



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

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

20-22 февраля 2019

МИКРОБНОЕ ОКИСЛЕНИЕ МЕТАНА В МЕРОМИКТИЧЕСКИХ ВОДОЕМАХ

Пименов Н.В.¹, Саввичев А.С.¹, Каллистова А.Ю.¹, Кадников В.В.², Захарова Е.Е.¹, Русанов И.И.¹, Равин Н.В.²

¹ ИИМИ ФИЦ Биотехнологии РАН

² ИИБ ФИЦ Биотехнологии РАН

Меромиктические озера, характеризующиеся стабильной физико-химической стратификацией водной массы на аэробную (миксолимнион) и анаэробную (монимолимнион) зоны, являются удобным объектом для изучения микробных сообществ, обеспечивающих процессы образования и трансформации органического вещества (ОВ) как в аэробных, так и в анаэробных условиях. Для пресноводных меромиктических озер характерно низкое содержание сульфата, поэтому в монимолимнионе таких водоемов метаногенные археи обеспечивают терминальную стадию процесса анаэробного разложения ОВ с образованием значительных количеств метана. В монимолимнионе солоноватоводных и соленых озер терминальная фаза разложения ОВ происходит при участии сульфатредуцирующих и метанобразующих прокариот, причем наиболее высокие скорости метаногенеза выявляются в горизонтах водной толщи и осадочных отложений, где наблюдается резкое снижения содержания сульфата-иона за счет исчерпания в процессах сульфатредукции. Во всех исследованных меромиктических водоемах наибольшая интенсивность окисления метана (ОМ) происходит в зоне хемоклина на границе кислородных и бескислородных вод, что подтверждается радиоизотопными и изотопно-геохимическими исследованиями. Однако до сих пор остается не ясным, какие микроорганизмы/микробные консорциумы, а также акцепторы электронов обеспечивают эффективное МО в хемоклине меромиктических водоемов.

Процессы окисления метана исследовались нами в пресноводном меромиктическом оз. Светлое (Архангельская область), являющимся субарктическим аналогом знаменитого меромиктического оз. Матано (Индонезия), в котором микробные процессы цикла метана сопряжены с процессами цикла железа, а также солоноватоводное оз. Большие Хрусломены, расположенное на побережье Кандалакшского залива Белого моря, характеризующееся постоянным поступлением морских вод через проницаемые породы. Ниже хемоклина в водной толще этих озер наблюдалось резкое возрастание содержания метана с глубиной до 0,92 ммоль/л и 1,8 ммоль/л соответственно. Радиоизотопным методом в исследованных озерах доказана стимуляция светом процесса МО в бескислородных условиях. Возможным объяснением светозависимого МО является сопряжение окислительного фотосинтеза, осуществляемого цианобактериями, и МО, осуществляемого аэробными метанотрофными гаммапротеобактериями. Обсуждается вероятность участия в этом процессе и других групп микроорганизмов, в частности, метанотрофных бактерий и архей, использующих вместо кислорода сульфат, нитрат, нитрит и Fe III в качестве акцепторов электронов для окисления метана, а также способных к фотометанотрофии аэротолерантных аноксигенных фототрофов филаума *Chloroflexi*. Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РНФ 16-14-10201.

Публикация

1. Savvichev A.S., Kokryatskaya N.M., Zabelina S.A., Rusanov I.I., Zakharova E.E., Veslopolova E.F., Lunina O.N., Patutina E.O., Bumazhkin B.K., Gruzdev D.S., Sigalevich P.A., Pimenov N.V., Kuznetsov B.B., Gorlenko V.M. Microbial processes of the carbon and sulfur cycles in an ice-covered, iron-rich meromictic lake Svetloe (Arkhangelsk region, Russia) // **Environ. Microbiol.** 2017. V. 19. P. 659–672.
2. Kallistova A., Kadnikov V., Rusanov I., Kokryatskaya N., Beletsky F., Mardanov A., Savvichev A.I., Ravin N., Pimenov N. Microbial communities involved in aerobic and anaerobic methane cycling in a meromictic ferruginous subarctic lake // **Aquat Microb Ecol.** 2019. Vol. 82. P. 1–18.
3. Саввичев А.С., Кадников В.В., Каллистова А.Ю., Русанов И.И., Воронов Д.А., Краснова Е.Д., Равин Н.В., Пименов Н.В. Фотозависимое окисление метана- важнейший процесс цикла метана в водной толще полярного озера Большие Хрусломены // **Микробиология.** 2019. Т. 88. №3. В печати.

ПРОСТРАНСТВЕННАЯ СТРУКТУРА ЧЕЛОВЕЧЕСКОЙ БУТИРИЛХОЛИНЭСТЕРАЗЫ, ПОЛУЧЕННАЯ КОМПЛЕМЕНТАРНЫМИ МЕТОДАМИ СТРУКТУРНОЙ БИОЛОГИИ

Бойко К.М.¹, Баймухаметов Т.Н.², Чесноков Ю.М.², Хонс М.³, Лушекина С.В.⁴, Конарев П.⁵, Липкин А.В.¹, Васильев А.Л.^{2,5}, Массон А.Л.⁶, Попов В.О.^{1,2}, Ковальчук М.В.^{2,5}

¹ ИНБИ ФИЦ Биотехнологии РАН

² НИЦ «Курчатовский институт»

³ EMBL Grenoble, Grenoble, France

⁴ ИБХФ имени Н.М. Эмануэля РАН

⁵ ФНИЦ «Кристаллография и фотоника» РАН:

⁶ Казанский Федеральный Университет

Человеческая бутирилхолинэстераза (БХЭ) является природной стехиометрической ловушкой (bioscavenger) токсичных фосфорорганических соединений, в связи с чем данный фермент перспективен в качестве антидота для защиты ацетилхолинэстеразы и является белком выбора при разработке биокатализаторов детоксикации для клинических применений. Природная БХЭ является тетрамером с высокой (30% по массе) степенью гликозилирования, что придает ферменту стабильность в физиологических условиях. Несмотря на множество предпринятых за последние 15 лет попыток, к настоящему моменту атомная структура природной гликозилированной тетрамерной БХЭ оставалась неизвестной.

В настоящей работе с использованием взаимодополняющих методов структурной биологии: криоэлектронной микроскопии, молекулярной динамики (МД) и малоуглового рентгеновского рассеяния (МУРР), была впервые установлена пространственная структура тетрамерной природной БХЭ. Показано, что в тетрамере фермента, являющимся димером димеров, организация субъединиц существенно отличается от используемой ранее теоретической модели, предложенной на основании данных МД. Экспериментальная плотность позволила выявить сильное взаимодействие между С-концевыми участками всех субъединиц, образующими левостороннюю суперспираль вокруг эндогенного PRAD-пептида и, тем самым, стабилизирующее тетрамер. Данные МД позволили смоделировать положения сахарных остатков на поверхности фермента, продемонстрировав их роль в стабилизации тетрамерной формы. Полученная модель природной тетрамерной БХЭ была затем успешно верифицирована методом МУРР.

Публикации

Konstantin M. Boyko, Timur N Baymukhametov, Yury M Chesnokov, Michael Hons, Sofya V Lushchekina, Petr V Konarev, Alexey V Lipkin, Alexandre L Vasiliev, Patrick Masson, Vladimir O Popov, Michail V Kovalchuk "3D structure of the natural tetrameric form of human butyrylcholinesterase as revealed by cryoEM, SAXS and MD" *Biochimie*, 2019, 156, 196-205 <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2018.10.017>

ГЕНОМИКА РАКА ПОЧКИ: ЧТО МОЖЕТ РАССКАЗАТЬ ГЕНОМ РАКОВОЙ КЛЕТКИ.

Прохорчук Е.Б. и соавт.

ИНБ ФИЦ ФИЦ Биотехнологии РАН

Геном раковой клетки содержит соматические мутации, которые определяют злокачественные свойства опухоли. На опыте участия лаборатории в консорциуме SAGEKID по расшифровке генома рака почки будут представлены неожиданные результаты, которые объясняют распространенность рака почки среди населения дельты Дуная, а также связывают риск возникновения заболевания с индексом массы тела у мужчин и женщин. В частности, оказалось, что низкотехнологичные методы выращивания пшеницы приводят к ее кокультивации на полях с повышенной влажностью с вьюнком кирказон (*Aristolochia*). Кирказон является основным природным источником аристолохиевых кислот, которые приводят к образованию А-Т мутантов с использованием эндогенной нитроредуктазы. Таким образом, проведенная работа смогла на молекулярном уровне дать интерпретацию феномену балканской эндемической нефропатии.

Работа была поддержана грантом седьмой рамочной программы ЕС

Публикации

- Johansson, M., Carreras-Torres, R., Scelo, G., Purdue, M.P., Mariosa, D., Muller, D.C., Timpson, N.J., Haycock, P.C., ... Prokhortchouk, E., Skryabin, K.G., ... Smith, G.D., Brennan, P. The influence of obesity-related factors in the etiology of renal cell carcinoma-A mendelian randomization study. **PLoS Med.** 2019, v. 16, e1002724 doi: 10.1371/journal.pmed.1002724.
- Machiela, M.J., Hofmann, J.N., Carreras-Torres, R., Brown, K.M., Johansson, M., Wang, Z., ... Prokhortchouk, E., Skryabin, K.G., ... Purdue, M.P. Genetic Variants Related to Longer Telomere Length are Associated with Increased Risk of Renal Cell Carcinoma. **Eur. Urol.** 2018, v. 74, p. E84-E85 doi: 10.1016/j.eururo.2018.05.017
- Scelo, G., Purdue, M.P., Brown, K.M., Johansson, M., Wang, Z.M., Eckel-Passow, J.E., ... Prokhortchouk, E., Skryabin, K.G., ... Chanock, S.J. Genome-wide association study identifies multiple risk loci for renal cell carcinoma. **Nature Communications**, 2017, v. 8, # 15724, doi: 10.1038/ncomms15724.

МОДЕЛИРОВАНИЕ ХИМИЧЕСКИХ РЕАКЦИЙ В СВЕТОЧУВСТВИТЕЛЬНЫХ БЕЛКАХ

Хренова М.Г.^{1,2}, Григоренко Б.Л.^{2,3}, Кулакова А.М.², Немухин А.В.^{2,3}

¹ *ФИЦ Биотехнологии РАН*

² *МГУ имени М.В. Ломоносова, химический факультет*

³ *ИБХФ имени Н.М. Эмануэля РАН*

В докладе обсуждаются механизмы химических превращений в хромофор-содержащих областях светочувствительных белков, исследованные современными методами суперкомпьютерного молекулярного моделирования.

Флуоресцентный белок mRFP670 является уникальным представителем фитохромов, так как в результате его созревания образуются два разных ковалентных аддукта хромофора и белка. В одном из них биливердин образует ковалентную связь с одним остатком цистеина, в другом – с двумя. В данной работе исследованы оба этих механизма и на основании полученной полной кинетической схемы всего процесса определено соотношение двух продуктов реакции.

Фоторецепторные белки BLUF функционируют в результате поглощения кванта света хромофорной группой флавином. Это приводит к реорганизации локального окружения хромофора. Экспериментальные данные не позволяют однозначно определить механизм реакции. По результатам молекулярного моделирования удастся сделать вывод о том, что в структуре фотопродукта функциональная группа аминокислотного остатка глутамина хромофор-содержащей области находится в таутомерной имидной форме.

Публикации

1. Grigorenko B. L., Khrenova M. G., Nemukhin A. V. Amide–imide tautomerization in the glutamine side chain in enzymatic and photochemical reactions in proteins (Perspective) // **Physical Chemistry Chemical Physics**. 2018. V. 20. №. 37. P. 23827-23836.
2. Khrenova M. G., Kulakova A. M., Nemukhin A. V. Competition between two cysteines in covalent binding of biliverdin to phytochrome domains // **Organic & biomolecularchemistry**. 2018. V. 16. №. 40. P. 7518-7529.

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ БЕЛКОВ OCP И FRP В ОСНОВЕ ФОТОЗАЩИТНОГО МЕХАНИЗМА ЦИАНОБАКТЕРИЙ

Слонимский Ю.Б.^{1,2}, Максимов Е.Г.^{1,2}, Молденхауэр М.³, Фридрих Т.³, Случанко Н.Н.^{1,2}

¹ ФИЦ Биотехнологии РАН

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

³ Технический Университет Берлина

Оранжевый каротиноидный белок (OCP) и белок восстановления флуоресценции (FRP) – основные компоненты механизма фотозащиты цианобактерий при избыточной освещенности. OCP – водорастворимый фотоактивный двухдоменный белок, связывающий молекулу каротиноида. В оранжевой форме, OCP^O, два домена соединены линкером, образуют междоменный интерфейс и дополнительно стабилизированы взаимодействием короткой N-концевой α -спирали (NTE) с C-доменом [1]. Фотоактивация сопровождается изменением спектральных свойств каротиноида и расхождением доменов OCP, что обеспечивает связывание фотоактивированной красной формы, OCP^R, с антеннами и включение механизма фотозащиты. Фотоцикл и активность OCP эффективно регулируются небольшим димерным белком FRP, который ускоряет обратную конверсию OCP^R в OCP^O, однако сам механизм взаимодействия белков остается неясным. Создание стабильного аналога формы OCP^R с помощью мутагенеза позволило нам охарактеризовать ее взаимодействие с FRP в сравнении с OCP^O [2]. Для локализации сайта связывания FRP мы получили отдельные домены OCP и показали, что именно C-домен OCP определяет взаимодействие [3]. При анализе структуры OCP мы предположили, что участок связывания для FRP перекрывается с местом связывания NTE на C-доме. Мы использовали мутантную форму OCP, лишенную NTE (Δ NTE), и показали ее прочное взаимодействие с FRP при стехиометрии 1:1, впервые подтвердив, что основной участок взаимодействия FRP лежит в C-доме OCP в области связывания NTE [4]. Практически все работы в мире по данной теме были проведены на FRP из *Synechocystis sp.* (SynFRP), оставляя открытым вопрос об универсальности механизма FRP. Мы восполнили этот пробел, охарактеризовав гомологи FRP из цианобактерий *Anabaena* и *Arthrospira*. Гомологи FRP сохраняли функции SynFRP при взаимодействии с OCP из *Synechocystis sp.*, но демонстрировали функциональные особенности взаимодействия с отдельными доменами OCP [5]. Стехиометрия комплекса белков OCP и FRP 1:1 предполагала, что в процессе взаимодействия происходит мономеризация FRP. Мы получили мутантные формы FRP со стабильным мономерным и димерным состоянием и показали, что именно димерная форма взаимодействует с OCP, а мономеризация FRP не является необходимым условием работы белка (однако происходит с заметной эффективностью). Нам удалось получить первую модель структуры 2:1 комплекса FRP:OCP и подтвердить ее с помощью биоинформатики и мутагенеза в обоих белках [6]. Полученные результаты проясняют механизм регуляторного действия FRP и открывают новые горизонты для исследования и практического применения фотозащитного механизма цианобактерий.

