в клеточном экстракте *D. acidiphilus* 3408-1 составила 23,3 нмоль/мин/мг белка, активность фосфорибулокиназы - 12 нмоль/мин/мг белка, а трансальдозная активность составила 63 нмоль/мин/мг белка.

Было выдвинуто предположение о том, что вклад каждого пути в общую ассимиляцию углерода может зависеть от внешних факторов, таких как температура, pH или окислительно-восстановительный потенциал среды. На текущем этапе выполнения работ было проведено исследование по влиянию температуры на выбор между автотрофными путями. Значительного изменения экспрессии ключевых генов белков пути Вуда-Льюнгаля при изменении температуры не происходило. Для ферментов цикла Кальвина изменение температуры оказывало влияние на экспрессию генов тех ферментов цикла, которые также принимают участие в центральном метаболизме углеводов, но не на экспрессию гена ключевого фермента цикла - РубисКО.

Из проб Столбовских термальных источников острова Кунашир в хемолитоавтотрофных условиях в присутствии водорода и сульфата был выделен штамм 3907-1М. Новый изолят являлся облигатным анаэробом и термофилом, рос автотрофно в присутствии сульфата и водорода, при этом конечным продуктом метаболизма являлся сульфид. Последовательность гена 16S рРНК штамма 3907-1М имела сходство 97,65 % с гомологичной последовательностью *Thermodesulfovibrio aggregans*. Средняя идентичность нуклеотидных последовательностей (ANI) геномов штамма 3907-1М и валидно описанных представителей рода *Thermodesulfovibrio* составила 76-87%, что значительно ниже 95% межвидового барьера. На основании вышеприведённых результатов и филогенетического анализа нами предложен новый вид в роде *Thermodesulfovibrio autotrophicus*. Интересно, что все описанные до настоящего времени представители данного рода являлись гетеротрофами, и, таким образом, штамм 3907-1М является первым автотрофным представителем рода *Thermodesulfovibrio*. Анализ генома штамма 3907-1М позволил выявить генный кластер, кодирующий ферменты трансальдозазного варианта цикла Кальвина, в том числе ключевые рибулозо-1,5-бисфосфат карбоксилазу/оксигеназу III типа (peg.1026) и трансальдозазу (peg.1027).

Ранее из Камчатской пробы (78°C; pH 6,0) в анаэробных хемолитоавтотрофных условиях была получена устойчивая накопительная культура *Pyrobaculum ferrireducens* 3827, восстанавливающая элементную серу (акцептор) до сульфида в присутствии водорода (донор). Исходя из геномных данных было сделано предположение о том, что представители данного рода осуществляют фиксацию CO<sub>2</sub> через дикарбоксилат/4-гидроксипропионатный путь, однако биохимические исследования указывают на функционирование восстановительного ЦТК [4]. Геномный анализ показал наличие у автотрофных видов гена 4-гидроксибутирил-КоА дегидратазы, основного фермента дикарбоксилат/4-гидроксипропионатного пути и 3-гидроксипропионат/4-гидроксибутиратного пути, кроме *Pyrobaculum arsenaticum*. При этом присутствует ген фосфоенолпируваткарбоксилазы, карбоксилирующего фермента дикарбоксилат/4-гидроксипропионатного пути. Гены АТФ-цитратлиазы или цитратсинтазы, основных ферментов восстановительного и обратимого ЦТК, не были обнаружены в геномах представителей рода *Pyrobaculum*.

Было проведено измерение скорости темновой ассимиляции CO<sub>2</sub> в ряде термальных источников кальдеры Узон полуострова Камчатка с последующим таксономическим профилированием микробных сообществ исследуемых источников. Интенсивность темновой ассимиляции

углекислоты в водах термальных источников варьировала в диапазоне 0,65 нмоль CO<sub>2</sub>/мл сутки – 2,67 нмоль CO<sub>2</sub>/мл сутки. Анализ микробных сообществ показал, что микроорганизмы с автотрофным типом метаболизма доминировали в большинстве исследованных источниках. В зависимости от температуры и pH источников доминирующими таксонами являлись представители *Aquificae* (*Hydrogenobaculum*, *Sulfurihydrogenibium*) и цианобактерии. В большинстве исследованных горячих источников на Камчатке (независимо от pH и температуры), было обнаружено большое количество некультивируемых архей, составляющих порой до 87% от всего сообщества и относящиеся к некультивируемым глубоким линиям внутри филумов *Thermoplasmata* (группа A10), *Crenarchaeota* (*Bathyarchaeia*, *Geoarchaeales*, *Nitrososphaeria*), а также гены представителей архей нового филума *Hadarchaeales*.

Также из отобранных в ходе экспедиции проб был получен ряд устойчивых накопительных и чистых культур термофильных автотрофных прокариот (Табл. 1).

Таблица 1

Чистые культуры автотрофных прокариот изолированные из горячих источников Камчатки

Проба	Изолят	T °C	pH	Донор электронов	Акцептор электронов	Ближайший родственник	Сходство по 16S рРНК, %
4228	4228МА	70	6	H <sub>2</sub>	O <sub>2</sub>	<i>Hydrogenobacter hydrogenophilus</i>	99,6
4229	4229МА	55	4	H <sub>2</sub>	сульфат	<i>Desulfurella acetivorans</i>	99,8
4233	4233МА	65	6	H <sub>2</sub>	сера	<i>Brockia lithotrophica</i>	99,6

#### Основные выводы:

- 1) В ассимиляции углекислоты у *D. acidiphilus* 3408-1 при автотрофном росте в оптимальных для данного микроорганизма условиях одновременное участвуют цикл Кальвина и путь Вуда-Льюнгаля.
- 2) Температура окружающей среды не оказывает значительного влияния на изменение вклада между циклом Кальвина и путём Вуда-Льюнгаля в общую ассимиляцию углекислоты у *D. acidiphilus* 3408-1.
- 3) На основании физиологической и филогенетической характеристик штамма 3907-1М предложен новый вид *Thermodesulfovibrio autotrophicus*, являющегося первым автотрофным представителем рода.
- 4) Проведен геномный анализ *Pyrobaculum ferrireducens* 3827 и автотрофных представителей рода.

- 5) Показана высокая интенсивность темновой ассимиляции углекислоты в термальных источниках кальдеры Узон полуострова Камчатки.

### **Литература**

1. Berg I. A. Ecological aspects of the distribution of different autotrophic CO<sub>2</sub> fixation pathways // *Applied and Environment Microbiology*. – 2011. – Vol. 77. – P. 1925-1936.
2. Nunoura T., Chikaraishi Y., Izaki R., Suwa T., Sato T., Harada T., Mori K., Kato Y., Miyazaki M., Shimamura S., Yanagawa K., Shuto A., Ohkouchi N., Fujita N., Takaki Y., Atomi H., Takai K. A primordial and reversible TCA cycle in a facultatively chemolithoautotrophic thermophile // *Science*. – 2018. – Vol. 359. – P. 559-563.
3. Song Y., Lee J.S., Shin J., Lee G.M., Jin S., Kang S., Lee J.K., Kim D.R., Lee E.Y., Kim S.C., Cho S., Kim D., Cho B.K. Functional cooperation of the glycine synthase-reductase and Wood-Ljungdahl pathways for autotrophic growth of *Clostridium drakei* // *Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A.* – 2020. – Vol. 117. – P. 7516-7523.
4. Berg I. A., Kockelkorn D., Ramos-Vera W. H., Say R. F., Zarzycki J., Hügler M., Alber B. E., Fuchs G. Autotrophic carbon fixation in archaea // *Nature Reviews Microbiology*. – 2010. – Vol. 8 (6). – P. 447-460.

### **Список публикаций по теме работы**

#### *Тезисы докладов*

1. Мальцева А.И., Лебединский А.В., Кубланов И.В., Фролов Е.Н. Первый автотрофный представитель рода *Thermodesulfovibrio* // 3-й Российский микробиологический конгресс (26 сентября – 1 октября 2021 г.): материалы конгресса. – Псков: Псковский государственный университет. – 2021. – С. 227.
2. Фролов Е.Н. Мальцева А.И., Черных Н.А., Лебединский А.В., Кубланов И.В. Распространение трансальдозного варианта цикла Кальвина у термофильных прокариот // 3-й Российский микробиологический конгресс (26 сентября – 1 октября 2021 г.): материалы конгресса. – Псков: Псковский государственный университет. – 2021. – С. 82.
3. Мальцева А.И. Изучение разнообразия путей автотрофной ассимиляции углерода у термофильных прокариот // Сборник тезисов отчётной конференции аспирантов ФИЦ Биотехнологии РАН: направление подготовки 06.06.01 Биологические науки (21-25 июня 2021 г.) / под ред. В.О. Попова, А.Н. Фёдорова; сост. Е.С. Титова. – М.: ВАШ ФОРМАТ. – 2021. – С.157-162. (тезисы и устный доклад)

4. Фролов Е.Н., Мальцева А.И., Гололобова А.В., Лебединский А.В., Кубланов И.В. Сульфатредуцирующие прокариоты термальных источников Курило-Камчатского региона // 2-я Всероссийская научная конференция с международным участием Механизмы адаптации микроорганизмов к различным условиям среды обитания (28 февраля – 6 марта 2022 г.). – Иркутск: Издательство ИГУ. – 2022. – С. 98.

**Maltseva Anastasia Igorevna**  
**RESEARCH CENTRE OF BIOTECHNOLOGY RAS**

**EXPLORING THE DIVERSITY OF PATHWAYS OF AUTOTROPHIC  
CARBON ASSIMILATION IN THERMOPHILIC PROKARYOTES**

**Abstract**

The simultaneous functioning of the Wood-Ljungdal pathway and the transaldolase variant of the Kelvin cycle in *Desulfothermobacter acidiphilus* 3408-1 during autotrophic growth is shown. The physiological and phylogenetic characteristics of strain 3907-1M, which is the first autotrophic representative of the genus *Thermodesulfovibrio*, are given. The high intensity of dark assimilation of carbon dioxide in the thermal springs of the Uzon caldera of the Kamchatka Peninsula is shown, and the composition of microbial communities of the studied springs is determined.

**Keywords:** autotrophy, transaldolase variant of the Calvin cycle, Wood-Ljungdahl pathway, *Desulfothermobacter acidiphilus*, natural communities, pure cultures, *Thermodesulfovibrio*

*Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ 20-54-12031 ННИО\_a (протеомный анализ, измерение активности ферментов, высокопроизводительное секвенирование, радиоизотопные методы) и при поддержке Совета по грантам Президента Российской Федерации, проект МК-2776.2021.1.4 (выделение и описание штамма 3907-1M)*

**Сулейманов Руслан Закиевич**

*аспирант ФИЦ Биотехнологии РАН 2 года обучения*

*профиль 1.5.11. Микробиология*

*e-mail: [suleimanov-1972@outlook.com](mailto:suleimanov-1972@outlook.com)*

Научный руководитель

**Дедыш Светлана Николаевна**

*доктор биологических наук,*

*зав. лабораторией молекулярной экологии*

*и филогеномики бактерий*



## **ПОИСК И МЕТАБОЛИЧЕСКАЯ ИНЖЕНЕРИЯ НОВЫХ МЕТАНОТРОФНЫХ БАКТЕРИЙ КАК ПРОДУЦЕНТОВ КОРМОВОГО БЕЛКА ДЛЯ АКВАКУЛЬТУРЫ**

**Аннотация.** *Исследования в рамках кандидатской диссертации ставят целью направленный поиск новых природных высокопродуктивных штаммов метанотрофных бактерий как продуцентов кормового белка на основе метана для аквакультуры, а также оптимизацию их метаболизма с помощью современных подходов геномной и метаболической инженерии. Актуальность этих исследований обусловлена необходимостью развития высокоэффективных аква-хозяйств, опирающихся на современные технологии производства кормов и наличие широкой линейки штаммов-продуцентов. Исследования второго года работы по теме были посвящены отбору полученных в течение первого года штаммов аэробных метанотрофных бактерий для геномных модификаций, а также получению мутантов этих штаммов по генам синтеза гликогена с целью повышения содержания белка в получаемой биомассе.*

**Ключевые слова:** *метанотрофные бактерии, ростовые характеристики, кормовой белок, гликоген, получение мутантов, *Methylococcus**

Аэробные метанотрофы – это уникальная группа бактерий, распространенная повсеместно в экосистемах, где одновременно доступны и метан, и кислород. Микроорганизмы этой группы способны использовать парниковый газ метан (CH<sub>4</sub>) в качестве источника углерода и энергии, играя важную роль в глобальном цикле углерода, в частности, существенно сокращая его выбросы в атмосферу [2; 5; 6; 9].

Большая значимость метанотрофов, однако, не исчерпывается их ролью «метанового фильтра», так как они имеют значительный



биотехнологический потенциал [2]. Одним из наиболее биотехнологически востребованных представителей аэробных метанотрофов является *Methylococcus capsulatus*, обладающий высокой скоростью роста при повышенных температурах и используемый как перспективный продуцент различных метаболитов с добавленной стоимостью, а также белково-витаминового концентрата – «гаприна» [3; 10]. Неуклонно возрастающее число доступных геномных последовательностей метанотрофов рода *Methylococcus* дает возможность глубоко и системно исследовать их метаболический и адаптивный потенциал [7].

Исследования первого года работы по данной теме были посвящены выделению новых штаммов аэробных метанотрофных бактерий, в том числе представителей вида *Methylococcus capsulatus*, из биотопов с повышенными концентрациями метана, таких как активный ил, осадки пресноводных экосистем и покрывающие почвы полигонов ТБО [4; 7]. Наиболее перспективные изоляты, штаммы *M. capsulatus* MIR и KN2, были отобраны для исследований второго года по их генетической модификации и оценке ростовых характеристик мутантных штаммов.

Расшифровка геномов *Mc. capsulatus* MIR и KN2 позволила предположить, что направленная генетическая модификация с делецией генов синтеза гликогена потенциально способна увеличить биотехнологический потенциал штаммов, поскольку гликоген может накапливаться в клетке до содержания в 35%, таким образом, расходуя углерод и энергию ростового субстрата, и снижая содержание белка в конечном продукте [8]. Ранее уже было показано, что элиминирование пути синтеза гликогена у других представителей аэробных метанотрофных бактерий способствует повышению содержания белка в клетках [1]. В геномах *Mc. capsulatus* MIR и KN2 были обнаружены две изоформы гликогенсинтаз – *GlgA1* и *GlgA2*, находящиеся в разных кластерах (Рис. 1). Эти гены и стали мишенью геномной модификации для предотвращения потери углерода на синтез запасных углеродных соединений и увеличения относительного содержания белка в клетках метанотрофа-продуцента.

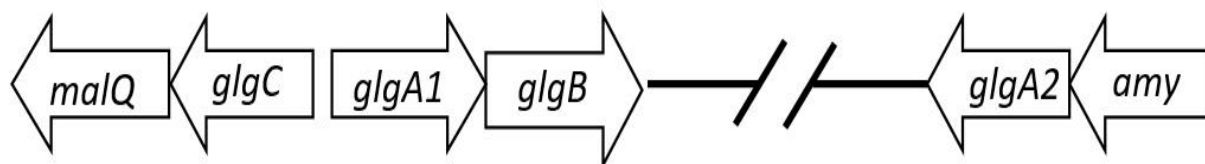


Рис. 1. Кластеры генов, ответственных за метаболизм гликогена у штамма KN2: *glgA1*, *glgA2* – гены гликогенсинтаз; *glgB* – ген фермента ветвления гликогена; *glgC* – ген АДФ-глюкопирофосфорилазы; *malQ* – ген 4- $\alpha$ -глюкантрансферазы; *amyA* – гены  $\alpha$ -амилазы

Для элиминации генов *glgA1* и *glgA2*, кодирующих изоформы гликогенсинтаз, фрагменты ДНК, фланкирующие данные локусы, амплифицировали и клонировали в вектор pK18mob. Далее между этими фрагментами клонировали кассету устойчивости к гентамицину/спектиномицину. Полученными векторами pK18mob:glgA1Gm/Sr и pK18mob:glgA2Gm/Sr трансформировали клетки *E. coli* S-17-1, затем плазмиду переносили в клетки метанотрофа с помощью конъюгации.

На основе *Mc. capsulatus* MIR и KN2 были получены мутантные штаммы  $\Delta glg1$  и  $\Delta glg2$ , дефектные по генам изоформ гликогенсинтаз GlgA1 и GlgA2, соответственно. Однако при попытке получить штаммы, в которых данные гены инактивированы одновременно, пока не увенчались успехом. Было проверено порядка 100 колоний, выросших после конъюгации плазмиды pK18mob:glgA2 в штамм  $\Delta glg1$  каждого из штаммов, однако ни в одной из них не произошла двойная рекомбинация, приводящая к элиминации гена *glgA2*. Данный факт может указывать на летальность одновременной инактивации генов гликогенсинтаз и, соответственно, на ключевую роль синтеза гликогена в метаболизме *Mc. capsulatus* MIR.

Определение ростовых характеристик культур дикого и мутантных штаммов *Mc. capsulatus* MIR на метане и метаноле, а также оптимума концентрации метанола, проводили при культивировании в жидкой среде NMS 2:5. Инкубацию проводили на шейкере (150 об./мин) при температуре 42°C. Рост оценивали путем регулярных измерений оптической плотности культуры на спектрофотометре Eppendorf Biophotometer AG 22331 (Германия) при длине волны 600 нм.