Публикации

1. Случанко Н. Н., Слонимский Ю. Б., Максимов Е. Г. Особенности белок–белковых взаимодействий в механизме фотозащиты цианобактерий. **Успехи биологической химии**. 57, 71–118 (2017).
2. Sluchanko N. N. et al. The purple Trp288Ala mutant of *Synechocystis* OCP persistently quenches phycobilisome fluorescence and tightly interacts with FRP. **Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.** 1858, 1–11 (2017).
- [3] Moldenhauer M. et al. Assembly of photoactive orange carotenoid protein from its domains unravels a carotenoid shuttle mechanism. **Photosynth Res.** 133, 327–341 (2017).
4. Sluchanko N. N., Slonimskiy Y. B., Moldenhauer M., Friedrich T. & Maksimov E. G. Deletion of the short N-terminal extension in OCP reveals the main site for FRP binding. **FEBS Lett.** 591, 1667–1676 (2017).
5. Slonimskiy Y. B. et al. Functional interaction of low-homology FRPs from different cyanobacteria with *Synechocystis* OCP. **Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.** 1859, 1–35 (2018).
6. Sluchanko N. N. et al. OCP–FRP protein complex topologies suggest a mechanism for controlling high light tolerance in cyanobacteria. **Nat. Commun.** 9, 1–15 (2018).

НОВЫЕ ТЕРМОФИЛЬНЫЕ АНАЭРОБНЫЕ БАКТЕРИИ КЛАССА *CLOSTRIDIA*, ВЫДЕЛЕННЫЕ ИЗ НАЗЕМНЫХ ГИДРОТЕРМ ДАЛЬНЕГО ВОСТОКА РОССИИ

Слободкина Г.Б., Баслеров Р.В., Костюкова Н.К., Бонч-Осмоловская Е.А., Слободкин А.И.

ИНМИ ФИЦ Биотехнологии РАН

Одними из наиболее значимых природных объектов для изучения филогенетического и метаболического разнообразия термофильных микроорганизмов служат наземные гидротермы Дальнего Востока России. Наибольшее количество культивируемых видов термофилов относятся к филуму *Firmicutes*. Термофильные *Firmicutes* и их термостабильные ферменты являются объектами биотехнологического применения.

Мы выделили, охарактеризовали и валидно опубликовали имена двух термофильных анаэробных бактерий, являющихся представителями новых родов класса *Clostridia* в филуме *Firmicutes*.

Thermodesulfitimonas autotrophica gen. nov., sp. nov. SF97^T выделен из наземной гидротермы острова Кунашир. Клетки палочковидные, подвижные с Грамположительным типом клеточной стенки. Температурный диапазон роста составляет 45-72°C (оптимум 65°C), диапазон pH 5,5-8,5 (оптимум 6,0-6,5). Изолят растет хемолитоавтотрофно с молекулярным водородом в качестве донора электронов, сульфитом или газообразным SO₂ в качестве акцептора электронов и бикарбонатом / CO₂ в качестве источника углерода. Сульфат, тиосульфат, элементная сера, Fe (III) и нитрат не используются в качестве акцепторов электронов. Филогенетический анализ показал, что штамм принадлежит к семейству *Thermoanaerobacteraceae* в классе *Clostridia*. Уникальными метаболическими характеристиками данного микроорганизма являются облигатная зависимость от восстановления сульфита для роста и неспособность использовать другие акцепторы электронов, в том числе сульфат.

Tepidibaculum saccharolyticum gen. nov., sp. nov. STR9^T выделен из горячего источника кальдеры Узон, Камчатка. Клетки спорообразующие, подвижные, прямые или слегка изогнутые палочки. Диапазон температур для роста - 30–58°C (оптимум 50°C), диапазон pH 5,0–10,5 (оптимум 8,0–9,0). Обладает бродильным типом метаболизма - использует моно-, ди- и полисахариды и сложные белковые соединения. Продукты брожения глюкозы - этанол, ацетат, водород и CO₂. Филогенетический анализ показал, что штамм принадлежит к семейству *Ruminococcaceae* в классе *Clostridia*.

Публикации

1. Slobodkina G.B., Baslerov R.V., Novikov A.A., Bonch-Osmolovskaya E.A., Slobodkin A.I. (2017) *Thermodesulfitimonas autotrophica* gen. nov., sp. nov. a thermophilic, obligate sulfite-reducing bacterium isolated from a terrestrial hot spring // **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. V. 67. P. 301-305. doi: 10.1099/ijsem.0.001619
2. Slobodkina G.B., Baslerov R.V., Kostyukova N.K., Bonch-Osmolovskaya E.A., Slobodkin A.I. (2018) *Tepidibaculum saccharolyticum* gen. nov., sp. nov. a moderately thermophilic, anaerobic, spore-forming bacterium isolated from a terrestrial hot spring // **Extremophiles**. V. 22. P. 761-768. doi: 10.1007/s00792-018-1036-5

МЕДЬ КАК СВЯЗУЮЩИЙ ЭЛЕМЕНТ ФИЦ БИОТЕХНОЛОГИИ РАН И ИСКУССТВА

Салина Е.Г.¹, Казакова Е.С.¹, Рябова О.Б.¹, Керученко Я.С.¹, Капрельянц А.С.¹, Жгун А.А.², Авданина Д.А.², Макаров В.А.¹, Никоненко Б.В.³, Ажикина Т.Л.⁴, Григоров А.В.⁴, Vocat A.⁵, Cole S.⁵, Huszár S.⁶, Zemanová J.⁶, Mikušová K.⁶

¹ ИНБИ ФИЦ Биотехнологии РАН

² ИНБ ФИЦ Биотехнологии РАН

³ Центральный НИИ Туберкулеза

⁴ ИБХ им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН

⁵ Global Health Institute, Lausanne, Switzerland

⁶ Comenius University of Bratislava, Bratislava Slovakia

Увеличение распространенности первичной резистентности к имеющимся антибиотикам и широкое распространение скрытой инфекции туберкулеза подразумевает растущую потребность в новых препаратах с новым видом действия. Антибактериальные свойства меди и ее накопление в фагосомах макрофагов, инфицированных бактериями, показывают, что Cu может быть одним из самых перспективных антибактериальных препаратов. Cu играет важную роль как для эукариотических, так и для многих прокариотических систем, однако, если их не контролировать должным образом, Cu может атаковать внутриклеточные кластеры железа и серы различных белков и катализировать реакцию подобную реакции Фентона, которая может вызывать перекисное окисление липидов и повреждение белка.

Нами было обнаружено, что новые производные 1-оксидо-5-R-пиридин-2-ил-имидотиокарбамата, производные аспергилловой кислоты, высокоактивны в борьбе против *M. tuberculosis*. Данные соединения обладают заметной бактерицидной активностью не только для активнорастущих, но и для покоящихся микобактерий, а также имеют умеренную цитотоксичность и эффективны против лекарственно-устойчивых клинических штаммов *M. tuberculosis*. Однако, принцип действия этой потенциальной группы противотуберкулезных препаратов оставался длительное время нам не ясным. За отчетный период нами был выяснен механизм их действия. Обнаружено, что 1-оксидо-5-R-пиридин-2-ил-имидотиокарбаматы превращаются в 1-гидрокси-5-R-пиридин-2(1H)-тионы с потерей имидокарбаматного фрагмента и, в свою очередь, образуют липофильные комплексы с Cu²⁺ с дальнейшей активной их транспортировкой в микобактериальную клетку. Таким образом, 1-гидроксипиридины являются медь-зависимыми ингибиторами *M. tuberculosis*, обеспечивающими внутриклеточное накопление токсичных концентраций меди. В цитоплазме микобактерий комплексы быстро метаболизируются с высвобождением свободной меди, которая и оказывает цитотоксичное действие. Показано что данный механизм комплексообразования реализуется только при взаимодействии 2-тиопиридинов с ионами меди, и не реализуется для других двух валентных металлов.

Цитотоксичность меди хорошо известна не только для микроорганизмов, но и для грибов. Поэтому было предложено попробовать использовать 2-тиопиридины и их способность транспортировать медь внутрь клетки для борьбы с грибами, и, в частности, для защиты от них предметов искусства. Данная работа была реализована совместно с группой генетической биоинженерии грибов. Действительно оказалось, что 2-тиопиридины имеют мощнейшее действие на широкий спектр грибов, оказывающих разрушительное действие на предметы искусства. В настоящий момент проводятся работы совместно с Третьяковской галерей по исследованию возможности использования 2-тиопиридинов для обеспечения долговременной защиты древнерусской живописи.

Публикации

1. Salina E.G., Ryabova O., Vocat A., Nikonenko B., Cole S.T., Makarov V. New 1-hydroxy-2-thiopyridine derivatives active against both replicating and dormant Mycobacterium tuberculosis, **J. Infect. Chemother.**, 2017, pii: S1341-321X(17)30097-1.
2. Salina E.G., Grigоров A.S., Azhikina T.L., Kaprelyants A.S., Mikusova K., Makarov V.A. New 1-hydroxy-2-thiopyridines combat Mycobacterium tuberculosis violating copper homeostasis, **FEBS JOURNAL**, 2017, 284, 333-334.
3. Salina E.G., Huszár S., Zemanová J., Keruchenko J., Riabova O., Kazakova E., Grigоров A., Azhikina T., Kaprelyants A., Mikušová K., Makarov V. Copper-related toxicity in replicating and dormant Mycobacterium tuberculosis caused by 1-hydroxy-5-R-pyridine-2(1H)-thiones. **Metallomics**. 2018, 10, 7, 992-1002.

Работа была поддержана грантами МОН и РФФИ.

В РЕЗУЛЬТАТЕ МЕТАГЕНОМНОГО АНАЛИЗА ГЛУБИННОГО ПОДЗЕМНОГО ВОДОНОСНОГО ГОРИЗОНТА ПОЛУЧЕНЫ ГЕНОМЫ НЕКУЛЬТИВИРУЕМЫХ ЛИНИЙ МИКРООРГАНИЗМОВ И ПОСТРОЕНА ЭКОЛОГИЧЕСКАЯ МОДЕЛЬ ПОДЗЕМНОЙ ЭКОСИСТЕМЫ

Кадников В.В., Белецкий А.В., Ракитин А.Л., Марданов А.В., Равин Н.В.

ИНБ ФИЦ Биотехнологии РАН

Глубинная подземная биосфера является самой большой по объему экосистемой и содержит до 20% всей биомассы микроорганизмов на Земле. Подземная биосфера остается одной из наименее изученных экологических ниш, большинство микроорганизмов которой относится к «некультивируемым» линиям. Целью работы было получение полных геномов доминирующих членов микробного сообщества для характеристики его состава, описания на геномном уровне «некультивируемых» линий микроорганизмов и их роли в экосистеме.

Мы исследовали микробное сообщество подземных вод Западно-Сибирского региона, залегающих на глубине около 2 км, методами метагеномики. Лишь около трети микроорганизмов относится к известным группам (преимущественно сульфат редукторов), а остальные представляли «некультивируемые» линии бактерий, в том числе таксоны высокого уровня. В сообществе были найдены представители филумов Chloroflexi, Ignavibacteriae, а также некультивируемых филумов Aminicenantes, BRC1 и Riflebacteria. Собраны геномы 25 бактерий, суммарно представляющие более 90% метагенома. Впервые получены геномы и определены пути метаболизма для бактерий кандидатных филумов BRC1 и Riflebacteria. Эти бактерии, *Sumerlaea chitinivorans* и *Ozemobacter sibiricus*, являются первыми описанными видами в этих филумах.

Реконструкция путей метаболизма представителя Riflebacteria показала, что это анаэроб, способный расти на углеводах путем ферментации или диссимиляционного восстановления Fe (III). Для бактерии BRC1 впервые определен полный кольцевой геном, анализ которого выявил пути ферментации различных полисахаридов, включая хитина, а также их окисления в процессах аэробного и анаэробного дыхания. Возможности роста на хитине подтверждает ферментативная активность рекомбинантной хитиназы. Ферментативный сахаролитический метаболизм был предсказан для представителя кандидатного филума Aminicenantes (OP8).

Построена экологическая модель подземной экосистемы. Органика из мезозойских отложений обеспечивает субстраты для респираторных и ферментативных микроорганизмов. Последние образуют водород, ацетат и другие простые органические соединения, которые могут быть использованы сульфат-редукторами.

Публикации

1. Kadnikov VV, Mardanov AV, Beletsky AV, Banks D, Pimenov NV, Frank YA, Karnachuk OV, Ravin NV. (2018) A metagenomic window into the 2-km-deep terrestrial subsurface aquifer revealed multiple pathways of organic matter decomposition. **FEMS Microbiol Ecol.** 94(10): fiy152.
2. Kadnikov VV, Mardanov AV, Beletsky AV, Rakitin AL, Frank YA, Karnachuk OV, Ravin NV. (2019) Phylogeny and physiology of candidate phylum BRC1 inferred from the first complete metagenome-assembled genome obtained from deep subsurface aquifer. **Syst Appl Microbiol.** 42(1): 67-76.
3. Kadnikov VV, Mardanov AV, Beletsky AV, Karnachuk OV, Ravin NV. (2019) Genome of the candidate phylum Aminicenantes bacterium from a deep subsurface thermal aquifer revealed its fermentative saccharolytic lifestyle. **Extremophiles.** doi: 10.1007/s00792-018-01073-5.

БЕЛОК PUB1 ДРОЖЖЕЙ *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* МОДУЛИРУЕТ ЭФФЕКТИВНОСТЬ ТЕРМИНАЦИИ ТРАНСЛЯЦИИ И ЗАЩИЩАЕТ ОТ ТОКСИЧНОСТИ ПРИОНА [*PSI*⁺]

Ураков В.Н., Митькевич О.В., Сафенкова И.В., Дергалев А.А., Тер-Аванесян М.Д.

ИНБИ ФИЦ Биотехнологии РАН,

Терминация трансляции у эукариот происходит при взаимодействии факторов терминации трансляции eRF1 и eRF3 (у дрожжей Sup45 и Sup35, соответственно) и белка ABCE1 (у дрожжей Rli1), обеспечивающего рециклинг рибосом. В настоящей работе мы показали, что белок Pub1 *Saccharomyces cerevisiae*, участвующий в образовании стресс-гранул, регуляции экспрессии генов и организации тубулинового цитоскелета, также принимает участие в терминации трансляции. Этот белок связывается с тяжелыми полисомами, обогащенными терминирующими рибосомами. Мы также показали, что Pub1 взаимодействует с N-концевым глутамин/аспарагин богатым прион-образующим доменом eRF3, при этом связывание Pub1 с рибосомами не зависит от его взаимодействия с Sup35. Отсутствие Pub1 снижало эффективность сквозного прочтения большинства, но не всех типов тетрануклеотидных стоп-сигналов. Это отличает Pub1 от большинства других описанных белков - партнеров по связыванию с факторами терминации трансляции, которые, как известно, модулируют сквозное прочтение всех нонсенс кодонов равномерно.

Помимо эффекта на терминацию трансляции Pub1 влиял на свойства прионного детерминанта [*PSI*⁺], возникающего в результате образования амилоидных полимеров белка Sup35. Делеция гена *PUB1* вызывала примерно 2-кратное увеличение количества прионных полимеров белка Sup35 в [*PSI*⁺]-клетках. Одновременное отсутствие Pub1 и белка Upf1, принимающего участие в нонсенс-опосредованном распаде мРНК, было летально для клеток, содержащих варианты [*PSI*⁺] с сильным, но не со слабыми супрессорными фенотипами. Анализ этого эффекта показал, что летальность вызывалась чрезмерной секвестрацией Sup45 в прионные агрегаты Sup35.