Расчет удельной скорости роста ( $\mu$ , ч<sup>-1</sup>) проводили в экспоненциальной фазе роста культур по формуле:  $\mu = (\ln(OD_2) - \ln(OD_1)) / (t_2 - t_1)$ , где  $OD_1$  и  $OD_2$  – значения оптической плотности культуры в начале и конце экспоненциальной фазы роста,  $t_1$  и  $t_2$  – соответствующие им временные точки.

Для культуры штамма MIR и его мутантов была определена удельная скорость роста на метане, а также определена оптимальная концентрация метанола, как единственного источника углерода и энергии (Рис. 2). Так, при росте на метане скорость роста дикого типа составила 0,22 ч<sup>-1</sup>, тогда как для штамма с  $\Delta glg1$  – 0,14 ч<sup>-1</sup>, а для штамма  $\Delta glg2$  – 0,24 ч<sup>-1</sup>.

Наиболее быстрый рост дикого типа со скоростью 0,29 ч<sup>-1</sup> наблюдался при концентрации метанола 0,2%. Для штамма с  $\Delta glg1$  наибольшая скорость роста составляла 0,27 ч<sup>-1</sup> при концентрации метанола 0,05%. Наиболее высокую скорость роста показал штамм с  $\Delta glg2$  – 0,395 ч<sup>-1</sup> при концентрации

метанола 0,2%. Большая скорость роста штамма с делецией во втором гене косвенно может указывать на более высокую концентрацию белка в метаболически активной клетке.

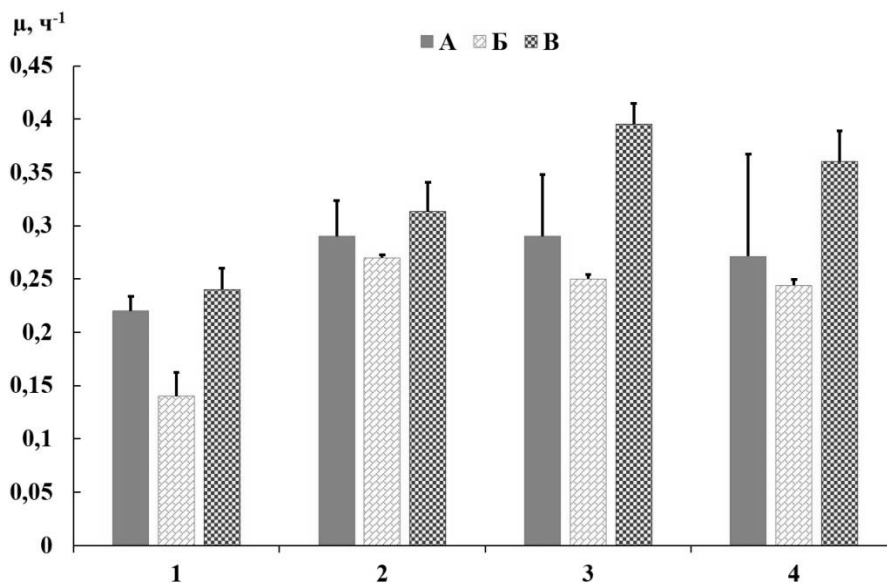


Рис. 2. Удельная скорость роста на метане (1) и различных концентрациях метанола (2 – 0,05%; 3 – 0,2%; 4 – 0,5%) культур дикого типа *Mc. capsulatus* MIR (А) и мутантных (Б – *Mc. capsulatus* MIR  $\Delta$ *glg1*; В – *Mc. capsulatus* MIR  $\Delta$ *glg2*)

**Основные выводы:** В результате работы были получены мутантные штаммы *Mc. capsulatus* MIR и KN2 –  $\Delta$ *glg1* и  $\Delta$ *glg2* - дефектные по генам изоформ гликогенсинтаз *GlgA1* и *GlgA2*, соответственно. Для штамма MIR и его мутантов были получены ростовые характеристики на метане и метаноле, что также предполагается сделать в дальнейшей работе со штаммом KN2 и его мутантами. Величины удельной скорости роста в 0,22-0,395 ч<sup>-1</sup> сопоставимы с таковыми у производственных штаммов, в условиях непрерывного культивирования в ферментере. Начата работа по изучению ростовых характеристик этих штаммов в условиях непрерывного культивирования, с анализом содержания белка в синтезируемой биомассе и его аминокислотного состава. Продолжается работа по получению мутанта *Mc. capsulatus* MIR с делецией обоих генов гликогенсинтаз и апробируется возможность получения этих мутантов путем использования системы CRISPR/Cas9.

### Литература

1. Бут С.Ю., Дедыш С.Н., Попов В.О., Пименов Н.В., Хмеленина В.Н. Конструирование метанотрофа I типа с пониженной способностью аккумулировать гликоген и сахарозу // Прикладная биохимия и микробиология. – 2020. – Т. 56. – № 5. – С. 465-471.

2. Гальченко В. Ф. Метанотрофные бактерии // Москва: ГЕОС. – 2001. – С. 500.
3. Григорян А.Н., Горская Л. Использование природного газа для микробиологического синтеза // Москва: ОНТИ Микробиопром. – 1970. – С. 90.
4. Ошкин И.Ю., Данилова О.В., Сулейманов Р.З., Тихонова Е.Н., Малахова Т.В., Мурашова А.И., Пименов Н.В., Дедыш С.Н. Термотолерантные метанотрофные бактерии из осадков реки Черная, Крым, и оценка их ростовых характеристик // МИКРОБИОЛОГИЯ. – 2021. – Т. 90 – № 5 – С. 553-563.
5. Троценко Ю.А. Хмеленина В.Н. Экстремофильные метанотрофы // под ред. Гальченко В. Ф. Пушино: ОНТИ ПНЦ РАН. – 2008. – С. 206.
6. Conrad R. The global methane cycle: recent advances in understanding the microbial processes involved // Environmental Microbiology. – 2009. – Vol. 1 (5). – P. 285-292.
7. Oshkin I.Y., Danilova O.V., But S.Y., Miroshnikov K.K., Suleimanov R.Z., Belova S.E., Tikhonova E.N., Kuznetsov N.N., Khmelenina V.N., Pimenov N.V., Dedysh S.N. Expanding Characterized Diversity and the Pool of Complete Genome Sequences of *Methylococcus* Species, the Bacteria of High Environmental and Biotechnological Relevance // Frontiers in Microbiology. – 2021. – Vol. 12. – P.756830.
8. Khmelenina V.N., Kalyuzhnaya M.G., Sakharovsky V.G., Suzina N.E., Trotsenko Y.A., Gottschalk G. // Archives of Microbiology – 1999. – Vol. 172 (3). – P. 321-329.
9. Trotsenko Y.A., Murrell J.C. Metabolic aspects of aerobic obligate methanotrophy. // Advances in Applied Microbiology – 2008. – Vol. 63. – P. 183–229.
10. Zhivotchenko A.G., Nikonova E.S., Jorgensen M.H. Copper effect on the growth kinetics of *Methylococcus capsulatus (bath)* // Biotechnology Techniques. – 1995. – Vol. 9 (3). – P. 163-168.

### **Список публикаций по теме работы**

#### *Статьи*

1. Ошкин И.Ю., Данилова О.В., Сулейманов Р.З., Тихонова Е.Н., Малахова Т.В., Мурашова А.И., Пименов Н.В., Дедыш С.Н. Термотолерантные метанотрофные бактерии из осадков реки Черная, Крым, и оценка их ростовых характеристик // МИКРОБИОЛОГИЯ. – 2021. – Т. 90 – № 5 – С. 553-563.

2. Oshkin I.Y., Danilova O.V., But S.Y., Miroshnikov K.K., Suleimanov R.Z., Belova S.E., Tikhonova E.N., Kuznetsov N.N., Khmelenina V.N., Pimenov N.V., Dedysh S.N. Expanding Characterized Diversity and the Pool of Complete Genome Sequences of *Methylococcus* Species, the Bacteria of High Environmental and Biotechnological Relevance // *Frontiers in Microbiology*. – 2021. – Vol. 12. – P.756830.