Полученные данные свидетельствуют о том, что Pub1 может выступать в качестве вспомогательного фактора трансляции, участвующего в тонкой настройке терминации трансляции, а также в качестве важного фактора детоксикации прионов.

Публикации

1. Urakov V.N., Mitkevich O.V., Safenkova I.V., Ter-Avanesyan M.D. Ribosome-bound Pub1 modulates stop codon decoding during translation termination in yeast. **FEBS J.** 2017; 284(12):1914-1930. doi: 10.1111/febs.14099. Epub 2017 May 29.
2. Urakov V.N., Mitkevich O.V., Dergalev A.A., Ter-Avanesyan M.D. The Pub1 and Upf1 proteins act in concert to protect yeast from toxicity of the [*PSI*⁺] prion. **Int J Mol Sci.** 2018; 19(11). pii: E3663. doi: 10.3390/ijms19113663.

**NATRONOBIFORMA CELLULOSITROPHA GEN. NOV., SP. NOV. –
НОВЫЙ ГАЛОАЛКАЛОФИЛЬНЫЙ ПРЕДСТАВИТЕЛЬ СЕМЕЙСТВА NATRIALBACEAE
ИЗ ГИПЕРСОЛЕННЫХ ЩЕЛОЧНЫХ ОЗЕР**

Сорокин Д.Ю., Хижняк Т.В., Кострикина Н.А., Ельченинов А.Г., Тошчаков С.В., Кубланов И.В.

ИНМИ ФИЦ Биотехнологии РАН

Шесть штаммов чрезвычайно галофильных и щелочнофильных эвриархей были выделены в чистую культуру из поверхностных рассолов и отложений гиперщелочных щелочных озер из различных географических местообитаний с различными формами нерастворимой целлюлозы в качестве субстрата для роста. Все штаммы, обозначенные AArce1, представляют собой облигатно аэробных гетеротрофов и могут использовать нерастворимые целлюлозы, целлобиозу, несколько растворимых глюкозидов и ксилан в качестве источника углерода и энергии. Это экстремальные галофилы, растущие в диапазоне от 2,5 до 4,8 М общего Na⁺ (оптимально при 4 М) и облигатные алкалофилы с диапазоном рН для роста от 7,5 до 9,9 (оптимально при 8,5–9).

Анализ гена 16S rRNA показал, что все шесть изолятов принадлежат к одному геномному виду, в основном связанному с *Saliphagus–Natribaculum–Halovarius*. Принимая во внимание существенное фенотипическое отличие новых изолятов от ближайших родственников и филогенетическую дистанцию, делается вывод, что группа AArce1 представляет новую ветвь на уровне рода в семействе *Natrialbaceae*, для которой предложено название *Natronobiforma cellulositropha* gen. nov., sp. nov. с типовым штаммом AArce15^T.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ №16-14-00121

Публикация

Sorokin D.Y., Khijniak T.V., Kostrikina N.A., Elcheninov A.G., Toshchakov S.V., Bale N.J., Sinnighe Damsté 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 // **Syst. Appl. Microbiol.** 2018. V. 41 (4). P. 355–362. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2018.04.002>

СИСТЕМА ДЛЯ СТАБИЛИЗАЦИИ ГИДРОФОБНЫХ БЕЛКОВ НА ОСНОВЕ МИНИШАПЕРОНА

Федоров А.Н.¹, Зенин В.А.¹, Шарапова О.А.², Юркова М.С.¹

¹ ИНБИ ФИЦ Биотехнологии РАН

² Alder Biopharmaceuticals, USA

Получена форма апикального домена шаперона GroEL (GrAD, **G**roEL **A**pical **D**omain), предназначенного служить лидером при создании слитых белков. В качестве основы для создания данного варианта GrAD был использован ген шаперона GroEL из термостабильного организма *Thermus thermophilus*. Триплеты, кодирующие остатки метионина, были заменены на триплеты, кодирующие остатки лейцина. Это обеспечивает возможность химического отщепления целевого белка по остатку метионина под действием бромциана, что существенно упрощает процедуру его последующей очистки. Полученный полипептидный лидер демонстрирует высокий уровень экспрессии в бактериальной системе, растворим и сохраняет растворимость после стандартных биохимических манипуляций. Исследована вторичная структура, термостабильность, а также растворимость белка в широком диапазоне температур. Получены конструкторы GrAD с двумя исходно нерастворимыми белками, с Е6 вируса папилломы человека 16 типа и с N-концевым фрагментом Е2 вируса гепатита С. Конструкторы экспрессируются в составе телец включения, но после растворения в мочеvine эффективно ренатурируют и впоследствии сохраняют стабильность и растворимость в нативных буферах в течение длительного времени. Были также созданы два варианта пермутированного GrAD, что расширяет стерические возможности для взаимодействия целевого белка с лидером, и исследованы их основные свойства.

Публикации

1. К.А. Куров, О.И. Саввин, М.С. Юркова, В.А. Зенин, Г.С.Нагибина, Б.С. Мельник, А.Н. Федоров. Физико – химическая характеристика варианта апикального домена шаперона GroEL для повышения уровня биосинтеза и увеличения стабильности целевых белков. **Биотехнология**, 2018, Т. 34, № 6, С. 43–50. doi: 10.21519/0234-2758-2018-34-6-43-50
2. О.А. Sharapova, M.S. Yurkova and A.N. Fedorov. Versatile format of minichaperone-based protein fusion system. 2019, **Biochemistry**, (accepted)

ОБНАРУЖЕНИЕ НОВОГО ФУНКЦИОНАЛЬНОГО ПОТЕНЦИАЛА У ПЛАНКТОМИЦЕТОВ

Иванова А.А., Куличевская И.С., Ракитин А.Л., Белецкий А.В., Марданов А.В., Равин Н.В., Дедыш С.Н.

ФИЦ Биотехнологии РАН

Планктомицеты (*Planctomycetes*) – это филогенетическая группа домена *Bacteria*, представители которой населяют широкий спектр местообитаний, отличаются сложной организацией клеток и большими геномами, кодирующими во многом неизученный функциональный потенциал. В раскрытии последнего ключевую роль играет использование молекулярных подходов. Представленные ниже работы позволили впервые доказать существование планктомицетов-хитинолитиков. Первое исследование (Ivanova et al., 2018) опиралось на использование метода метатранскриптомики для выявления гидролитического потенциала планктомицетов, населяющих воды заболоченного водосбора Верхней Волги. Пул проанализированных транскриптов насчитывал более 1.6 млн. последовательностей рРНК и 35.5 тыс. последовательностей мРНК планктомицетов. Обогащение образцов воды полимерными субстратами (целлюлозой, хитином, пектином и ксиланом) вызвало изменение состава пула транскриптов планктомицетов, что позволило идентифицировать группы планктомицетов, давшие достоверный отклик на внесение полимерных субстратов. Зарегистрированный в этих экспериментах отклик планктомицетов семейства *Gemmataceae* на внесение хитина представлял наибольший интерес, т.к. способность планктомицетов к деструкции этого биополимера ранее была неизвестна. Логическое продолжение этих исследований включало анализ генома и экспериментальную проверку хитинолитического потенциала планктомицета, выделенного из изученных образцов - *Fimbriiglobus ruber* SP5^T (Ravin et al., 2018). Геном этой бактерии -12.4 млн. нт. - является самым крупным из доступных на настоящий момент геномов планктомицетов. В геноме *Fimbriiglobus ruber* SP5^T выявлены гены, кодирующие хитиназы семейства GH18 гликозил гидролаз, β-N-ацетилглюкозаминидазу семейства GH20, а также полный набор ферментов, ответственных за использование ацетилглюкозамина. Один из генов, кодирующих гипотетическую хитиназу *Fimbriiglobus ruber* SP5^T, был клонирован и экспрессирован в *E. coli*, с последующим успешным подтверждением предполагаемой активности рекомбинантного фермента. В экспериментах с культивированием *Fimbriiglobus ruber* SP5^T на хитине было показано, что этот полимер используется планктомицетом в качестве источника азота, а не углерода. Развитие *Fimbriiglobus ruber* SP5^T наблюдалось только на микрочастицах хитина, прикрепление клеток к которым обуславливалось пиями IV типа, полный набор генов синтеза которых также был выявлен в геноме этого планктомицета. Это первые данные о наличии хитинолитического потенциала у планктомицетов, проливающие свет на одну из используемых ими стратегий выживания в экосистемах, бедных азотом, но богатых органическим углеродом, таких как болота и торфяники. Проведенные исследования важны для понимания функций планктомицетов в природных экосистемах.

Исследования выполнены в рамках работ по проекту программы МКБ и проекту РНФ № 16-14-10210.

Публикации

1. Ivanova A.A., Wegner C.E., Kim Y., Liesack W., Dedysh S.N. 2018. Metatranscriptomics reveals hydrolytic potential of peat-inhabiting *Planctomycetes*. **Antonie van Leeuwenhoek** 111: 801-809.
2. Ravin N.V., Rakitin A.L., Ivanova A.A., Beletsky A.V., Kulichevskaya I.S., Mardanov A.V., Dedysh S.N. 2018. Genome analysis of *Fimbriiglobus ruber* SP5^T, a planctomycete with confirmed chitinolytic capability. **Applied and Environmental Microbiology** 84: e02645-17, doi: 10.1128/AEM.02645-17.

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ОЛИГОНУКЛЕОТИДНОГО РЕЦЕПТОРА (АПТАМЕРА) С ОХРАТОКСИНОМ А: КОЛИЧЕСТВЕННЫЕ ЗАКОНОМЕРНОСТИ И АНАЛИТИЧЕСКОЕ ПРИМЕНЕНИЕ

Самохвалов А.В.¹, Сафенкова И.В.¹, Еремин С.А.^{1,2}, Жердев А.В.¹, Дзантиев Б.Б.¹

¹ ИНБИ ФИЦ Биотехнологии РАН

² МГУ имени М.В. Ломоносова, химический факультет

Аптамеры – олигонуклеотидные рецепторы – характеризуются высокой аффинностью и селективностью, простотой получения и модификации, стабильностью и возможностью многократных циклов связывания и высвобождения целевых лигандов. Эти свойства определяют перспективность аптамеров для широкого круга фундаментальных и прикладных разработок. В работе проведена характеристика взаимодействия аптамер-лиганд на примере связывания охратоксина А (ОТА) – токсичного низкомолекулярного метаболита плесневых грибов, контроль которого играет важную роль при обеспечении безопасности продуктов питания.

Проведена сравнительная характеристика связывающей способности ОТА-специфичных аптамеров методом поляризации флуоресценции и для дальнейшей работы выбран G-квадруплексный аптамер – 5'-GAT-CGG-GTG-TGG-GTG-GCG-TAA-AGG-GAG-CAT-CGG-ACA-3'. Структура образующегося G-квадруплекса подтверждена методом кругового дихроизма. Показано, что образование G-квадруплексной структуры аптамера в присутствии ионов двухвалентных металлов коррелирует с ОТА-связывающей активностью.

Для количественного описания процессов связывания аптамер-лиганд предложен и апробирован конкурентный подход с регистрацией анизотропии флуоресценции (АФ). Подход учитывает различие флуоресценции связанного и свободного состояния лиганда и влияние погрешности измерения на получаемые константы. Измеренная константа диссоциации комплекса аптамер-ОТА составила 63 ± 11 нМ. Показано соответствие полученных результатов данным, установленным методом равновесного диализа, – 80 ± 9 нМ.

Показано, что флуоресценция ОТА и конъюгата ОТА-флуоресцеин модулируется связыванием с аптамером. Спектры флуоресценции нативного и конъюгированного ОТА и их комплексов с аптамером характеризованы флуоресцентной спектроскопией с построением матриц экстинкции-эмиссии. Установлено, что при возбуждении светом с длиной волны $\lambda_{ex} = 265$ нм комплекса ОТА-аптамер происходит резонансный перенос энергии, сопровождающийся увеличением флуоресценции ОТА при $\lambda_{em} = 425$ нм и сдвигом спектра флуоресценции. Охарактеризованы возможности регистрации модулируемой флуоресценции ОТА как средства контроля его связывания с аптамером. Показано, что регистрация изменяющейся в присутствии аптамера флуоресценции позволяет выявлять ОТА с чувствительностью в 5,4 раза выше, чем регистрация собственной флуоресценции свободного ОТА. Предел обнаружения ОТА, достигаемый при детекции флуоресценции комплекса с аптамером ($\lambda_{ex}/\lambda_{em} = 265/425$ нм), равняется 1,2 нМ или 0,5 мкг/кг, что представляет практический интерес.

Показано, что аптамеры могут быть использованы в качестве рецепторных молекул для поляризационного флуоресцентного аптамерного анализа (ПФАА) ОТА – аналога поляризационного флуоресцентного иммуноанализа. Из-за меньшей молекулярной массы аптамеров по сравнению с антителами предложена концепция «молекулярных якорей» – включения аптамеров в комплексы с высокомолекулярными носителями, обеспечивающими большие отличия во вращательной подвижности свободного и связанного с аптамером конъюгата ОТА-флуоресцеин и, соответственно, более чувствительную конкурентную детекцию свободного ОТА. В качестве «якорей» были экспериментально охарактеризованы белки и наночастицы золота. Установлено, что предложенный подход позволяет снизить предел обнаружения ОТА в 40 раз. Для контроля ОТА в пробах вина разработана методика пробоподготовки и последующего проведения ПФАА. Показано, что использование якорного усиления обеспечивает выявление ОТА в концентрациях до 2,8 нМ (1,1 мкг/кг), что меньше предельно допустимого содержания ОТА в вине. Принципиальными достоинствами ПФАА является методическая простота (одностадийность, отсутствие необходимости в разделении реагентов) и экспрессность анализа (достаточность 5-минутной инкубации для достижения равновесия реакции аптамер-лиганд).

Результаты проведенного исследования свидетельствуют о перспективности применения аптамеров как рецепторных молекул (альтернатива антител) в биоаналитических системах и демонстрируют возможности реализации гомогенных методов флуоресцентного и поляризационного флуоресцентного анализа с их использованием.

Публикации

1. Samohvalov A.V., Safenkova I.V., Eremin S.A., Zherdev A.V., Dzantiev B.B. Use of anchor protein modules in fluorescence polarisation aptamer assay for ochratoxin A determination. **Analytica Chimica Acta**, 2017, v. 962, p. 80-87.
2. Samohvalov A.V., Safenkova I.V., Zherdev A.V., Dzantiev B.B. Measurement of (aptamer – small target) KD using the competition between fluorescently labeled and unlabeled target and the detection of fluorescence anisotropy. **Analytical Chemistry**, 2018, v. 90, N 15, p. 9189-9198.
3. Samohvalov A.V., Safenkova I.V., Zherdev A.V., Dzantiev B.B. The registration of aptamer–ligand (ochratoxin A) interactions based on ligand fluorescence changes. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, 2018, v. 505, N 2, p. 536-541.