*Тезисы докладов*

Сулейманов Р.З. Поиск и метаболическая инженерия новых метанотрофных бактерий как продуцентов кормового белка для аквакультуры // Сборник тезисов отчётной конференции аспирантов ФИЦ Биотехнологии РАН: направление подготовки 06.06.01 Биологические науки (21-25 июня 2021 г.) / под ред. В.О. Попова, А.Н. Фёдорова; сост. Е.С. Титова. – М.: ВАШ ФОРМАТ. – 2021. – С. 163-167. (тезисы и устный доклад)

**Suleimanov Ruslan Zakievich**  
**RESEARCH CENTRE OF BIOTECHNOLOGY RAS**

**NOVEL METHANOTROPHIC BACTERIA AS SINGLE-CELL PROTEIN  
SOURCE FOR AQUACULTURE: TARGETED SEARCH  
FOR NEW STRAINS AND METABOLIC ENGINEERING**

**Abstract**

Research within the framework of the Ph.D. thesis aims at a targeted search for new fast-growing strains of methanotrophic bacteria to be used as producers of feed protein from methane for aquaculture, as well as optimization of their metabolism using modern approaches of genetic and metabolic engineering. The relevance of these studies is due to the need to develop highly efficient aquatic farms based on modern feed production technologies and the availability of a wide range of producer strains. The studies of the second year of work on the topic were devoted to the selection of strains from the pool of earlier isolated aerobic methanotrophic bacteria for the purposes of genome modifications, as well as obtaining mutants of these strains on glycogen synthase genes in order to increase the protein content in the resulting biomass.

**Keywords:** methanotrophic bacteria, growth characteristics, feed protein, glycogen, construction of mutants, *Methylococcus*

**Ершов Алексей Павлович**

аспирант ФИЦ Биотехнологии РАН 3 года обучения

профиль 1.5.11. Микробиология

e-mail: e.alexey.mail@yandex.ru

Научный руководитель

**Назина Тамара Николаевна**

доктор биологических наук,

зав. лабораторией нефтяной микробиологии



## УГЛЕВОДОРОДОКИСЛЯЮЩИЕ БАКТЕРИИ ИЗ НЕФТЯНЫХ ПЛАСТОВ РОССИИ И КАЗАХСТАНА И ИХ БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИЙ ПОТЕНЦИАЛ

**Аннотация.** Работа посвящена изучению филогенетического разнообразия углеводородокисляющих бактерий в нефтяных пластах России и Казахстана и оценке их потенциала для применения в биотехнологиях увеличения нефтеотдачи и подавления коррозии нефтепромыслового оборудования. Исследован состав микробных сообществ пластовых вод пяти месторождений, выделены чистые культуры бактерий, способных к аэробному окислению компонентов нефти и анаэробному восстановлению нитрата. Штамм *Marinobacter lutaoensis* KAZ22 приспособлен к условиям высокотемпературного нефтяного пласта с высокой солёностью пластовой воды и способен использовать алканы нефти для аэробного роста. На основании анализа генома и хемотаксономических признаков углеводородокисляющая, денитрифицирующая бактерия, штамм HO-A22, предварительно отнесена к новому виду '*Ensifer oleophilus*'.

**Ключевые слова:** микробиологические методы увеличения нефтеотдачи, углеводородокисляющие бактерии, биосурфактанты, галотолерантные бактерии, образование сульфида, денитрификация, геномы, высокопроизводительное секвенирование

Значительная часть нефтяных месторождений в мире эксплуатируется с применением третичных, в том числе микробиологических, методов увеличения нефтеизвлечения. Одним из таких методов является стимулирование роста аборигенной микробиоты нефтяных пластов с использованием технологии заводнения, заключающейся в нагнетании в пласт воды с растворёнными в ней питательными веществами, которые могут ассимилироваться микроорганизмами этого коллектора [1]. Разнообразие метаболических возможностей прокариот в таких микробных сообществах

определяет спектр биотехнологий, потенциально применимых на различных нефтяных месторождениях.

Поверхностно-активные вещества, продуцируемые микроорганизмами (биосурфактанты), широко применяются в методах увеличения нефтеотдачи: благодаря способности снижать поверхностное и межфазное натяжение на границе нефти и пластовой воды, эти метаболиты влияют на вытеснение нефти [2]. Особый интерес представляют углеводородокисляющие бактерии, способные существовать в условиях нефтяного пласта и выделять биосурфактанты в процессе биodeградации нефти. Поступление с нагнетаемой водой растворённого кислорода и минеральных солей азота и фосфора способствует росту этих бактерий и окислению ими алканов в призабойной зоне нагнетательных скважин. Образующиеся ими метаболиты поступают в бескислородную зону пластов, где используются анаэробными микроорганизмами, что приводит к увеличению нефтеизвлечения из этих коллекторов.

С углеводородокисляющими бактериями связана и другая группа биотехнологий, заключающаяся в снижении образования сульфида в нефтяном пласте и подавлении коррозии нефтепромыслового оборудования за счёт накопления нитрит-иона, выделяемого денитрифицирующими микроорганизмами. Многие органотрофные бактерии, окисляющие компоненты нефти в аэробных условиях, способны к существованию и в бескислородной зоне нефтяного пласта при наличии в пластовой воде нитратов, закачиваемых туда вместе с нагнетаемой водой [3]. Восстанавливая нитрат-ионы до нитритов, эти микроорганизмы препятствуют развитию сульфидогенной микробиоты нефтяного пласта и предотвращают образование сульфида в пласте [4]. Изучение физиологических и геномных характеристик таких прокариот не только представляет фундаментальный интерес для нефтяной микробиологии, но и является ключевым этапом разработки биотехнологий снижения образования сульфида и повышения нефтеотдачи на этих месторождениях.

Целью работы являлось изучение разнообразия углеводородокисляющих бактерий в нефтяных пластах России и Казахстана, выделение чистых культур микроорганизмов, способных к аэробному окислению компонентов нефти и анаэробному восстановлению нитрата, и оценка возможности их применения в биотехнологиях увеличения нефтеизвлечения и подавления коррозии нефтепромыслового оборудования.

Объектом исследования были микробные сообщества ряда нефтяных пластов, расположенных в России на территории Татарстана (Восточно-Анзирское, Ромашкинское, Черёмуховское) и в Республике Казахстан

(Каражанбас и Узень). Месторождения Татарстана характеризовались низкой температурой и высокой минерализацией пластовой воды; исследуемые месторождения Казахстана имели высокую температуру (45–77°C) и минерализацию пластовой воды, близкую к солёности морской воды, используемой для нагнетания в эти пласты.

Состав микробных сообществ пластовых вод из исследуемых месторождений был проанализирован методом высокопроизводительного секвенирования V3-V4 региона гена 16S рРНК на платформе Illumina MiSeq (США). Среди углеводородоокисляющих и/или денитрифицирующих представителей этих сообществ преобладали бактерии филумов *Actinobacteria*, *Alphaproteobacteria*, *Firmicutes* и *Gammaaproteobacteria*. Из полученных накопительных культур были выделены чистые культуры бактерий, способных к окислению алканов нефти. На основании анализа генов 16S рРНК эти штаммы были отнесены к родам *Bacillus*, *Ensifer*, *Gordonia*, *Halomonas*, *Marinobacter*, *Nocardia*, *Rhodococcus* и *Pseudomonas*.

Для штаммов *Marinobacter lutaoensis* KAZ22 из нефтяного месторождения Узень (Республика Казахстан) и *Ensifer adhaerens* HO-A22 из Черёмуховского месторождения тяжёлой нефти (Татарстан, РФ) было проведено полногеномное секвенирование на платформе Illumina HiSeq 2500 (США). Анализ 120 коровых белков штамма KAZ22 подтвердил его принадлежность к виду *Marinobacter lutaoensis*. Аннотированы гены *ectC*, *ectD* и кластер генов *ectAB*, ассоциированный с аспараткиназой, ответственные за синтез осмопротекторов эктоина и гидроксiekтоина и предположительно позволяющие штамму расти в условиях высокой солёности среды. Аннотированы и детектированы методом гелелектрофореза две копии гена алкан-1-монооксигеназы *alkB*, относящиеся к отдельным филогенетическим кластерам, и ген флавин-зависимой монооксигеназы *almA*, позволяющие штамму эффективно окислять коротко- и длинноцепочечные алканы нефти.

В геноме штамма *E. adhaerens* HO-A22 были аннотированы гены восстановления соединений азота, благодаря которым он был способен расти анаэробно в присутствии нитрата, гены деградации бензоата, потенциально позволяющие ему использовать в качестве субстрата ароматические компоненты нефти, и широкий спектр генов, ответственных за деградацию пептидов, аминокислот и сахаров, что представляется его перспективным свойством для использования в нефтяной биотехнологии. У штамма HO-A22 и типового штамма *Ensifer adhaerens* Casida A определены основные хемотаксономические признаки: состав жирных кислот и фосфолипидов клеточной стенки, доминирующие хиноны дыхательных цепей, а также



спектр используемых субстратов и ферментативная активность. Значения средней идентичности нуклеотидов (ANI) с филогенетически близким представителем этого вида составляло 92%, что в совокупности с хемотаксономическими признаками штамма НО-А22 позволило предположительно отнести его к новому виду “*Ensifer oleophilus*” sp. nov.