ОЦЕНКА СТАТИСТИЧЕСКОЙ ЗНАЧИМОСТИ ЭНЕРГИИ РНК-РНК ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ

Антонов И.В.¹, Мазуров Е.¹, Бородовский М.Ю.², Медведева Ю.А.¹

¹ *ИНБИ ФИЦ Биотехнологии РАН*

² *Технологический Университет штата Джорджия, Атланта, США*

Существующие биоинформатические программы предсказания межмолекулярных РНК-РНК дуплексов (например, *bifold*, *IntaRNA* или *RNAup*) используют свободную энергию (ΔG), для оценки силы предсказанных взаимодействий. В крупномасштабных исследованиях имеется ряд причин, по которым более разумно использовать статистические оценки вместо абсолютных значений ΔG . Во-первых, конвертация “сырых” значений ΔG в вероятностные меры (такие как *p-value*) делает их сравнимыми между различными РНК. Например, тесты на симулированных последовательностях указывают на то, что свободная энергия РНК-РНК связывания увеличивается с длиной входных случайных последовательностей. Это объясняется тем, что более длинные РНК имеют больше возможностей для образования межмолекулярных дуплексов, чем более короткие РНК. Таким образом, оценка статистической значимости должна производиться с учетом свойств (таких как длина и GC-состав) входных транскриптов. Во-вторых, многие существующие программы не оптимизированы для работы с полными транскриптомами. Это задача особенно важна для предсказания РНК-РНК гибридизации, т.к. в этом процессе необходимо учитывать вторичные структуры обоих транскриптов. Наконец, в крупномасштабных исследованиях (таких как поиск по всему геному или транскриптому) большие абсолютные значения ΔG могут быть получены просто случайно. Таким образом, необходимо делать поправку на множественное тестирование. Для этой цели вычисляются скорректированные *p-value* с помощью метода Бенжамини-Хотчберга.

Для решения вышеописанных задач и мы разработали программу ASSA, которая позволяет осуществлять полногеномный поиск РНК-РНК взаимодействий. Наша программа не только вычисляет статистическую значимость каждого предсказания, но и ускоряет процесс поиска потенциальных партнеров с помощью комбинирования программ локального выравнивания и термодинамических алгоритмов. Вкратце, ASSA ускоряет процесс поиска благодаря быстрому определению возможных участков связывания с помощью алгоритмов локального выравнивания, после чего используются термодинамические подходы для вычисления свободной энергии взаимодействия. Очевидно, что эта энергия зависит от нескольких свойств входных последовательностей, таких как длина и GC-состав. Статистическая значимость (*p-value*) вычисляется из распределения значений энергии, полученного для случайных последовательностей такой же длины и GC-состава. Результаты сравнения с существующими подходами показали, что программа ASSA позволяет лучше выявлять экспериментально-подтвержденные РНК-РНК связывания.

Публикация

Antonov I, Mazurov E, Borodovsky M, Medvedeva YA. (2018) Prediction of lncRNAs and their interactions with nucleic acids: benchmarking bioinformatics tools. **Brief Bioinform**. DOI: 10.1093/bib/bby032

ИЗУЧЕНИЕ ОСОБЕННОСТЕЙ ДЕТЕКЦИИ КАСПАЗЫ 3 МЕТОДОМ FLIM НА ОПУХОЛЕВЫХ КСЕНОГРАФТАХ IN VIVO

Жердева В.В.¹, Казачкина Н.И.¹, Щеславский В.И.^{1,2}, Савицкий А.П.¹.

¹ ИНБИ ФИЦ Биотехнологии РАН

² Becker & Hickl GmbH, Berlin, Germany

Прижизненный неинвазивный мониторинг молекулярных событий на уровне целого организма является основной парадигмой флуоресцентного молекулярного имиджинга. Флуоресцентные цветные белки и сенсоры на их основе, с одной стороны, и современные методы детекции флуоресцентного сигнала, такие как FLIM (Fluorescence life-time imaging microscopy), с другой стороны, позволяют не только визуализировать, но и интерпретировать события, происходящие на молекулярном уровне.

Целью нашей работы было продемонстрировать и изучить особенности визуализации каспазы 3 в опухолевых ксенографтах на мышах линии nude методом FLIM с использованием генетически кодируемого сенсора каспазы 3 TR23K [1]. Данный сенсор представляет собой FRET-пару красных флуоресцентных белков, соединенных гибким линкером, содержащим сайт распознавания каспазой 3. Эффективность применения данного сенсора предварительно была продемонстрирована на опухолевых клетках в культуре: активация каспазы приводила к увеличению среднего времени жизни сенсора с 1,8 нс до 2,5 нс.

Активация каспазы в клетках опухолевых ксенографтов под действием противоопухолевых средств также регистрировали по изменению среднего времени жизни сенсора, которое составило от 1,6-1,9 нс до 2,1-2,4 нс. При этом наблюдали ряд особенностей: 1) время жизни сенсора *in vivo* отличалось от времени жизни сенсора *in vitro*, что скорее всего объясняется наличием дополнительного «оптического» вклада в виде эндогенных флуорофоров и свойств ткани рассеивать свет, а также характером роста опухоли, глубиной инвазии; 2) время жизни изменялось по мере роста ксенографта, что объясняется быстрой наработкой сенсора в клетке под сильным цитомегаловирусным промотором; 3) распределение средних времен жизни в ксенографтах отличалось внутриопухолевой и межопухолевой гетерогенностью, что может быть связано с механизмами клеточной регуляции и с метаболическими особенностями опухолей (клеточный цикл, асинхронное вхождение в клеточный цикл, спонтанный апоптоз, существующий градиент pH в опухоли), особенности кровоснабжения опухоли,- это в свою очередь влияет и на фармакокинетику противоопухолевого препарата и его последующее неоднородное распределение по опухоли.

Таким образом, продемонстрирована возможность детекции каспазы 3 *in vivo* методом FLIM. Преимуществом данного подхода является возможность мониторинга одной и той же опухоли в динамике на протяжении длительного времени (в нашем эксперименте до 1 месяца). Этот подход может быть использован для тестирования новых противоопухолевых средств, для выбора новых схем и режимов комбинированной химиотерапии, для разработки персонализированных подходов в лечении опухолевых заболеваний.

Таким образом, впервые продемонстрирована возможность продолжительного прижизненного неинвазивного мониторинга активации каспазы 3 в опухолевых ксенографтах с помощью генетически кодируемого FRET-сенсора каспазы 3 методом FLIM.

Публикаций

1. Victoria Zherdeva, Natalia I Kazachkina, Vladislav Shcheslavskiy, Alexander P Savitsky. Long-term fluorescence lifetime imaging of a genetically encoded sensor for caspase-3 activity in mouse tumor xenografts. **J. Biomed. Optics**. 2018. V. 23, N3, P. 035002

ИДЕНТИФИКАЦИЯ И АНАЛИЗ ФАКТОРОВ ТРАНСКРИПЦИИ СЕМЕЙСТВА YABBY У ВИДОВ ТОМАТА (РОД *SOLANUM*) И ПЕРЦА (РОД *CAPSICUM*)

Филюшин М.А.¹, Слугина М.А.¹, Пышная О.Н.², Джос Е.А.^{1,2}, Щенникова А.В.¹, Кочиева Е.З.¹

¹ ИНБ ФИЦ Биотехнологии РАН

² Федеральный научный центр овощеводства, пос. ВНИИССОК, МО

Все процессы роста и развития растений контролируются факторами транскрипции, эволюция которых является одной из основных причин морфологического многообразия в растительном царстве. Факторы транскрипции семейства YABBY определяют абаксиально-адаксиальную асимметрию всех наземных латеральных органов семенных растений, а также вовлечены в процессы формирования органов цветка.

В данной работе нами впервые были идентифицированы полные нуклеотидные последовательности трех генов семейства YABBY (*YABBY1*, *YABBY3*, *INO*) у зеленоплодных и красноплодных видов томата (род *Solanum* секция *Lycopersicum*) и видов перца (род *Capsicum*). Определена экзон-интронная структура анализируемых генов, а также варибельность их нуклеотидной и аминокислотной последовательностей. Выявлены радикальные замещения аминокислотных остатков, в том числе и в консервативных доменах. Построены вероятные трёхмерные структуры белков YABBY1, YABBY3 и INO, выявлена идентичность третичных структур консервативных доменов.

Проведенный филогенетический анализ полногеномных последовательностей *YABBY1* и *YABBY3* подтвердил направление эволюции томатов от зеленоплодных перекрестноопыляемых к красноплодным самоопыляемым видам.

Впервые определён профиль ко-экспрессии генов *YABBY1* и *YABBY3* в листьях, бутонах, цветках и зрелых плодах видов томата. Показано, что уровень ко-экспрессии *YABBY1* и *YABBY3* коррелирует с размерами листа и цветка видов томата.

Один из членов семейства YABBY, фактор транскрипции FASCIATED (*FAS*), определяет размер плода у видов томата. У всех дикорастущих видов томата плоды имеют небольшой размер, так как содержат всего две плодовые камеры, что связано с негативной регуляцией экспрессии гена *LOCULE NUMBER* фактором транскрипции *FAS*. У томата овощного (*S. lycopersicum*) размеры плодов значительно варьируют, что связано в первую очередь с увеличением количества плодовых камер в плоде за счет инактивации гена *FAS* (протяженная вставка в интроне I, что препятствует его экспрессии), в результате чего снимается негативная регуляция гена *LOCULE NUMBER*.

Нами был разработан и верифицирован ДНК-маркер на инактивированную аллель гена *FAS*. Использование разработанного маркера в процессе анализа расщепляющегося потомства F2 (на стадии проростков) при создании крупноплодных сортов томата позволит значительно сократить финансовые и трудовые затраты.

Публикаций

1. Филюшин М.А., Слугина М.А., Щенникова А.В., Кочиева Е.З. *YABBY3*-ортологи дикорастущих видов томата: структура, полиморфизм и экспрессия. *АКТА NATURAE*. 2017. Т. 9. № 4 (35). С. 106-115
2. Филюшин М.А., Слугина М.А., Щенникова А.В., Кочиева Е.З. Идентификация и анализ экспрессии гена *YABBY1* у дикорастущих видов томатов. *Генетика*. 2018. Т.54, № 5, с. 535–546
3. Filyushin M., Slugina M., Pyshnaya O., Kochieva E., Shchennikova A. Differential expression profiling of the *YABBY1* and *YABBY3* genes in *Solanum* and *Capsicum* species. *FEBS Open Bio*. 2018. V. 8 (S1). P. 118
4. Филюшин М.А., Слугина М.А., Пышная О.Н., Кочиева Е.З., Щенникова А.В. Структурный анализ генов-гомологов *INNER NO OUTER (INO)* у видов рода *Capsicum*. *Генетика*. 2018. Том 54, № 6, с. 735–740
5. Филюшин М.А., Слугина М.А., Джос Е.А., Кочиева Е.З., Щенникова А.В. Коэкспрессия генов *YABBY1* и *YABBY3* в латеральных органах видов томата рода *Solanum* секции *Lycopersicon*. *ДАН*. 2018. том 478, № 6, с. 716–719
6. Филюшин М.А., Слугина М.А., Кочиева Е.З., Щенникова А.В. Характеристика генов-гомологов *INNER NO OUTER* у дикорастущих видов томата. *Генетика*. 2019. Т.55. №2. С. 223–228

СВЯЗЬ РЕГУЛЯЦИИ ТРАНСПОРТА ФОСФАТА В КЛЕТКУ С ГЛИКОЗИЛИРОВАНИЕМ БЕЛКОВ В СЕКРЕТОРНОМ ПУТИ ДРОЖЖЕЙ

Каргинов А.В., Тер-Аванесян М.Д., Агафонов М.О.

ИНБИ ФИЦ Биотехнологии РАН

Два близкородственных вида дрожжей, *Ogataea polymorpha* и *O. parapolymorpha*, существенно отличаются друг от друга по устойчивости к токсичному аналогу фосфата, ортованадату. Поиск генов, определяющих это различие, выявил два таких гена. Один из них кодирует гомолог Mnn4 *Saccharomyces cerevisiae*, ответственный за присоединение маннозилфосфата к гликозидным цепям белков в секреторном пути. Этот ген был обозначен *ABV1* (Alcian Blue staining, Vanadate resistance). Другой ген, обозначенный как и его гомолог *S. cerevisiae* *PHO87*, кодирует низкоаффинный переносчик/сенсор фосфата плазмалеммы. Эффект Pho87 на устойчивость к ортованадату был двояким, поскольку, с одной стороны, он снижал устойчивость, а с другой, его наличие требовалось для выраженного защитного эффекта при увеличении концентрации фосфата в среде. Таким образом проявлялась двойная функция этого белка как переносчика и как сенсора внешнего фосфата. Роль Pho87 в реакции клетки на изменение фосфата в среде была продемонстрирована в экспериментах по его влиянию на регуляцию промотора гена *PHO84*, кодирующего высокоаффинный переносчик фосфата плазмалеммы. Эффект *Abv1* также был сложным, поскольку он, с одной стороны, влиял на количество белка Pho87, а с другой – усиливал репрессию промотора гена *PHO84*, по независимому от Pho87 механизму. В работе обсуждается роль идентифицированных белков в различии по устойчивости к ортованадату между *O. polymorpha* и *O. parapolymorpha*.

Публикация

Karginov AV, Fokina AV, Kang HA, Kalebina TS, Sabirzyanova TA, Ter-Avanesyan MD, Agaphonov MO. Dissection of differential vanadate sensitivity in two *Ogataea* species links protein glycosylation and phosphate transport regulation. **Scientific Reports**. 2018, 8:16428. doi: 10.1038/s41598-018-34888-5.

НОВЫЕ ПСИХРОТОЛЕРАНТНАЯ И УМЕРЕННО ТЕРМОФИЛЬНАЯ БАКТЕРИИ, ВЫДЕЛЕННЫЕ ИЗ АНТРОПОГЕННЫХ МЕСТ ОБИТАНИЯ

Паршина С.Н.¹, Стрепис Н.², Соуза Д.², Стамс А.², Журавлева Е.А.¹, Никитина А.А.¹, Груздев Д.С.³, Кострикина Н.А., Ножевникова А.Н.¹

¹ ИНМИ ФИЦ Биотехнологии РАН

² Университет Вагенингена, Нидерланды

³ ИНБ ФИЦ Биотехнологии РАН

Из антропогенных мест обитания выделены две новые бактерии, которые могут быть использованы в биотехнологии.

Новый вид рода *Trichococcus* штамм Art1^T был выделен из низкотемпературного EGSB реактора, работавшего на смеси ЛЖК (ацетата, пропионата и бутирата). Сиквенс гена 16S рРНК штамма был очень близок с сиквенсами нескольких других видов *Trichococcus* (99.7-99.9%), но уровни цифровой ДНК-ДНК гибридизации были ниже, чем рекомендовано для создания нового вида, указывая, что штамм Art1^T является новым видом рода *Trichococcus*. Клетки штамма – грамположительные неподвижные кокки, диаметром 0.5–2.0 μm, бывают одиночными, в парах, в виде коротких цепочек или небольших конгломератов, образуют экзополисахариды. Рост от –2 до 30°C (оптимум 25–30°C). Штамм использует некоторые углеводы; основными продуктами ферментации глюкозы были лактат, ацетат, формиат и этанол. На основании геномных и физиологических характеристик был предложен новый вид рода *Trichococcus*, *Trichococcus scherbakoviae*. Типовой штамм Art1^T (=DSM 107162^T =VKM B-3260^T).