**Основные выводы:** В пластовых водах нефтяных месторождений Татарстана (РФ) и Республики Казахстан обнаружено большое разнообразие углеводородокисляющих бактерий. Галотолерантный штамм *Marinobacter lutaensis* KAZ22 способен расти на нефти благодаря окислению коротко- и среднецепочечных алканов. Штамм НО-А22, отнесённый к новому виду “*Ensifer oleophilus*” sp. nov., эффективно окисляет углеводороды нефти, а также способен к анаэробному росту на неуглеводородных субстратах за счёт восстановления нитрата, что представляется перспективными свойствами для его применения в биотехнологиях повышения нефтеотдачи и снижения образования сульфида в нефтяном пласте.

### Литература

1. Youssef N., Elshahed M.S., McInerney M.J. Microbial processes in oil fields: culprits, problems, and opportunities // *Advances in Applied Microbiology*. – 2009. – Vol. 66. – P. 141-251.
2. De Almeida D.G., Silva R.C.F.S., Luna J.M., Rufino R.D., Santos V.A., Banat I.M., Sarubbo L.A. Biosurfactants: Promising Molecules for Petroleum Biotechnology Advances // *Frontiers in Microbiology*. – 2016. – Vol. 7. – P. 1718-1731.
3. An B.A., Shen Y., Voordouw G. Control of sulfide production in high salinity bakken shale oil reservoirs by halophilic bacteria reducing nitrate to nitrite // *Frontiers in Microbiology*. – 2017. – Vol. 8. – P. 1164.
4. Gieg L.M., Jack T.R., Foght J.M. Biological souring and mitigation in oil reservoirs // *Applied Microbiology and Biotechnology* – 2011. – Vol. 92 (2). – P. 263-282.

### Список публикаций по теме работы

#### Статьи

1. Назина Т.Н., Соколова Д.Ш., Бабич Т.Л., Семёнова Е.М., Ершов А.П., Биджиева С.Х., Борзенков И.А., Полтараус А.Б., Хисаметдинов М.Р., Турова Т.П. Микроорганизмы низкотемпературных месторождений тяжелой нефти (Россия) и возможность их применения для вытеснения нефти // *Микробиология*. – 2017. – Т. 86. – № 6. – С. 748-761.
2. Nazina T., Sokolova D., Grouzdev D., Semenova E., Babich T., Bidzhieva S., Serdukov D., Volkov D., Bugaev K., Ershov A., Khisametdinov M., Borzenkov

I. The Potential Application of Microorganisms for Sustainable Petroleum Recovery from Heavy Oil Reservoirs // Sustainability. – 2020. – Vol. 12 (1). – P. 15.

3. Семенова Е.М., Ершов А.П., Соколова Д.Ш., Турова Т.П., Назина Т.Н. Разнообразие и биотехнологический потенциал нитратредуцирующих бактерий из месторождений тяжелой нефти (Россия) // Микробиология. – 2020. – Т. 89. – № 6. – С. 675-687.

4. Соколова Д.Ш., Семенова Е.М., Груздев Д.С., Ершов А.П., Биджиева С.Х., Иванова А.Е., Бабич Т.Л., Сисенбаева М.Р., Бисенова М.А., Назина Т.Н. Микробное разнообразие и потенциальные продуценты сероводорода в нефтяном месторождении Каражанбас (Казахстан) // Микробиология. – 2020. – Т. 89. – № 4. – С. 462-473.

5. Sokolova D.S., Semenova E.M., Grouzdev D.S., Bidzhieva S.K., Babich T.L., Loiko N.G., Ershov A.P., Kadnikov V.V., Beletsky A.V., Mardanov A.V., Zhaparov N.S., Nazina T.N. Sulfidogenic Microbial Communities of the Uzen High-Temperature Oil Field in Kazakhstan // Microorganisms. – 2021. – Vol. 9. – P. 1818.

6. Турова Т.П., Соколова Д.Ш., Семенова Е.М., Ершов А.П., Груздев Д.С., Назина Т.Н. Геномные и физиологические характеристики галофильных бактерий родов *Halomonas* и *Marinobacter* из нефтяных пластов // Микробиология. – 2022. – Т. 91. – № 3. – С. 285-299.

#### Тезисы докладов

1. Semenova E., Sokolova D., Babich T., Borzenkov I., Ershov A., Tourova T., Poltarau A., Nazina T. Microbial communities of heavy oil reservoirs // FEMS 2017. 7<sup>th</sup> congress of European microbiologists (July 9–13, 2017). Abstract Book. – Valencia, Spain. – 2017. – P. 977. URL: [https://fems-microbiology.org/wp-content/uploads/2020/05/FEMS2017\\_abstracts-book.pdf](https://fems-microbiology.org/wp-content/uploads/2020/05/FEMS2017_abstracts-book.pdf)

2. Sokolova D., Babich T., Semenova E., Ershov A., Bidzhieva S., Borzenkov I., Khisametdinov M., Tourova T., Nazina T. Diversity of microorganisms in heavy oil reservoirs (Russia) and their possible application in MEOR // International Biotechnology and Research Conference (April 25–27, 2018). Conference Proceedings. – Rome, Italy [Электронный ресурс]. – 2018. – P. 20. URL: <https://madridge.org/journal-of-biotechnology-and-recent-advances/biotechnology-2018-scientificsession-proceedings/2639-4529.a1.002-s008.pdf>

3. Ершов А.П., Семенова Е.М. Анаэробная биодegradация нефти денитрифицирующими бактериями из нефтяных пластов // Материалы Международного молодежного научного форума «ЛОМОНОСОВ-2018» 9–13 апреля 2018 г. / Отв. ред. И.А. Алешковский, А.В. Андриянов, Е.А. Антипов [Электронный ресурс] – М.: МАКС Пресс. – 2018.

4. Ершов А.П. Разнообразие денитрифицирующих бактерий из низкотемпературных месторождений тяжёлой нефти // Материалы Международного молодежного научного форума «ЛОМОНОСОВ-2019» (8–12 апреля 2019 г.) / Отв. ред. И.А. Алешковский, А.В. Андриянов, Е.А. Антипов [Электронный ресурс] – М.: МАКС Пресс. – 2019.
5. Ершов А.П. Функциональное и филогенетическое разнообразие микроорганизмов месторождений тяжёлой нефти // Сборник тезисов отчётной конференции аспирантов ФИЦ Биотехнологии РАН: направление подготовки 06.06.01 Биологические науки (22-30 июня 2020 г.) / под ред. В.О. Попова, А.Н. Фёдорова; сост. Е.С. Титова. – М.: МАКС Пресс. – 2020. – С. 133-137.(тезисы и устный доклад)
6. Соколова Д.Ш., Бабич Т.Л., Семенова Е.М., Груздев Д.С., Биджиева С.Х., Ершов А.П., Сердюков Д.В., Волков Д.С., Бугаев К.А., Хисаметдинов М.Р., Борзенков И.А., Назина Т.Н. Микробное разнообразие в месторождениях тяжелой нефти как основа для создания биотехнологий увеличения нефтеизвлечения // Материалы международного форума «Биотехнология: состояние и перспективы развития» (28–30 октября 2020 г.). – М.: ООО «ЭКСПО-БИОХИМ-ТЕХНОЛОГИИ». – 2020. – С. 365-367.
7. Ershov A., Sokolova D., Babich T., Semenova E., Bidzhieva S., Grouzdev D., Zhaparov N., Nazina T. Sulfidogenic microbial communities of the Uzen oil field and their resistance to biocides // 8<sup>th</sup> International Symposium on Applied Microbiology and Molecular Biology in Oil Systems (June 8–11, 2021). Abstract Book. – Virtual Symposium. – 2021. – P. 3435. URL: [https://ismos-8.org/wp-content/uploads/2021/06/07062021\\_ISMOS-8\\_ABSTRACT-BOOKFINALFINAL.pdf](https://ismos-8.org/wp-content/uploads/2021/06/07062021_ISMOS-8_ABSTRACT-BOOKFINALFINAL.pdf)
8. Ершов А.П. Сульфидогенные микробные сообщества нефтяного месторождения Узень и их устойчивость к бактерицидам // Материалы Международного молодежного научного форума «ЛОМОНОСОВ-2021» (12–23 апреля 2021 г.) / Отв. ред. И.А. Алешковский, А.В. Андриянов, Е.А. Антипов, Е.И. Зимакова [Электронный ресурс] – М.: МАКС Пресс. – 2021.
9. Ершов А.П. Денитрифицирующие бактерии из нефтяных пластов, перспективные для биотехнологий вытеснения нефти и снижения образования сульфида // Сборник тезисов отчётной конференции аспирантов ФИЦ Биотехнологии РАН: направление подготовки 06.06.01 Биологические науки (21-25 июня 2021 г.) / под ред. В.О. Попова, А.Н. Фёдорова; сост. Е.С. Титова. – М.: ВАШ ФОРМАТ. – 2021. – С. 168–173. (тезисы и устный доклад)
10. Соколова Д.Ш., Семёнова Е.М., Бабич Т.Л., Груздев Д.С., Биджиева С.Х., Ершов А.П., Жапаров Н.С., Назина Т.Н. Функциональное и филогенетическое разнообразие микроорганизмов в нефтяном месторождении Узень (Казахстан) как основа для создания биотехнологии увеличения нефтеизвлечения // 3-й Российский микробиологический

конгресс (26 сен. – 1 окт. 2021 г.): материалы конгресса. – Псков: Псковский государственный университет. – 2021. – С. 101.