Из метаногенного консорциума, устойчивого к концентрации бутирата 170 mM, полученного из сброженного осадка сточных вод Курьяновской очистной станции, выделена умеренно термофильная палочка, подвижная за счет латеральных жгутиков. Штамм растет при температуре 20–70°C, с оптимумом при 55–60°C, образует терминальные споры. Использует сахарозу, глюкозу и другие сахара, а также дрожжевой экстракт. Использует тиосульфат в качестве акцептора электронов с образованием элементарной серы внутри клеток и сероводорода. При культивировании с гидрогенотрофным метаногеном способен синтрофно разлагать глицерин. Филогенетически близок к *Tepidanaerobacter acetatoxydans* и *T. syntrophicus* (93% сходства 16S рРНК). Сравнение филогенетических, морфологических и физиологических признаков позволяет отнести штамм SP2 к новому виду нового рода. Штамм получил название *Thermocaeonobacter saccharolyticus* SP2 (=DSM 107955^T). Статья готовится к печати.

Публикация

Parshina S.N., Strepis N., Aalvink S., Nozhevnikova A.N., Stams A.J.M., Sousa D.Z. *Trichococcus scherbakoviae* sp. nov., isolated from a laboratory-scale anaerobic EGSB bioreactor operated at low temperature // **Int. J. Syst. Environ. Microbiol.** 2019. V. 69. P. 529-534.

МОНОМЕРИЗАЦИЯ ФЛУОРЕСЦЕНТНОГО БЕЛКА SAASoti С ПОМОЩЬЮ РАЦИОНАЛЬНОЙ ЗАМЕНЫ ЕДИНИЧНЫХ АМИНОКИСЛОТНЫХ ОСТАТКОВ

Соловьев И.Д.^{1,2}, Гавшина А.В.¹, Aditya S. Katti³, Alexey I. Chizhik³, Винокуров Л.М.⁴, Лапшин Г.Д.¹, Ивашина Т.В.⁵, Хренова М.Г.^{1,2}, Киреев И.И.⁶, Ingo Gregor³, Jörg Enderlein³ & Савицкий А.П.^{1,2}

¹ ИНБИ ФИЦ Биотехнологии РАН

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

³ Университет Гёттингена, Третий физический институт биофизики, Гёттинген, Германия

⁴ Филиал ИБХ им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН

⁵ ИБФМ им. Г.К. Скрябина РАН, Пущино

⁶ МГУ им. М.В. Ломоносова, НИИ Физико-Химической Биологии им. А.Н. Белозерского

Флуоресцентный белок SAASoti, изначально выделенный из коралла *Stylocoeniella armata* как фотоконвертируемый ФБ (зеленый → красный), обладает также свойством обратимого перехода из флуоресцирующей (яркой) формы в темное состояние, таким образом, являясь единственным описанным на данный момент ФБ, комбинирующим оба эти свойства в гене дикого типа. Однако широкое использование ФБ SAASoti в супер-разрешающей микроскопии ограничено его агрегатным состоянием – в растворе SAASoti находится в тетрамерной форме, склонной к агрегации. В данной работе удалось получить мономерную и преимущественно тетрамерную формы SAASoti. Для достижения данной цели использовали два подхода: анализ структурной аналогии SAASoti с другими ФБ, чьи мономерные формы были успешно получены и описаны в литературе, а также метод химической модификации поверхностных заряженных групп (ϵ -NH₂-группы лизинов) янтарным ангидридом. Опыт мономеризации сходных ФБ показал, что наиболее перспективной является замена V127T в гидрофобном АС-интерфейсе. Эта замена привела к мономеризации, что подтверждают данные по гель-фильтрации и FCS, и является наиболее перспективной формой белка. Для определения а.о., модифицированных янтарным ангидридом, использовали метод масс-спектрометрии. Так, замена K145E в заряженном интерфейсе АВ привела к полной тетрамеризации ФБ SAASoti в растворе. Для подтверждения возможности использования V127T SAASoti в супер-разрешающей микроскопии была создана генетическая конструкция, экспрессирующая ген структурного белка виментина, содержащий ген V127T SAASoti на С-конце. И был продемонстрирован метод PALM для данной конструкции в клетках HeLa.

Публикация

Solovyev, I.D., Gavshina, A.V., Katti, A.S. Chizhik, A.I., Vinokurov, L.M., Lapshin, G.D., Ivashina, T.V., Khrenova, M.G., Kireev, I.I., Gregor, I., Enderlein, J., Savitsky, A.P. Monomerization of the photoconvertible fluorescent protein SAASoti by rational mutagenesis of single amino acids. // **Scientific reports**. 2018. vol. 8. 15542. DOI: 10.1038/s41598-018-33250-z

СООБЩЕСТВО АНОКСИГЕННЫХ ФОТОТРОФНЫХ БАКТЕРИЙ МЕРОМИКТИЧЕСКОГО ОЗЕРА ТРЕХЦВЕТНОЕ (КАНДАЛАКШСКИЙ ЗАЛИВ БЕЛОГО МОРЯ)

Лунина О.Н.¹, Саввичев А.С.¹, Колганова Т.В.², Веслополова Е.Ф.¹, Летарова М.А.¹, Летаров А.В.¹, Горленко В.М.¹

¹ ИНМИ ФИЦ Биотехнологии РАН

² ИНБ ФИЦ Биотехнологии РАН

В течение марта 2012–сентября 2014 гг. были проведены исследования сообщества аноксигенных фототрофных бактерий (АФБ) водной толщи оз. Трехцветное. В озере прослежено формирование слоя зеленоокрашенных (з/о) зеленых серобактерий (ЗСБ) высокой плотности (общей численностью не менее 10^8 кл. мл⁻¹), ранее не встречавшегося ни в одном из известных исследованных озер. Показано, что следствием этого является необычная, сохраняющаяся в течение года, структура сообщества АФБ, с расположением коричневоокрашенных (к/о) зеленых серобактерий (ЗСБ) выше зеленоокрашенных (з/о) ЗСБ.

Из проб воды верхней части сероводородной зоны озера выделено 4 штамма АФБ. К/о и з/о штаммы ЗСБ оказались филогенетически близкими между собой и с типовым з/о видом *Chlorobium phaeovibrioides* DSM 265, имея 99% сходства по данным сиквенса гена 16S рРНК. Пурпурные бактерии оказались близки к соленоводным серным бактериям *Thiocapsa marina* и к пресноводным несерным бактериям *Rhodospseudomonas palustris*.

Работа выполнена по теме госзадания, а также с использованием финансовых средств проекта РФФИ № 17-04-01263. Идентификация бактерий выполнена в рамках выполнения госзадания с использованием научного оборудования ЦКП “Биоинженерия”.

Публикации

1. Savvichev A., Babenko V., Lunina O., Letarova M., Boldyreva D., Weslopolova E., Demidenko N., Kokryatskaya N., Krasnova E., Gaysin V., Kostryukova E., Gorlenko V., Letarov A. Sharp water column stratification with an extremely dense microbial population in a small meromictic lake Trekhztetnoe // **Environmental Microbiology and Environmental Microbiology Reports**. 2018. V. 20. P. 3784–3797.
2. Лунина О.Н., Саввичев А.С., Бабенко В.В., Болдырева Д.И., Кузнецов Б.Б., Краснова Е.Д., Кокрятская Н.М., Веслополова Е.Ф., Воронов Д.А., Демиденко Н.А., Летарова М.А., Летаров А.В., Горленко В.М. Сезонные изменения структуры сообщества аноксигенных фототрофных бактерий меромиктического озера Трехцветное (Кандалакшский залив, Белого моря). **Микробиология**. 2019. Т. 88. № 1. С. 100–115.

ПРОТЕОМНЫЕ МЕТОДЫ ПРИ РЕШЕНИЯХ ОТДЕЛЬНЫХ БИОХИМИЧЕСКИХ И БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ ЗАДАЧ

Шишкин С.С.¹, Ковалев Л.И.¹, Ковалева М.А.¹, Еремина Л.С.¹, Лисицкая К.В.¹, Пашинцева Н.В.¹, Ярополов А.И.¹, Морозова О.В.¹, Шумакович Г.П.¹, Хлупова М.Е.¹, Васильева И.С.¹, Шестакова А.К.², Кисин А.В.², Чертков В.А.³, Зайцева Е.А.³

¹ ИНБИ ФИЦ Биотехнологии РАН

² Государственный НИИ химии и технологии элементоорганических соединений:

³ МГУ им. М.В. Ломоносова, химический факультет

В отчетный период протеомные методы были использованы при решениях трех видов задач: (а) системный анализ белков в культивируемых злокачественных клетках человека (ЗКЧ) и поиск белков потенциальных биомаркеров; (б) разработки и апробация клеточных биотест-систем; (в) анализ мышечных белков в мясном сырье, полуфабрикатах и некоторых готовых мясных продуктах.

По задаче (а) проведенные исследования ЗКЧ позволили расширить сформированную ранее отечественную базу данных «Протеомика злокачественных клеток» (БД «ПЗК»). В частности, в 2018 г. масс-спектрометрическими методами в протеомном профиле белков остеосаркомы удалось идентифицировать шестьдесят девять белковых фракций, характеристики которых включены в модуль «Белки остеосаркомы» БД «ПЗК. Среди них оказалось 9 РНК-связывающих белков, которые представляют интерес как регуляторы сплайсинга и функционирования теломер, а некоторые из них как потенциальные биомаркеры.

По задаче (б) сотрудниками лаборатории химической энзимологии было синтезировано три вида флавоноидов. Один из них - ДГК-АБК, полученный в результате ферментативной дериватизацией дигидрокверцетина с парааминобензойной кислотой охарактеризовали методами протонного и углеродного ЯМР и хромато-масс-спектрометрии, что позволило установить его структуру. Параллельно на основе культивируемых ЗКЧ (линии RD и HT-29) были сформированы и апробированы две биотест-системы, с помощью которых изучены цитотоксические, антиоксидантные и цитопротективные свойства синтезированных флавоноидов и других БАВ. В результате была показана эффективность сформированных биотест-систем, в частности для определения биологических эффектов у некоторых флавоноидов, а протеомными методами удалось обнаружить определенные изменения белковых профилей.

По задаче (в) проведен сравнительный анализ протеомных профилей скелетных мышц четырех видов сельскохозяйственных животных. Изучены условия образования биологически активных пептидов в мясном сырье под влиянием протеаз различного происхождения. Отмечены некоторые растительные протеазы, которые способны эффективно образовывать фрагменты ряда мышечных белков и биопептиды. Получено положительное решение по заявке на изобретение «Способ подтверждения аутентичности вареных колбасных изделий» № 2018119604/04(030814), Основой предложенного способа является использование протеомных технологий для сравнения ряда маркерных белков.

Публикации

1. Eremina L, Pashintseva N, Kovalev L, Kovaleva M, Shishkin S. Proteomics of mammalian mitochondria in health and malignancy: From protein identification to function. // **Anal. Biochem.** 2018. Vol. 552. P.4-18.
2. Хлупова М.Е., Морозова О.В., Васильева И.С., Шумакович Г.П., Пашинцева Н.В., Ковалев Л.И., Шишкин С.С., Чертков В.А., Шестакова А.К., Кисин А.В., Ярополов А.И. Лакказы-иницированное гетеросочетание дигидрокверцетина и парааминобензойной кислоты: влияние полученного соединения на клеточную пролиферацию. **Биохимия.** 2018. Т.83. №8. С.1248-1259.
3. Хлупова М.Е., Васильева И.С., Шумакович Г.П., Морозова О.В., Зайцева Е.А., Чертков В.А., Шестакова А.К., Кисин А.В., Ярополов А.И. Биотрансформация дигидрокверцетина с участием медьсодержащих оксидаз. // **Вестник Московского университета. Серия 2: Химия.** 2018. Т. 59. № 5. С. 361-368.
4. Чернуха И.М., Машенцева Н.Г., Вострикова Н.Л., Ковалев Л.И., Ковалева М.А., Афанасьев Д.А., Бажаев А.А. Образование биологически активных пептидов в мясном сырье под влиянием протеаз различного происхождения. **Сельскохозяйственная биология** 2018, том 53, №6, С. 1247-1261.
5. Kotenkova E., Lukinova E., Leonid Kovalyov L. BOVINE MUCOUS MEMBRANES AS A SOURCE OF ANTIMICROBIAL COMPOUNDS. // **Potravinarstvo Slovak Journal of Food Sciences.** 2018. Vol. 12, No. 1, p. 667-672. doi: <https://doi.org/10.5219/976>
6. Шишкин С.С., Ковалев Л.И., Пашинцева Н.В., Ковалева М.А., Еремина Л.С., Лисицкая К.В., Садыхов Э.Г. Протеомные технологии в исследованиях белков злокачественных клеток. Белки гетерогенных ядерных РНП в клетках сарком человека. **Прикладные информационные аспекты медицины.** 2018. Т.21. №4. С. 139-146.
7. Altunelatan C., Koroleva O., Fedorova T., Torkova A., Lisitskaya K., Tsentelovich M., Aleksey Kononikhin A., Popov I., Vasina D., Kovalyov L., Çelika U. An in vitro and in silico study on the antioxidant and cell culture-based study on the chemoprotective activities of fish muscle protein hydrolysates obtained from European seabass and gilthead seabream. // **Food Chemistry.** Опубликовано on line 03 August 2018 0308-8146 <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.08.004>. **Журнальная публикация** 2019, Vol. 271. P. 724-732.
8. Shishkin S, Kovalev L, Pashintseva N., Kovaleva M., Lisitskaya K Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins involved in the functioning of telomeres in malignant cells. // **Int. J. Mol. Sci.** 2019 pp. 1-27. письмо об официальном принятии к публикации 04.02.2019.

СОВРЕМЕННЫЕ ДОЛОМИТОВЫЕ СТРОМАТОЛИТЫ ПЕТУХОВСКОГО СОДОВОГО ОЗЕРА

Самылина О.С.¹, Зайцева Л.В.²

¹ ИНИИ ФИЦ Биотехнологии РАН

² Палеонтологический институт им. А.А. Борисяка РАН

Несмотря на то, что содовые озера в геологическом масштабе времени представляют собой эфемерные образования, в настоящее время накоплено достаточно доказательств того, что они могли быть широко распространены в архее–раннем протерозое, играя важную роль в формировании и сохранении первоначальных наземных микробных сообществ (гипотеза «содового континента» Г.А. Заварзина). На территории Алтайского края, в Кулундинской степи, сосредоточено огромное количество соляных озер различного химического состава, в том числе содовых, для которых характерны стабильно щелочные значения рН около 10 за счет высокого содержания CO_3^{2-} и HCO_3^- . Содовые озёра этого региона подвержены циклическим колебаниям температуры, солёности, периодов высыхания и обводнения. Они никогда ранее не исследовались на предмет наличия в них микробиолитов.