11. Соколова Д.Ш., Семёнова Е.М., Бабич Т.Л., Груздев Д.С., Биджиева С.Х., Ершов А.П., Назина Т.Н., Жапаров Н.С. Функциональное и филогенетическое разнообразие микроорганизмов в нефтяном месторождении Узень (Казахстан) как основа для создания биотехнологий // Сборник тезисов докладов Международной online научной конференции «Инновационные технологии в нефтегазовой отрасли. Опыт внедрения и перспективы развития» 19 ноября 2021 г. – Республика Казахстан, Актау: ТОО «КМГ Инжиниринг». – 2021. – С. 83.

12. Ершов А.П., Соколова Д.Ш., Семенова Е.М., Турова Т.П., Груздев Д.С., Назина Т.Н. Галофильные бактерии родов *Halomonas* и *Marinobacter* из нефтяных пластов России и Казахстана и их биотехнологический потенциал // XXXIV международная зимняя молодёжная научная школа «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии» (8-11 февраля 2022 г.): сборник тезисов / под ред. д.х.н. Т.В. Овчинниковой, к.б.н. Е.А. Стукачевой. – М.: Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН. – 2022. – С. 98.

#### **Основные достижения, патенты**

1. Борзенков И.А., Соколова Д.Ш., Назина Т.Н., Бабич Т.Л., Семёнова Е.М., Ершов А.П., Хисаметдинов М.Р. Штамм *Gordonia amicalis*, способный к генерации непосредственно в нефтяном пласте нефтевытесняющего агента – биоПАВ и снижающий содержание сероорганических соединений нефти. Патент на изобретение RU 2673747 С1, 29.11.2018. Заявка № 2018118079 от 16.05.2018.

2. Борзенков И.А., Семёнова Е.М., Соколова Д.Ш., Бабич Т.Л., Ершов А.П., Биджиева С.Х., Назина Т.Н. Штамм *Rhodococcus erythropolis* НО-KS22, обладающий высокой уреазной активностью, способный к генерации в нефтяном пласте нефтевытесняющего агента биоПАВ. Патент на изобретение RU 2717025 С1, 17.03.2020. Заявка № 2019114124 от 08.05.2019.

3. Лауреат стипендии Правительства РФ на 2021/2022 учебный год.

**Ershov Alexey Pavlovich**

**RESEARCH CENTER OF BIOTECHNOLOGY RAS**

**HYDROCARBON-OXIDIZING BACTERIA FROM PETROLEUM  
RESERVOIRS OF RUSSIA AND KAZAKHSTAN  
AND THEIR BIOTECHNOLOGICAL POTENTIAL**

## **Abstract**

The work is devoted to the study of the phylogenetic diversity of hydrocarbon-oxidizing bacteria in the oil reservoirs of Russia and Kazakhstan and the evaluation of their potential for application in biotechnologies for enhanced oil recovery and mitigation of oilfield equipment corrosion. The composition of microbial communities in formation waters of five oil fields was studied, pure cultures of bacteria capable of aerobic oxidation of oil components and anaerobic reduction of nitrate were isolated. The isolated strain *Marinobacter lutaoensis* KAZ22 is adapted to the conditions of the high-temperature oil reservoir with high-salinity formation water, and it is able to utilize oil alkanes for aerobic growth. Based on the whole genome and chemotaxonomic characterization, the hydrocarbon-oxidizing, denitrifying bacterium, strain HO-A22, was provisionally assigned to a new species '*Ensifer oleophilus*'.

**Keywords:** microbial enhanced oil recovery, hydrocarbon-oxidizing bacteria, biosurfactants, halotolerant bacteria, reservoir souring, denitrification, whole-genome analysis, high-throughput sequencing

*Работа выполнена при поддержке РФФ (грант № 21-64-00019)*

**Пелевина Анна Витальевна**

аспирант ФИЦ Биотехнологии РАН 3 года обучения

профиль 1.5.11. Микробиология

e-mail: annie.pelevina@yandex.ru

Научный руководитель

**Пименов Николай Викторович**

доктор биологических наук,

заместитель директора по научной работе,

зав. лабораторией реликтовых микробных сообществ



## **ЗАКОНОМЕРНОСТИ ФОРМИРОВАНИЯ МИКРОБНОГО СООБЩЕСТВА ФОСФАТ-АККУМУЛИРУЮЩИХ БАКТЕРИЙ В ЛАБОРАТОРНОМ БИОРЕАКТОРЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНО-ПЕРИОДИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ**

**Аннотация.** В лабораторном биореакторе последовательно-периодического действия через 150 суток культивирования был получен микробный консорциум, обогащенный фосфат-аккумуляторными микроорганизмами и осуществляющий циклический процесс накопления и выброса фосфатов. Анализ динамики фосфатов в среде свидетельствовал о типичном для ФАО цикле потребления и высвобождения фосфатов в аэробный и анаэробный периоды культивирования. Микроскопические исследования и результаты спектроскопии комбинационного рассеяния света выявили накопление фосфора внутри микробных клеток. Максимальное содержание внутриклеточного фосфора составило  $16.5 \pm 0.15\%$  от сухого веса беззольного вещества. Молекулярно-генетическим анализом и методом FISH выявлено таксономическое разнообразие микробного сообщества, в котором основными представителями ФАО были бактерии группы *Ca. Accumulibacter*.

**Ключевые слова:** очистка сточных вод, активный ил, фосфат-аккумуляторные организмы, *Candidatus Accumulibacter*

Наиболее перспективные современные технологии очистки сточных вод от фосфора основаны на биологической очистке с использованием активного ила, формирующегося в биореакторах непрерывного или последовательно-периодического действия (sequencing batch reactor, SBR). Биологическое удаление фосфора осуществляет физиологическая группа микроорганизмов, способная к избыточному накоплению внутриклеточных полифосфатов, получившая название фосфат-аккумуляторные организмы (ФАО) [5; 6]. Динамика формирования фосфат-аккумуляторного

микробного сообщества, его состав и пространственная организация во многом определяются режимами его культивирования [2; 7].

Целью исследования было получение обогащенного ФАО микробного сообщества с высокой плотностью биомассы, исследование клеточных включений с использованием спектроскопии комбинационного рассеяния (КР-спектроскопия) и рентгеновского микроанализа, определение таксономического состава сообщества и доминирующих представителей ФАО.

В лабораторном биореакторе через 150 суток культивирования было получено стабильно работающее фосфат-аккумулирующее микробное сообщество. Анализ динамики содержания фосфатов в среде свидетельствовал о типичном для ФАО цикле потребления и высвобождения фосфатов в аэробный и анаэробный периоды культивирования соответственно. Микроскопическое исследование микробного сообщества SBR выявило большое разнообразие морфологических форм. Среди них четко выделялись овальные клетки с крупными включениями (Рис. 1а), большинство из которых формировали агрегаты (Рис. 1б).