Содовое оз. Петуховское располагается в Ключевском районе Алтайского края и представляет собой динамичный мелководный водоём с общим содержанием солей, в различные годы варьирующим от 30 до 200 г/л (за период наблюдений с 2002 по 2018 гг). В этом озере обнаружены дырчатые и кавернозные корочки небольшого размера (10-20 см в диаметре и 5-10 мм толщиной) с фототрофным сообществом на поверхности. В составе фототрофного сообщества доминируют цианобактерии (*Geitlerinema* sp. и *Nodosilinea* sp.), зелёная водоросль *Stenocladus circinnatus* и диатомовые водоросли. На поперечном сечении видно чередование тонких минерализованных слоев различного цвета и структуры, что позволяет определить данные органо-седиментационные образования как современные строматолиты. Минералогический анализ (ИК-спектроскопия и рентгеновская дифрактометрия) выявил присутствие в составе строматолита Са-Мг-карбонатов различного состава с преобладанием стехиометрического доломита. Несмотря на мощные отложения доломита в древних породах, его редко удается найти в современных карбонатных осадках, и происхождение низкотемпературного доломита до сих пор остается дискуссионным. Таким образом, строматолиты содового озера Петуховское являются уникальными объектами, изучение которых актуально для реконструкции процессов осадкообразования с формированием доломита, как в современных условиях, так и в древних эпиконтинентальных содовых водоемах во времена массового развития циано-бактериальных сообществ. Мы произвели подробное изучение различных слоев в образцах строматолита. Гидрохимические особенности озера благоприятны для неорганического осаждения карбонатных минералов. Однако, помимо хемогенного осаждения кальцита, мы выявили слои с микрофоссилиями водорослей, цианобактерий и коккоидных форм (вероятно, бактериальной природы) с многочисленными кристаллами Са-Мг-карбонатов, прикрепленными к экзополисахаридам (ЭПС). ЭПС фототрофного сообщества синтезируются преимущественно цианобактериями и представлены в двух видах: либо как околоклеточные структуры (чехлы, капсулы), либо как свободный полисахарид, который в виде минерализованного матрикса обнаруживается во всех слоях строматолита. Таким образом, было установлено, что в гиперсолёном содовом озере происходит биологически опосредованная органоминарализация, при которой первостепенное значение для осаждения карбонатных минералов (включая доломит) имеет развитие фототрофного микробного сообщества, выделяющего экзополисахариды.

Публикация

Samylyna O.S., Zaytseva L.V. Characterization of modern dolomite stromatolites from hypersaline Petukhovskoe Soda lake, Russia / *Lethaia*. 2019. V. 52. № 1. P. 1-13.

БИОГИДРОМЕТАЛЛУРГИЧЕСКАЯ ПЕРЕРАБОТКА ПОЛИМЕТАЛЛИЧЕСКИХ СУЛЬФИДНЫХ КОНЦЕНТРАТОВ – ПРЕИМУЩЕСТВА И ПЕРСПЕКТИВЫ

Фомченко Н.В., Муравьев М.И.

ИНМИ ФИЦ Биотехнологии РАН

Актуальность работы продиктована истощением запасов богатых сульфидных полиметаллических руд, необходимостью вовлечения в переработку сложных руд, а также отсутствием эффективной технологии переработки получаемых из них сульфидных концентратов.

Научная новизна работы. Селективность выщелачивания цинка по сравнению с медью из различных медно-цинковых и медного концентрата и подходы к управлению гальваническими взаимодействиями сульфидных минералов.

Показано, что сфалерит, как минерал с низким электродным потенциалом, как и пирротин, выступали в качестве растворяющихся анодов, а халькопирит и пирит, имеющие высокий электродный потенциал, являлись катодами. Установлено, что извлечение в раствор меди не зависело от содержания минералов в концентратах, что, вероятно, связано с тем, что этот параметр зависит только от энергии кристаллической решетки халькопирита. Извлечение цинка увеличивалось с увеличением содержания халькопирита и имело прямо пропорциональную зависимость от отношения содержания суммы минералов с высокими электродными потенциалами (пирит и халькопирит) к сумме минералов с низкими электродными потенциалами (пирротин и сфалерит). Предложена принципиальная технологическая схема двухстадийной биогидрометаллургической переработки полиметаллических сульфидных концентратов.

Перспективы. Предложена схема возможной модернизации переработки полиметаллических сульфидных концентратов, полученных из руд Уральского и Норильского регионов, с применением интенсивной биогидрометаллургии, которая позволит улучшить экологическую обстановку промышленных регионов.

Публикации

1. Fomchenko N.V., Muravyov M.I. Two-step biohydrometallurgical technology of copper-zinc concentrate processing as an opportunity to reduce negative impacts on the environment // **Journal of Environmental Management**. 2018. V. 226. P. 270–277.
2. Muravyov M.I., Fomchenko N.V. Biohydrometallurgical treatment of old flotation tailings of sulfide ores containing non-ferrous metals and gold // *Minerals Engineering*. – 2018. V. 122. P. 267–276.
3. Фомченко Н.В., Муравьев М.И., Меламуд В.С. Биорегенерация выщелачивающих растворов в двухстадийном процессе переработки медно-цинкового концентрата // **Прикладная биохимия и микробиология**. 2018. Т. 54. № 4. С. 416–420.
4. Fomchenko N.V., Muravyov M.I. Effect of sulfide mineral content in copper-zinc concentrates on the rate of leaching of non-ferrous metals by biogenic ferric iron // **Hydrometallurgy**. 2019. *Accepted*.
4. Фомченко Н.В., Муравьев М.И. Анализ качества отходов в двухстадийной биогидрометаллургической технологии переработки медно-цинкового концентрата // **Прикладная биохимия и микробиология**. 2019. Т. 55. № 1. С. 64–68.

ЦЕЛЛЮЛАЗЫ *PENICILLIUM VERRUCULOSUM*: УВЕЛИЧЕНИЕ ТЕРМОСТАБИЛЬНОСТИ И АКТИВНОСТИ С ПОМОЩЬЮ МЕТОДОВ РАЦИОНАЛЬНОГО ДИЗАЙНА

Доценко А.С.¹, Гусаков А.В.^{1,2}, Рожкова А.М.^{1,2}, Сеницын А.П.^{1,2}

¹ ИНБИ ФИЦ Биотехнологии РАН

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

Целлюлазы - это ферменты, которые катализируют гидролиз 1,4-β-гликозидных связей в структуре полисахаридов. Целлюлазы используются для гидролиза растительного сырья до технических сахаров в процессах биоконверсии сырья в биотопливо, биопластики и сырье для химической промышленности. Важными для практического применения свойствами целлюлаз являются их стабильность и активность. Целью данной работы было осуществление рационального дизайна целлюлаз *Penicillium verruculosum* для увеличения термостабильности и активности.

Рациональный дизайн для увеличения термостабильности был основан на двух подходах: 1) замена в структуре ферментов подвижных аминокислотных (а/к) остатков на остаток пролина, 2) заполнение в структуре ферментов полостей с помощью а/к замен. Данные подходы были применены для дизайна а/к замен в эндоглюканазе II *P. verruculosum* (ЭГII). Все модифицированные формы ЭГII, содержащие точечные а/к замены, обладали каталитической активностью, сопоставимой с активностью нативной формы. Важно отметить, что для практического применения фермента необходимо улучшить термостабильность и сохранить высокое значение каталитической активности. Наилучшая из осуществленных а/к замен, S308P, привела к увеличению времени полуинактивации при 80 °С в 2,4 раза и увеличению температуры плавления на 1,8 °С.

Рациональный дизайн для увеличения активности был основан на модификации N-гликозилирования белковой глобулы ферментов. Активный центр целлюлаз представляет собой высококонсервативную область этих ферментов, поэтому для увеличения активности был выбран подход, не связанный с изменениями в активном центре. Сайты N-гликозилирования были модифицированы методом сайт-направленного мутагенеза, наличие или отсутствие N-связанных гликанов в молекуле ферментов было подтверждено масс-спектрометрическим анализом. Данный подход был применен для увеличения активности целлобиогидролазы I, целлобиогидролазы II и эндоглюканазы II *P. verruculosum*. N-связанные гликаны по-разному влияли на активность ферментов в зависимости от положения в структуре. Удаление определенных гликанов позволило на 10-150% увеличить каталитическую активность ферментов в зависимости от субстрата.

Публикации

1. Dotsenko A.S., Gusakov A.V., Rozhkova A.M., Sinitsyna O.A., Shashkov I.A., Sinitsyn A.P. Enzymatic hydrolysis of cellulosic materials using synthetic mixtures of purified cellulases bioengineered at N-glycosylation sites. **3 Biotech**, 2018, 8, 396.
2. Dotsenko A.S., Gusakov A.V., Rozhkova A.M., Volkov P.V., Korotkova O.G., Sinitsyn A.P. Enzymatic hydrolysis of cellulose using mixes of mutant forms of cellulases from *Penicillium verruculosum*. **Moscow University Chemistry Bulletin**, 2018, 73, 2, 58-62.
3. Gusakov A.V., Dotsenko A.S., Rozhkova A.M., Sinitsyn A.P. N-Linked glycans are an important component of the processive machinery of cellobiohydrolases. **Biochimie**, 2017, 132, 102-108.
4. Dotsenko A.S., Rozhkova A.M., Gusakov A.V., Sinitsyn A.P. Improving the efficiency of the bioconversion of plant raw materials with mutant cellulases of *Penicillium verruculosum*. **Catalysis in Industry**, 2017, 9, 1, 71-76.

ГЕНОМИКА И ЭВОЛЮЦИЯ ФОТОТРОФНЫХ CHLOROFLEXI

Гайсин В.А.¹, Груздев Д.С.¹, Бурганская Е.И.², Брянцева И.А.², Сухачева М.В.¹, Горленко В.М.²

¹ ИНБ ФИЦ Биотехнологии РАН

² ИНМИ ФИЦ Биотехнологии РАН

Сравнительный геномный анализ фототрофных бактерий филума Chloroflexi открывает широкие перспективы для анализа эволюции этой группы. Однако данные о мезофильных представителях группы относительно ограничены, что затрудняет исследование филогении Chloroflexi и их функционального разнообразия.

Имея цель исследовать эволюцию фототрофных Chloroflexi, в первую очередь в 2017-2018 году мы работали над решением двух задач: выделение культур мезофильных фототрофных Chloroflexi и секвенирование их геномов.

В ходе работ, выполненных в 2017-2018 году, были выделены высокообогащенные культуры бактерий '*Candidatus Chloroploca asiatica*' B7-9, '*Candidatus Viridilinea mediisalina*' Kir15-3F и '*Candidatus Viridilinea halotolerans*' Chok-6. Первые две бактерии были выделены из содовых озер. Последняя бактерия была выделена из высокоминерализованного сульфидного источника. Было выполнено метагеномное секвенирование ДНК культуры этих бактерий. Благодаря высокой степени обогащения культур, мы собрали высококачественные геномы целевых бактерий из метагеномных последовательностей. Используя новые данные, мы провели анализ филогении фототрофных Chloroflexi. В частности, мы выполнили ревизию ранее предложенной системы групп специфичного профиля делеций и инсерций, на основании которого была предложена последняя таксономическая ревизия порядка *Chloroflexales*.

Работы выполнены при поддержке гранта РФФИ 16-34-00835 мол_а, 16-34-60071 мол_дк, 16-04-00830 а.

Публикации

1. Grouzdev, Denis S., Ekaterina I. Burganskaya, Maria S. Krutkina, Marina V. Sukhacheva, and Vladimir M. Gorlenko. "Genome Sequence of '*Candidatus Viridilinea halotolerans*' Chok-6, Isolated from a Saline Sulfide-Rich Spring." **Microbiol Resour Announc** 8, no. 4 (2019): e01614-18.
2. Grouzdev, Denis S., Maria S. Rysina, Irina A. Bryantseva, Vladimir M. Gorlenko, and Vasil A. Gaisin. "Draft genome sequences of '*Candidatus Chloroploca asiatica*' and '*Candidatus Viridilinea mediisalina*', candidate representatives of the Chloroflexales order: phylogenetic and taxonomic implications." **Standards in genomic sciences** 13, no. 1 (2018): 24.

ФУНДАМЕНТАЛЬНЫЕ ОСОБЕННОСТИ ПРИРОДНЫХ ОЛИГОПЕПТИДОВ

Замятнин А.А.

ИНБВ ФИЦ Биотехнологии РАН

На основании информации базы данных EROP-Moscow (Endogenous Regulatory OligoPeptides – Zamyatnin A.A. *Nucl. Acids Res.*, **34**, 261-266, 2006; <http://erop.inbi.ras.ru/>), содержащей к настоящему времени данные о структуре и функциях 19 327 природных олигопептидов, рассмотрены математические, химические, физические и биологические особенности этих биорегуляторов. Прежде всего выявлено, на основании каких математических представлений множество пептидных молекул может быть разделено на олиго- и полипептиды. В результате область олигопептидов охарактеризована интервалом $2 < N < \sim 50$, где N – число аминокислотных остатков. При подобных значениях N функционально значимыми являются не только боковые радикалы аминокислотных остатков, но и концевые химические группы олигопептида $^+H_3N-$ и $-COO^-$, расположенные на N- и C-концах соответственно. В результате детального исследования показано, что природные олигопептиды существенно отличаются от полипептидных молекул белков по целому ряду физико-химических характеристик. Очевидно, что эти характеристики могут быть ключевыми в осуществлении молекулярных механизмов олигопептидной регуляции. В частности, для ряда типов биологической активности предложена модель взаимодействия олигопептидного лиганда с рецептором, в которой важную роль играют электрический заряд и высокая конформационная подвижность многих олигопептидов.

Публикации

1. Zamyatnin A.A. Structural–functional diversity of the natural oligopeptides. **Progress in Biophysics and Molecular Biology**, vol. **133**, № 1, pp. 1–8, 2018. doi: 10.1016/j.pbiomolbio.2017.09.024
2. Замятнин А.А. Физико–химические и функциональные характеристики полной системы природных олигопептидов. **Актуальные Вопросы Биологической Физики и Химии**, Т. **3**, № 1, стр. 225–235, 2018.