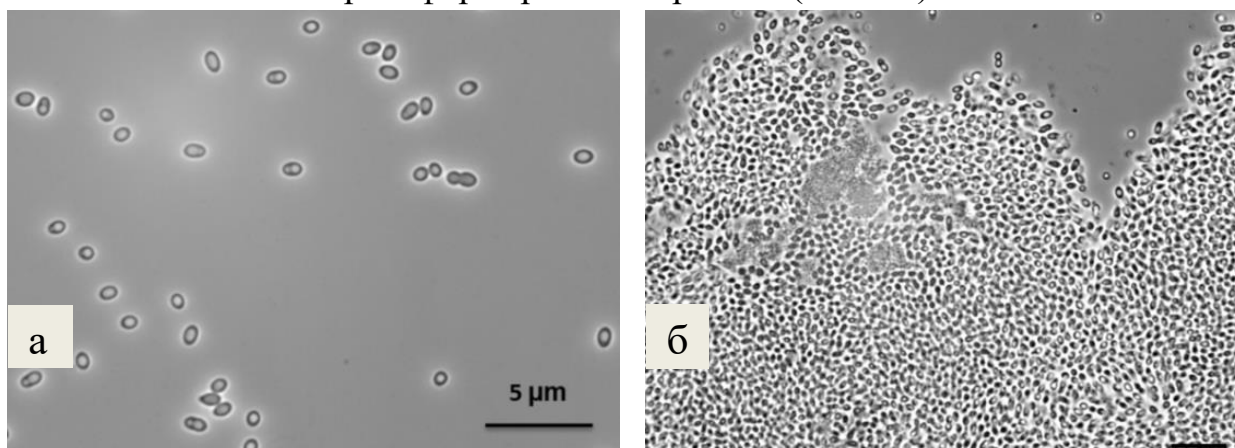


Рис. 1\*. Клетки с включениями в составе фосфат аккумулярующего микробного сообщества ферментера: а – отдельные клетки; б – агрегаты клеток (\*масштабная линейка 5 мкм)

Исследование клеток сообщества с помощью метода КР-спектроскопии позволило обнаружить полосы, характерные для колебания различных связей органических соединений и фосфора. Сравнение интенсивности этих полос ( $478\text{ см}^{-1}$ ,  $748\text{ см}^{-1}$  и  $1152\text{ см}^{-1}$ ), показало, что содержание фосфатов в клетках в конце аэробной фазы (спектр 2) существенно выше, чем в конце анаэробной фазы (спектр 1) (Рис. 2).

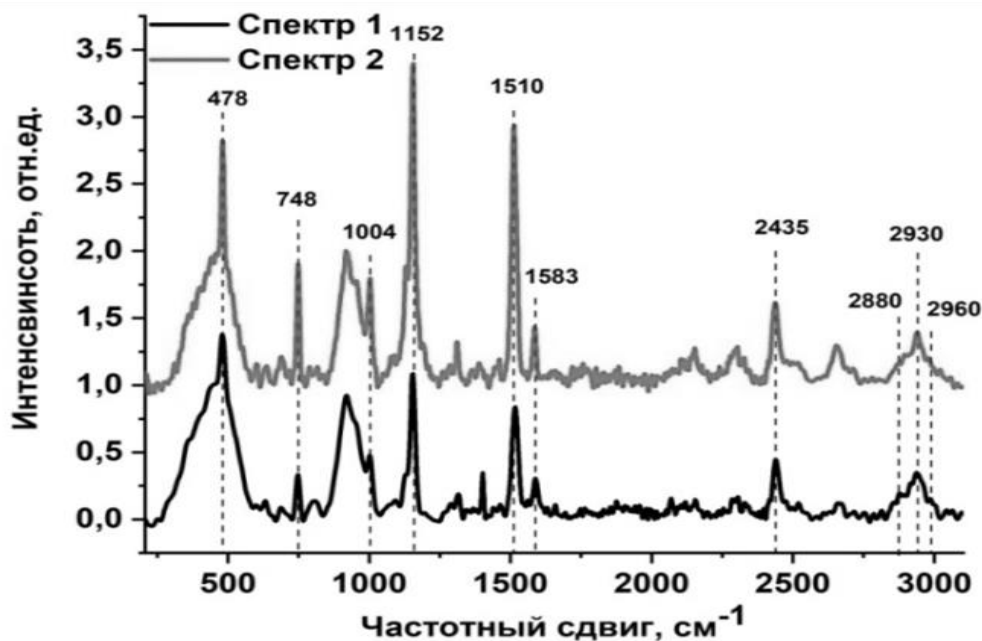


Рис. 2\*. КР спектр исследуемых клеток в конце анаэробной фазы (спектр 1) и в конце аэробной фазы (спектр 2) (\*представленные графики нормированы на максимум интенсивности полосы стекла —  $916\text{ см}^{-1}$ )

Анализ микробных агрегатов методом FISH выявил высокое содержание в нем *Sa. Accumulibacter* – типичного представителя фосфат-аккумулирующих бактерий (Рис. 3).

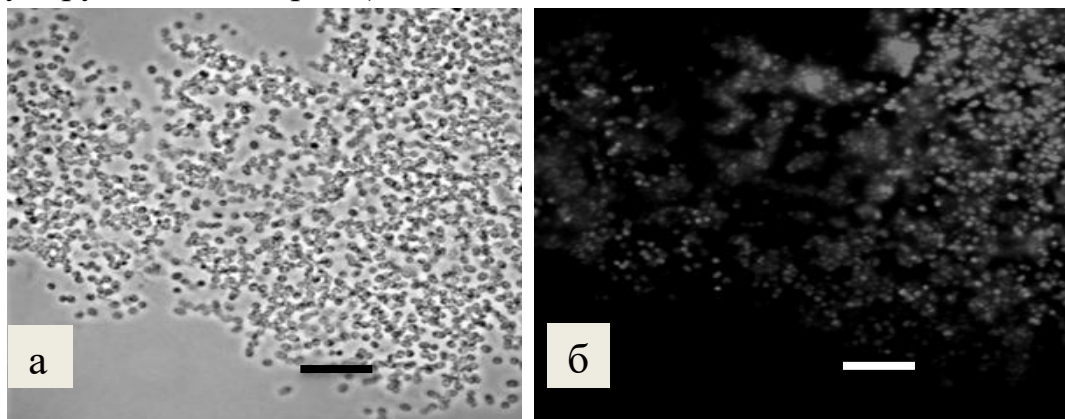


Рис. 3\*. *Sa. Accumulibacter* в составе микробного сообщества агрегатов: а – фазовый контраст, б – клетки, гибридизованные с зондом PAO651 (светофильтр Zeiss 43)(\*масштабная линейка - 20 мкм)

Таксономический анализ, проведенный по результатам высокопроизводительного секвенирования гена 16S рРНК, исследуемых образцов выявил смену бактериальных форм в микробном сообществе в процессе его развития.

На начальном этапе домен Bacteria был представлен четырьмя основными филумами: Proteobacteria, Bacteroidota, Chloroflexota и Patescibacteria. В процессе работы биореактора стали преобладать представители филума Proteobacteria. Их доля к 150 суткам возросла более



чем в 5 раз, достигнув 68%. *Proteobacteria* в основном были представлены родами *Ca. Accumulibacter*, *Ca. Competibacter*, *Thiothrix*, *Propionivibrio*, *Dechloromonas*, *Thauera*, *Zoogloea*, которые характерны для биореакторов по удалению фосфатов [1; 3; 4]. Доминирующим представителем фосфат-аккумулирующих бактерий был *Ca. Accumulibacter*.

**Основные выводы.** В ходе работы биореактора произошла смена таксономического состава активного ила. К 150 суткам культивирования в SBR было получено стабильно функционирующее фосфат-аккумулирующее микробное сообщество с высоким накоплением фосфора в биомассе (16.5% от сухого веса беззольного вещества биомассы) и типичным для ФАО накоплением и высвобождением фосфатов в аэробную и анаэробную фазу SBR-цикла. Основным представителем ФАО в сообществе был *Ca. Accumulibacter*.

### Литература

1. Albertsen M., McIlroy S. J., Stokholm-Bjerregaard M., Karst S. M., Nielsen P. H. “*Candidatus Propionivibrio aalborgensis*”: a novel glycogen accumulating organism abundant in full-scale enhanced biological phosphorus removal plants // *Frontiers in Microbiology*. – 2016. – Vol. 7. – P. 1033.
2. Gómez-Basurto F., Vital-Jácome M., Gómez-Acata E.S., Thalasso F., Luna-Guido M., Dendooven L. Microbial community dynamics during aerobic granulation in a sequencing batch reactor (SBR) // *PeerJ*. – 2019. Vol.7. – P. e7152.
3. McIlroy S.J., Albertsen M., Andresen E.K., Saunders A.M., Kristiansen R., Stokholm-Bjerregaard M., Nielsen P.H. ‘*Candidatus Competibacter*’-lineage genomes retrieved from metagenomes reveal functional metabolic diversity // *The ISME journal*. – 2014. – Vol. 8 (3). – P. 613-624.
4. McIlroy S.J., Saunders A.M., Albertsen M., Nierychlo M., McIlroy B., Hansen A.A., Nielsen P. H. MiDAS: the field guide to the microbes of activated sludge // *Database*. – 2015. – Vol. 2015. – P. 1-8.
5. Seviour R.J., Mino T., Onuki M. The microbiology of biological phosphorus removal in activated sludge systems. *FEMS Microbiol*. – 2003. – Vol. 27. – P. 99-127.
6. Van Loosdrecht M.C.M., Hooijmans C.M., Brdjanovic D., Heijnen J.J. Biological phosphorus removal processes // *Applied Microbiology and Biotechnology*. – 1997. – Vol. 48. – P. 289-296.
7. Weissbrodt D.G., Neu T.R., Kuhlicke U., Rappaz Y., Holliger C. Assessment of Bacterial and Structural Dynamics in Aerobic Granular Biofilms // *Frontiers in Microbiology*. – 2013. – Vol. 4. – P. 175.