БЫСТРЫЙ АНАЛИЗ ПРОФИЛЕЙ ЛПС И ЕГО УПОТРЕБЛЕНИЕ ДЛЯ ХАРАКТЕРИСТИКИ БАКТЕРИОФАГОВ *ESCHERICHIA COLI*

Куликов Е.Е.¹, Голомидова А.К.¹, Иванов П.А.¹, Прохоров Н.С.², Книрель Ю.А.³, Бабенко В.В.⁴, Летаров А.В.¹

¹ ИНМИ ФИЦ Биотехнологии РАН

² University of Texas Medical Branch at Galveston, Galveston, Texas, USA

³ Институт органической химии им. Н.Д. Зелинского РАН

⁴ Федеральный исследовательский и клинический центр физико-химической медицины ФМБА

Бактериальные клетки могут обладать большим разнообразием поверхностных структур, защищающих их от неблагоприятных внешних воздействий. Среди них обычно упоминают капсулы и экзополисахариды. Однако значительное количество штаммов, в том числе и патогенных микроорганизмов, не обладают развитыми капсулами и не всегда секретируют экзополисахариды. В случае бескапсульных форм грамотрицательных бактерий наиболее удаленной поверхностной структурой следует считать слой О-антигена, расположенный непосредственно над поверхностью внешней мембраны клетки. Этот слой образован молекулами ОПС, входящих в состав ЛПС внешнего листка внешней мембраны (ВМ) и представляющих собой одну из наиболее вариабельных структур бактерий. У большинства природных изолятов *E.coli* ОПС надежно защищает непосредственную поверхность ВМ от контакта с макромолекулярными факторами. Эффективное взаимодействие рецептор-узнающих белков бактериофагов с белками ВМ, служащими их терминальными рецепторами, как правило невозможно при отсутствии у вируса специализированного механизма преодоления ОПС. В результате О-антигены используются многими фагами в качестве первичного рецептора, связывание с которым является обратимым. Многие фаги приобрели ОПС-деградирующие ферменты. При этом у некоторых вирусов первичный контакт с ОПС является необходимым для конформационной активации вириона и распознавания вторичного (например, белкового) рецептора. У других фагов узнавание ОПС необходимо только для преодоления этого барьера и на последующие события не влияет. При отсутствии О-антигена, например, в результате мутаций, эти вирусы эффективно инфицируют клетки путем прямого узнавания своих конечных рецепторов. В нашей работе мы идентифицировали стратегии распознавания хозяина у нескольких бактериофагов, сравнивая их инфекционность для панели мутантов штамма *E. coli* 4s, дефектных по латеральным модификациям ОПС, синтезу ОПС, синтезу внешнего и внутреннего кор-олигосахарида ЛПС. Показано, что в зависимости от используемой стратегии у мутантов хозяина, отобранных на устойчивость к фагам, наблюдаются различные изменения ОПС. Для быстрого скрининга таких мутантов мы предложили оптимизированный метод электрофоретического анализа ЛПС, который позволяет получить высококачественную электрофореграмму в течение 4-5 ч. Профили ЛПС фагоустойчивых мутантов находились в полном соответствии с нашими ожиданиями с учетом выявленных стратегий инфекции. Таким образом, анализ профилей ЛПС фагоустойчивых мутантов может быть простым тестом при характеристике вновь изолированных бактериофагов, указывающим на вероятную стратегию инфекции. Это особенно актуально для потоковой характеристики фагов, выделяемых для использования в качестве агентов фаговой терапии. Работа поддержана грантом РФФИ №15-15-00134.

Публикации

1. Kulikov E.E., Golomidova A.K., Prokhorov N.S., Ivanov P.A., Letarov A.V. High-throughput LPS profiling as a tool for revealing of bacteriophage infection strategies // **Sci. Rep.** 2019. doi: 10.1038/s41598-019-39590-8
2. Knirel Y.A., Ivanov P.A., Senchenkova S.N., Naumenko O.I., Ovchinnikova O.O., Shashkov A.S., Golomidova A.K., Babenko V.V., Kulikov E.E., Letarov A.V. Structure and gene cluster of the O antigen of *Escherichia coli* F17, a candidate for a new O-serogroup // **Int. J. Biol. Macromol.** 2019. V. 124. P. 389-395.

ВОСПРОИЗВОДИМЫЕ ПИКИ НА КРИВЫХ СКОРОСТЕЙ ВЫМИРАНИЯ МЫШЕЙ

Малыгин А.Г.

ИНБИ ФИЦ Биотехнологии РАН,

Получены зависимости числа умерших мышей от их возраста (кривые смертности). Численным дифференцированием последних изучена форма кривых скоростей вымирания (дифференциальные кривые смертности) нормальных мышей и мышей с мутацией задержки роста. Показано, что эти кривые испытывают в онтогенезе воспроизводимые колебания в виде четко выраженных пиков. Оказалось, что положения пиков на горизонтальной оси не случайны, поскольку в значительной степени совпадают как в группах разнополых мутантов, так и в независимых подгруппах однополых мутантов. На дифференциальных кривых смертности мутантов в месячном возрасте обнаружен пик смертности, отсутствующий у нормальных мышей. У последних совпадения в положении большей части пиков наблюдаются в независимых подгруппах самцов и в меньшей части – в независимых подгруппах самок. Это можно объяснить сдвигами пиков вымирания самок в результате выполнения ими детородных функций. Совпадения в положении пиков на дифференциальных кривых смертности животных из независимых групп и подгрупп указывают на закономерное проявление повышенных рисков смерти в определенных возрастах. Эта закономерность может быть объяснена программированием в геноме как сроков наступления повышенных рисков смерти, так и разделяющих их периодов устойчивого развития. Показано, что пики скоростей вымирания мышей, получаемые дифференцированием кривых смертности для объединенных групп нормальных мышей, образуют кластеры. При этом четко выявлено восемь кластеров. По мере сглаживания исходных кривых смертности и последующих преобразований по Гомперцу пики и состоящие из них кластеры становятся малозаметными, а форма кривой логарифма интенсивности смертности приближается к прямой. Положение кластеров на оси продолжительности жизни в сутках вычисляли как средневзвешенную величину в виде суммы произведений положения пиков на горизонтальной оси и их высоты по вертикали, деленной на сумму высот пиков в пределах кластера. Чтобы доказать, что кластеры, подобно пикам, не случайны, была продемонстрирована независимость положения кластеров на оси возраста от степени сглаживания кривой смертности, а также их принадлежности к разным подгруппам мышей. Занимая одинаковое положение на горизонтальной оси, сходные пики могут существенно отличаться высотой по вертикали. Если будет доказано, что обнаруженный феномен распространяется и на другие виды, включая людей, то открывается возможность продлевать жизнь особей методами избирательного воздействия на организм в возрастах, предшествующих ожидаемому появлению пиков или их кластеров.

Публикации

1. Malygin, A.G. (2018) Reproducible Peak Clusters on Differential Mouse Mortality Curves and Their Relation to the Gompertz Model, **Biochemistry (Moscow)**, **83**, 836–845.
2. Malygin, A.G. (2017) New data on programmed risks of death in normal mice and mutants with growth delay, **Biochemistry (Moscow)**, **82**, 834–843.

ФЛУОРЕСЦЕНТНЫЙ АНАЛИЗ АДАПТАЦИИ ПИГМЕНТНОГО АППАРАТА МИКРОВОДОРОСЛИ *HAEMATOCOCCUS LACUSTRIS* В ПРОЦЕССЕ СТРЕСС-ИНДУЦИРОВАННОГО ВТОРИЧНОГО КАРОТИНОГЕНЕЗА

Неверов К.В.¹, Чеканов К.А.², Счастливая Е.Р.², Лью С.³, Буссиба С.³, Зарка А.³, Соловченко А.Е.²

1 – ИИБИ ФИЦ Биотехнологии РАН

2 – МГУ имени М.В.Ломоносова, биологический факультет

3- Университет Бен-Гурион, Израиль

Целью данной работы явилось исследование механизмов адаптации к световому стрессу фотосинтетического аппарата (ФСА) зеленой микроводоросли *Haematococcus lacustris* (Chlorophyceae) - природного продуцента кетокаротиноида астаксантина, обладающего выраженными антиоксидантными свойствами.

Накопление астаксантина происходит в красных апланоспорах (гематоцистах), образующихся из вегетативных клеток в условиях светового стресса и азотного голодания. В процессе превращения зеленых клеток в гематоцисты происходит редукция ФСА и изменение эффективности трансформации энергии в фотосистемах 1 и 2 (ФС 1, ФС 2).

Для исследования механизмов световой адаптации *H. lacustris* при стресс-индуцированном переходе от зеленых клеток к гематоцистам мы использовали методы измерения флуоресценции хлорофилла (Хл) при комнатной и низкой температурах, а также кривых индукции флуоресценции Хл. Эти данные были использованы для расчета эффективности первичных фотохимических процессов в ФС 1 и ФС 2 и для оценки нефотохимического тушения флуоресценции Хл (НФТ), являющегося важным адаптивным параметром фотосинтетического аппарата (ФСА).

В результате было показано, что фотопротекторные механизмы у *H. lacustris* при переходе от зеленых клеток к гематоцистам включают несколько этапов. На первом этапе в клетках повышается фотосинтетическая активность и НФТ. Высокий уровень НФТ обеспечивается быстрой ($t < 1$ с) генерацией транстилакоидного ДрН в ответ на действие света высокой интенсивности. Более длительный (2-5 мин) фотопротекторный механизм включает, как предполагалось, фотоиндуцированную редукцию антенны ФС 2 в пользу ФС 1 (так называемые "переходы состояний", англ. "state transitions").

В связи с этим, одной из главных задач работы было показать существование этого механизма у зеленых клеток и гематоцист *H. lacustris*. Методом регистрации низкотемпературной (77К) флуоресценции Хл в клетках микроводоросли, адаптированных к сильному свету (2500 мкЕ/м²с, 5 мин) было продемонстрировано уменьшение амплитуды максимумов ФС 2 при 685 и 695 нм по отношению к максимуму ФС 1 при 720 нм. Это может быть объяснено диссоциацией антенного комплекса ЛНС 2 от ФС 2 и миграцией его к ФС 1. Известно, что миграцию комплекса ЛНС 2 предвращает его фосфорилирование специфической киназой.

Методом транскриптомного анализа нами была продемонстрирована фотоиндуцированная экспрессия гена протеинкиназы Stt7, ответственной за фосфорилирование ЛНС 2 у микроводорослей, что подтверждает наличие механизма «перехода состояний» у *H. lacustris*.

При этом было показано, что в зрелых гематоцистах, имеющих редуцированный ФСА, соотношение полос флуоресценции ФС 1 и ФС 2 практически не менялось, что свидетельствует об отсутствии участия «перехода состояний» в фотопротекторных механизмах у гематоцист. Измерение спектров поглощения и спектров возбуждения флуоресценции при комнатной температуре показало, что фотоустойчивость ФСА гематоцист определяется в основном оптическим экранированием ФСА вторичным каротиноидом астаксантином, что, очевидно, и обеспечивает наблюдаемую высокую эффективность фотосинтеза в этом типе клеток.

Способность микроводоросли *H. lacustris* соединять «классические» фотопротекторные механизмы с «каротиноидным экраном» и общей перестройкой метаболизма делает этот организм перспективной моделью для изучения фотоадаптационных механизмов у фотосинтетиков.

Публикации

1. А.Е. Соловченко, К.В. Неверов. Carotenogenic response in photosynthetic organisms: a colorful story. **Photosynth. Research**, 2017, 133 (1-3): 31-47. DOI: 10.1007/s11120-017-0358-y
2. К.А. Чеканов, Е.Р. Счастливая, К. В. Неверов, С. Лью, С. Буссиба, А. Зарка, А.Е. Соловченко. Non-photochemical quenching in the cells of the carotenogenic chlorophyte *Haematococcus lacustris* under favorable condition and under stress. **BBA: General Subjects**, 2019 (accepted).

ДИСФУНКЦИЯ МИТОХОНДРИЙ, СВЯЗАННЫЕ С НЕЙ РЕТРОГРАДНАЯ СИГНАЛИЗАЦИЯ И МИТОФАГИЯ, МИТОХОНДРИАЛЬНО-НАПРАВЛЕННЫЕ КАТИОНЫ

Звягильская Р.А.¹, Рогов А.Г.¹, Голева Т.Н.¹, Мамаев Д.В.¹, Овченкова А.П.¹, Тренделева Т.А.¹, Аливердиева Д.А.², Коршунова Г.А.³, Киреев И.И.³

¹ ИНБИ ФИЦ Биотехнологии РАН

² Прикаспийский институт биологических ресурсов ДНЦ РАН, Махачкала

³ МГУ им. М.В. Ломоносова, НИИ Физико-Химической Биологии им. А.Н. Белозерского

Суммированы сведения о митохондриальной ретроградной сигнализации, представляющей собой сигнальный путь, связывающий митохондрии и ядро (из митохондрий в ядро). Обзор базируется на анализе имеющихся сведений о ретроградной сигнализации у дрожжей, которая рассматривается как стрессовый или гомеостатический механизм ответа на изменение различных метаболических и биосинтетических процессов при дисфункции митохондрий.

Даны представления об аутофагии и митофагии, об Atg-белках и их комплексах, задействованных в этих процессах. Проанализированы условия, вызывающие митофагию в дрожжах, прослежены молекулярные механизмы, лежащие в основе митофагии дрожжей, ее регуляции.

Суммированы сведения о Болезни Альцгеймера (БА), рассмотрены основные факторы, индуцирующие и сопровождающие БА. Подчеркнута перспективность использования дрожжевых моделей для лучшего понимания базовых процессов, лежащих в основе патогенеза. Высказано предположение о том, что поиск агентов, предотвращающих фрагментацию митохондрий, может быть новой стратегией в предотвращении БА.

Методами флуоресцентной микроскопии, включая Time-lapse и 3-D-реконструкцию, показана фрагментация митохондрий дрожжей *Y. lipolytica* и *D. magnusii* под действием окислительного стресса, ингибиторов дыхания и разобщителей окислительного фосфорилирования. Предложено использование этих дрожжей в качестве перспективных моделей для изучения взаимосвязи между динамикой митохондрий и их дисфункцией, а также поиска агентов, предотвращающих фрагментацию митохондрий.

Проведено сравнительное исследование действия четырех вновь синтезированных митохондриально-направленных соединений C₄R1, SkQ1, SkQT1 и SkQTh на митохондрии печени крысы и клетки дрожжей. Митохондриально-направленный катионный разобщитель C₄R1 оказался наиболее активным из всех исследованных разобщителей, что сулило перспективы его использования в качестве протектора при патологиях, связанных с окислительным стрессом. Однако наши данные показали, что C₄R1 является мощным ингибитором АТФ-синтазы, поэтому необходима осторожность при его использовании в медицинских целях. Из трех митохондриально-направленных антиоксидантов SkQ1, SkQT1 и SkQTh, SkQTh оказывал наименьшее негативное воздействие на энергетические параметры митохондрий и в тоже время был более эффективен в подавлении окислительного стресса и фрагментации митохондрий в клетках дрожжей, что позволяет рассматривать его в качестве наиболее перспективного антиоксиданта в борьбе с патологиями, вызванными окислительным стрессом.

Публикации

1. Goleva T., Rogov A., Zvyagilskaya R. Alzheimer's Disease: Molecular Hallmarks and Yeast Models (review) // **J. Alzheimer's Disease & Parkinsonism**. 2017. 7:394-401.
2. Тренделева Т.А., Звягильская Р.А. Ретроградная сигнализация дрожжей как механизм приспособления к неблагоприятным факторам (обзор) // **Биохимия**. 2018. 83:153-154.
3. Рогов А.Г., Голева Т.Н., Овченкова А.П., Аливердиева Д.А., Звягильская Р.А. Новые данные о действии SkQ1 и SkQT1 на митохондрии печени крысы и клетки дрожжей // **Биохимия**. 2018. 83(5):724-734.
4. Rogov A.G., Ovchenkova A.P., Goleva T.N., Kireev I.I., Zvyagilskaya R.A. New yeast models for studying mitochondrial morphology as affected by oxidative stress and other factors // **Analytical Biochemistry: Methods in Biological Sciences**. 2018. 552:24-29.
5. Мамаев Д.В., Звягильская Р.А. Митофагия у дрожжей (обзор) // **Успехи биологической химии**. 2019. 59:455–472.
6. Goleva T.N., Rogov A.G., Korshunova G.A., Mamaev D.V., Aliverdieva D.A., Zvyagilskaya R.A. SkQThy, the novel promising mitochondria-targeted antioxidant // **Mitochondrion**. (submitted).