### Список публикаций по теме работы

Пелевина А.В., Берестовская Ю.Ю., Грачёв В.А., Дорофеева И.К., Сорокин В.В., Дорофеев А.Г., Каллистова А.Ю., Николаев Ю.А., Котляров Р.Ю., Белецкий А.В., Равин Н.В., Пименов Н.В., Марданов А.В. Микробный консорциум, осуществляющий удаление фосфатов в циклическом аэробно-анаэробном культивировании // Микробиология. – 2021. – Т. 90. – № 1. – С. 76-89.

#### *Тезисы докладов*

1. Пелевина А.В., Николаев Ю.А., Грачёв В.А., Дорофеев А.Г., Каллистова А.Ю., Берестовская Ю.Ю., Пименов Н.В., Котляров Р.Ю., Марданов А.В. Новые фосфат аккумулирующие бактерии микробного сообщества лабораторного биореактора // Всероссийская конференция с международным участием «Микробиология: вопросы экологии, физиологии, биотехнологии» (23-24 декабря 2019 г.) – М.: МАКС Пресс. – С. 92. (тезисы и постерный доклад)
2. Пелевина А.В. Фосфат-аккумулирующее микробное сообщество лабораторного биореактора // Сборник тезисов отчётной конференции аспирантов ФИЦ Биотехнологии РАН: направление подготовки 06.06.01 Биологические науки (22-30 июня 2020 г.) / под ред. В.О. Попова, А.Н. Фёдорова; сост. Е.С. Титова. – М.: МАКС Пресс. – 2020. – С. 138-144. (тезисы и устный доклад)
3. Пелевина А.В. Микробное разнообразие во флоккулах активного ила лабораторного реактора, осуществляющего удаление фосфора // Сборник тезисов отчётной конференции аспирантов ФИЦ Биотехнологии РАН: направление подготовки 06.06.01 Биологические науки (21-25 июня 2021 г.) / под ред. В.О. Попова, А.Н. Фёдорова; сост. Е.С. Титова. – М.: ВАШ ФОРМАТ. – 2021. – С. 174-181. (тезисы и устный доклад)
4. Пелевина А.В., Берестовская Ю.Ю., Грачёв В.А., Дорофеева И.К., Сорокин В.В., Дорофеев А.Г., Каллистова А.Ю., Николаев Ю.А., Груздев Е.В., Белецкий А.В., Равин Н.В., Пименов Н.В., Марданов А.В. Фосфат-аккумулирующее микробное сообщество лабораторного реактора типа SBR. // 3-й Российский микробиологический конгресс (г. Псков, 26 сентября – 1 октября 2021 г.): материалы конгресса / редкол.: Бонч-Осмоловская Е.А., Ильина Н.А., Пименов Н.В.; сост.: Пименов Н.В., Бонч-Осмоловская Е.А., Ильина Н.А., Антал Т.К., Серова О.А., Фролов В.В., Бугеро Н.В. – Псков : ООО «Конкорд», 2021. – С. 96. (устный доклад)
5. Груздев Е.В., Белецкий А.В., Пелевина А.В., Дорофеев А.Г., Грачев В.А., Пименов Н.В., Равин Н.В., Марданов А.В. Новые фосфат-аккумулирующие микроорганизмы, выявленные в результате метагеномного

анализа микробного сообщества лабораторного биореактора, осуществляющего удаление фосфора. // 3-й Российский микробиологический конгресс (г. Псков, 26 сентября – 1 октября 2021 г.): материалы конгресса / редкол.: Бонч-Осмоловская Е.А., Ильина Н.А., Пименов Н.В.; сост.: Пименов Н.В., Бонч-Осмоловская Е.А., Ильина Н.А., Антал Т.К., Серова О.А., Фролов В.В., Бугеро Н.В. – Псков: ООО «Конкорд», 2021. – С. 166. (постерный доклад)

#### **Основные достижения, патенты**

Пименов Н.В., Дорофеев А.Г., Николаев Ю.А., Грачев В.А., Пелевина А.В., Берестовская Ю.Ю., Каллистова А.Ю., Котляров Р.Ю., Белецкий А.В., Равин Н.В., Марданов В.В. Способ биологической очистки сточных вод от фосфатов. Патент на изобретение 2753657 С1, 19.08.2021. Заявка № 2020125577 от 24.07.2020.

**Pelevina Anna Vital'evna**

**RESEARCH CENTER OF BIOTECHNOLOGY RAS**

### **PATTERNS OF THE FORMATION OF THE MICROBIAL COMMUNITY OF PHOSPHATE-ACCUMULATING BACTERIA IN A SEQUENTIAL BATCH REACTOR**

#### **Abstract**

A microbial consortium enriched with phosphate-accumulating microorganisms and carrying out a cyclic process of accumulation and release of phosphates was obtained in a laboratory bioreactor of sequential-periodic action, after 150 days of cultivation. Analysis of the dynamics of phosphates in the medium indicated a typical PAO cycle of phosphate consumption and release during aerobic and anaerobic cultivation periods. Microscopic studies and the results of Raman-spectroscopy revealed the accumulation of phosphorus inside microbial cells. The maximum content of intracellular phosphorus was  $16.5 \pm 0.15\%$  of the dry weight of the ash-free substance. Molecular genetic analysis and FISH revealed the taxonomic diversity of the microbial community, in which the main representatives of the PAO was *Ca. Accumulibacter*.

**Keywords:** biological phosphorus removal, phosphate accumulating organisms (PAO), wastewater treatment, “*Candidatus Accumulibacter*”

*Работа финансировалась из средств Российского научного фонда  
(грант № 18-34-00627)*

## СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

№ п/п.	ФИО аспиранта	e-mail
<i><b>Профиль 1.5.3. Молекулярная биология</b></i>		
1	Галлямов Артур Альбертович	arturens96@gmail.com
2	Калинин Данил Сергеевич	309163@gmail.com
3	Бидюк Виктория Александровна	victoria.bidiuk@gmail.com
4	Шипков Николай Сергеевич	shipkov1995@yandex.ru
5	Ефремов Глеб Ильич	gleb_efremov@mail.ru
6	Армянинова Дарья Константиновна	dasha.arm@yandex.ru
7	Старшин Алексей Станиславович	starshin.alexey@gmail.com
<i><b>Профиль 1.5.4 Биохимия</b></i>		
8	Ламердонова Фатима Хасбияновна	lamertim@mail.ru
9	Шабает Александр Викторович	a.shabaeff2011@yandex.ru
10	Бакунова Алина Константиновна	albakunova@mail.ru
11	Варфоломеева Лариса Александровна	larisaavarfolomeeva@gmail.com
12	Кривицкая Александра Вячеславовна	al_krivickaya@mail.ru
13	Соловьева Анастасия Юрьевна	nastya.soloveva1@yandex.ru
14	Баршевская Любовь Владимировна	lyubov.barshevskaya@yandex.ru
15	Кулакова Мария Викторовна	kulakova_masha95@mail.ru
16	Марынич Надежда Константиновна	marynich_n@mail.ru
17	Обухов Юрий Николаевич	y.u.r.a.o@mail.ru

18	Острик Альбина Александровна	abillymartiny@gmail.com
<b><i>Профиль 1.5.6. Биотехнология</i></b>		
19	Бубнова Анастасия Николаевна	an_bubnova@mail.ru
20	Кулакова Анастасия Владимировна	kulakova_97@mail.ru
21	Тимофеева Татьяна Алексеевна	timofeyka2033@mail.ru
22	Нежданова Анна Владимировна	anna-negdanova@mail.ru
23	Печенов Павел Юрьевич	pechenov.p@gmail.com
24	Синегубова Мария Валерьевна	mvsineg@gmail.com
<b><i>Профиль 1.5.8. Математическая биология, биоинформатика</i></b>		
25	Михайлов Иван Максимович	mikhailovivan27@gmail.com
<b><i>Профиль 1.5.11. Микробиология</i></b>		
26	Галуза Олеся Александровна	
27	Кузнецов Александр Сергеевич	alexbluesking@gmail.com
28	Захарычева Алиса Павловна	alice-keytown@ya.ru
29	Мальцева Анастасия Игоревна	an.malts@mail.ru
30	Сулейманов Руслан Закиевич	suleimanov-1972@outlook.com
31	Ершов Алексей Павлович	e.alexey.mail@yandex.ru
32	Пелевина Анна Витальевна	annie.pelevina@yandex.ru