БАКТЕРИИ И БАКТЕРИОФАГИ ХОЛОДОВЫХ ЭКОСИСТЕМ АРКТИКИ И АНТАРКТИКИ

Мулюкин А.Л., Филиппова С.Н., Сургучева Н.А., Сорокин В.В., Складнев Д.А., Демкина Е.В., Летарова М.А., Куликов Е.Е., Эль-Регистан Г.И., Гальченко В.Ф.

ИНМИ ФИЦ Биотехнологии РАН

Проведены комплексные микробиологические исследования образцов низкотемпературных природных сред: водной толщи подледного озера Унтерзее, древних подземных льдов, вечномёрзлых отложений и грунтов, отобранных в ходе экспедиций в различные регионы Арктики и Антарктики. Установлена высокая численность интактных клеток микроорганизмов (10^6 - 10^8 кл/г). Для более полного выявления колониеобразующих клеток бактерий применены специальные приемы. В результате из многолетнемерзлых пород выделены изоляты бактерий рр. *Bacillus* и *Gordonia*, обладающие антимикробной активностью в отношении лекарственно-устойчивых тестерных штаммов. Условия мерзлых пород неблагоприятны для активного роста и размножения микроорганизмов, поэтому актуален вопрос о способах длительного сохранения клеток и адаптационных возможностях бактерий различных таксонов. Особенности структуры бактериальных сообществ отражают специфику и состав древних отложений. Так, для древнего мерзлого (3 млн. лет) аллювия Мамонтовой горы (Якутия) установлена особая структура микробного сообщества с преобладанием представителей филума *Bacteroidetes*, что связано с доступностью источников углерода. Получены приоритетные данные о широком распространении бактериофагов в разных низкотемпературных экосистемах (водных слоях подледного антарктического озера Унтерзее, подземных реликтовых льдах различного возраста и генезиса), численность которых коррелировала с численностью бактерий. Обнаружены и выделены из клеток изолятов фагочувствительных бактерий нитчатые (умеренные) фаги, которые участвуют в регуляции численности и метаболизма бактерий и способствуют их выживанию в экстремальных условиях. Исследования микробиоты длительно мерзлых экосистем становятся актуальными в связи с угрозой их оттаивания и с быстрым распространением микроорганизмов и фагов с потоками талой воды, что нами было показано в экспедиционных и лабораторных исследованиях.

Публикации

1. Сургучева Н.А., Филиппова С.Н., Куликов Е.Е., Брушков А.В., Рогов В.В. Фаговые частицы в подземных льдах Арктики. **Микробиология**. 2019. Т. 88 – в печати.
2. Ефименко Т.А., Ефременкова О.В., Демкина Е.В., Петрова М.А., Сумарукова И.Г., Васильева Б.Ф., Эль-Регистан Г.И. Бактерии, выделенные из вечной мерзлоты Антарктики – эффективные продуценты антибиотиков. **Микробиология**. 2018. Т. 87. № 5. С. 573-580.
3. Brouchkov A., Kabilov M., Filippova S., Baturina O., Rogov V., Galchenko V., Mulyukin A., Fursova O., Pogorelko G. Bacterial community in ancient permafrost alluvium at the Mammoth Mountain (Eastern Siberia). **GENE**. 2017. Т. 636. С. 48-53.
4. Складнев Д.А., Мулюкин А.Л., Филиппова С.Н., Куликов Е.Е., Летарова М.А., Юзбашева Е.А., Карнышева Э.А., Брушков А.В., Гальченко В.Ф. Моделирование процесса распространения клеток микроорганизмов и фаговых частиц из мест вытаивания мерзлотных слоев. **Микробиология**. 2016. Т. 85. № 5. С. 580-587.
5. Филиппова С.Н., Сургучева Н.А., Сорокин В.В., Акимов В.Н., Карнышева Э.А., Брушков А.В., Андерсен Д., Гальченко В.Ф. Бактериофаги низкотемпературных систем Арктики и Антарктики. **Микробиология**. 2016. Т. 85. № 3. С. 337-346.

СИНТЕЗ ПОЛИФЕНОЛЬНЫХ КОНЬЮГАТОВ ХИТОЗАНА, ИССЛЕДОВАНИЕ СВОЙСТВ МОДИФИЦИРОВАННОГО БИОПОЛИМЕРА И ПОЛУЧЕНИЕ ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ ПЛЁНОК НА ЕГО ОСНОВЕ

Луныков А.П., Шагдарова Б.Ц., Жуйкова Ю.В., Ильина А.В., Лопатин С.А., Варламов В.П.

ИНБ ФИЦ Биотехнологии РАН

Биополимер хитозан является перспективной основой для химической модификации, поскольку обладает реакционноспособными функциональными группами и собственной биологической активностью. Полифенолы – широкий класс природных органических соединений, характеризующиеся широким спектром биологической активности. Одним из способов стабилизации природных антиоксидантов является их связывание с макромолекулами полимеров. Модифицированные полифенолами полисахариды могут быть использованы для получения плёнок, имеющих повышенную биологическую активность.

Методом химической деполимеризации азотной кислотой высокомолекулярного хитозана (X830) с молекулярной массой (ММ) 830 кДа, степенью дезацетилирования (СД) 78% был получен низкомолекулярный хитозан (X28) со следующими характеристиками: ММ 28 кДа, СД 93%. Синтезированы конъюгаты галловой кислоты (ГК) с полимерными макромолекулами. Структура соединений была подтверждена спектральными методами ¹Н ЯМР, ИК, УФ. Содержание ГК составило 106 и 119 мг/г полимера для X830ГК и X28ГК соответственно. Был проведён анализ антибактериальной активности образцов на *S. epidermidis* и *E. coli*. Растворы конъюгатов с ГК проявляли большую антимикробную активность в сравнении с хитозаном. Морфологические изменения бактериальных клеток были изучены с использованием АСМ. В дальнейшем на основе X830 и X28 методом литья из растворов были получены полисахаридные плёнки. Определены физико-химические свойства образцов плёнок: толщина, прозрачность, влагосодержание, растворимость. Антиоксидантные свойства охарактеризованы по ингибирующей активности плёнок к модельным ДФПГ радикалам. Введение антиоксиданта значительно увеличивало ингибирующую активность. Ингибирующая активность X28ГК была выше, чем у X830ГК. Методом диффузии в агар были изучены антибактериальные свойства пленок на основе хитозанов с ГК. Клетки *S. epidermidis* оказались ультра чувствительными по отношению к пленкам X28ГК, X830ГК и чувствительными к пленкам X28, X830. Пленки из X830, имеющие в своем составе ГК, ингибировали рост стафилококков лучше. Клетки *E. coli* были чувствительны только к пленкам, содержащим ГК.

Можно сделать вывод, что полифенольные конъюгаты хитозана являются новой категорией биоматериалов, обладающих потенциалом для различных применений в мультидисциплинарных областях. Плёнки на основе модифицированного хитозана, могут представлять перспективную основу при создании биоразлагаемой функциональной упаковки.

Публикации

1. Луныков А.П., Ильина А.В., Варламов В.П. Антиоксидантные, антибактериальные и фунгицидные свойства пленок на основе хитозана (обзор). // **Прикладная биохимия и микробиология**. 2018 Т. 54. № 5. С. 444-454 DOI: 10.1134/S0555109918050124
2. Луныков А.П., Шагдарова Б.Ц., Жуйкова Ю.В., Ильина А.В., Варламов В.П. Свойства функциональных плёнок на основе производного хитозана с галловой кислотой. // **Прикладная биохимия и микробиология**. 2018 Т. 54. № 5. С. 483-490 DOI: 10.1134/S0555109918050136

НОВЫЙ ПОДХОД К ИЗУЧЕНИЮ МЕХАНИЗМОВ АГРЕГАЦИИ БЕЛКОВ

Борзова В.А.¹, Еронина Т.Б.¹, Михайлова В.В.¹, Чеботарева Н.А.¹, Маркосян К.А.¹, Кара Д.А.¹, Клейменов С.Ю.^{1,2}, Шубин В.В.¹, Юдин И.К.³, Курганов Б.И.¹

¹ ИНБИ ФИЦ Биотехнологии РАН

² Институт биологии развития им. Н.А. Кольцова» РАН

³ РГУ нефти и газа им. И.М. Губкина

В 2017-2018 гг. в лаборатории структурной биохимии белка ФИЦ Биотехнологии РАН были разработаны новые подходы к анализу кинетики агрегации белков. Показана значимость установления кинетического режима и порядка агрегации по белку (n) для интерпретации данных. При $n = 1$ скорость-лимитирующей стадией общего процесса агрегации является стадия денатурации белка (примеры — дитиотреитол-индуцированная агрегация бычьего сывороточного альбумина (БСА) при 45 град. С) или стадия структурной перестройки денатурированных молекул (тепловая агрегация УФ-облученной гликогенфосфорилазы b (Ph b) при 37 град. С). При $n = 2$ скорость лимитируется стадией агрегации развернутых молекул белка (тепловая агрегация БСА при 70 град. С и апо-Ph b при 37 град. С, агрегация УФ-облученной Ph b при 10 град. С в условиях краудинга). Наряду с непрямими методами регистрации кинетических кривых агрегации (динамическое светорассеяние) использованы методы прямого определения доли агрегированного белка (гель-проникающая хроматография, фракционирование в поле асимметричного потока). Для анализа механизма агрегации предложен график соотношения между гидродинамическим радиусом агрегатов и долей агрегированного белка. Показано, что химические шапероны (полиамины, аргинин и его производные), повышение ионной силы, или присутствие краудинг-агента триметиламиноксида, вызывают слипание уже сформировавшихся агрегатов.

Работа поддержана грантами РФФИ (16-14-10055), РФФИ (16-34-00997, 16-04-00560), Программой Президиума РАН «Молекулярная и клеточная биология».

Публикации

1. Borzova V.A., Markossian K.A., Kleymenov S.Yu., Kurganov B.I. (2017) *Sci. Rep.*, 7, 3984.
2. Kara D.A., Borzova V.A., Markossian K.A., Kleymenov S.Yu., Kurganov B.I. (2017) *Int. J. Biol. Macromol.*, 104, 889-899.
3. Mikhaylova V.V., Eronina T.B., Chebotareva N.A., Kleymenov S.Yu., Shubin, Kurganov B.I. (2017) *PLoS One*, 12, e0189125.
4. Eronina T.B., Mikhaylova V.V., Chebotareva N.A., Borzova V.A., Yudin I.K., Kurganov B.I. (2018) *Biophys. Chem.*, 232, 12-21.
5. Kurganov B.I. (2018) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 495, 1182-1186.
6. Eronina T.B., Mikhaylova V.V., Chebotareva N.A., Shubin V.V., Kurganov B.I. (2018) *Int. J. Biol. Macromol.*, 118, 1193-1202.

МИКРОБНОЕ СООБЩЕСТВО И *IN SITU* БИОРЕМЕДИАЦИЯ ПОДЗЕМНЫХ ВОД ОТ НИТРАТОВ В ЗОНЕ ПОВЕРХНОСТНОГО ХРАНИЛИЩА РАДИОАКТИВНЫХ ОТХОДОВ И В ГЛУБИННЫХ ХРАНИЛИЩАХ ЖИДКИХ РАО

Бабич Т.Л.¹, Сафонов А.В.², Соколова Д.Ш.¹, Турова Т.П.¹, Груздев Д.С.¹, Меркель А.Ю.¹, Полтараус А.Б.³, Захарова Е.В.², Зубков А.А.⁴, Назина Т.Н.¹

¹ ФИЦ Биотехнологии РАН

² Институт физической химии и электрохимии им. А.Н. Фрумкина РАН

³ Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН

⁴ АО “Сибирский химический комбинат”, Северск

Целью работы было изучение физико-химических и радиохимических условий и состава микробного сообщества подземных вод в районе законсервированного поверхностного хранилища радиоактивных отходов (РАО) и выяснение возможности *in situ* биоремедиации подземных вод от нитрат-ионов. Определены физико-химические и радиохимические параметры, численность культивируемых микроорганизмов и состав микробного сообщества в пробах подземных вод. Подземные воды вблизи хранилища на глубине 10 м характеризовались повышенным содержанием нитрат-, сульфат- и гидрокарбонат-ионов и стронция. Методом высокопроизводительного секвенирования V3-V4 региона гена 16S рРНК показано присутствие в составе подземного сообщества бактерий филумов *Proteobacteria* (родов *Alicyclophilus*, *Thermomonas*, *Herminiimonas*, *Pseudomonas*, *Brevundimonas* и некультивируемых *Oxalobacteraceae*), *Firmicutes* (родов *Bacillus* и *Paenibacillus*) и *Actinobacteria* (*Candidatus* *Planktophila*). В подземных водах обитали культивируемые аэробные органотрофные и нитрифицирующие бактерии, а также анаэробные бродильные, железоредуцирующие и денитрифицирующие бактерии. Из подземных вод выделено в чистую культуру 33 штамма бактерий, относящихся к 15 родам. Представители родов *Pseudomonas*, *Rhizobium*, *Cupriavidus*, *Shewanella*, *Ensifer* и *Thermomonas* восстанавливали нитраты до нитритов и/или молекулярного азота. У бактерий родов *Pseudomonas*, *Rhizobium* и *Ensifer* с помощью специфичных праймеров детектированы гены *nirS* или *nirK*, кодирующие нитритредуктазы. Восстановление нитратов чистыми культурами приводило к снижению Eh среды. Среди проверенных органических субстратов ацетат натрия и молочная сыворотка более всего стимулировали процесс денитрификации микрочесмами из подземных вод. Закачка этих субстратов в подземный горизонт (single-well push-pull test) способствовала временной локальной очистке подземных вод от нитрат-ионов в районе законсервированного хранилища радиоактивных отходов и подтвердила возможность успешного использования предлагаемого метода *in situ* биоремедиации. Показано, что денитрифицирующие бактерии способны также осуществлять восстановление нитрат-ионов в условиях глубинных хранилищ жидких РАО.

Публикации

1. Safonov A.V., Babich T.L., Sokolova D.S., Grouzdev D.S., Tourova T.P., Poltaraus A.B., Zakharova E.V., Merkel A.Y., Novikov A.P., Nazina T.N. Microbial community and *in situ* bioremediation of groundwater by nitrate removal in the zone of a radioactive waste surface repository. **Front. Microbiol.** 2018. 9:1985. doi: 10.3389/fmicb.2018.01985. Impact Factor = 4.019. **Q1**
2. Grouzdev DS, Safonov AV, Babich TL, Tourova TP, Krutkina MS, Nazina TN. 2018. Draft genome sequence of a dissimilatory U(VI)-reducing bacterium, *Shewanella xiamenensis* strain DCB2-1, isolated from nitrate- and radionuclide-contaminated groundwater in Russia. **Genome Announc.** 6:e00555-18. <https://doi.org/10.1128/genomeA.00555-18>.
3. Grouzdev DS, Babich TL, Tourova TP, Sokolova DS, Abdullin RR, Poltaraus AB, Schevchenko MA, Toshchakov SV, Nazina TN. 2018. Draft genome sequence of *Roseomonas aestuarii* strain JR1/69-1-13 isolated from nitrate- and radionuclide-contaminated groundwater in Russia. **Genome Announc.** 6:e00583-18. <https://doi.org/10.1128/genomeA.00583-18>.
4. Grouzdev DS, Tourova TP, Babich TL, Shevchenko MA, Sokolova DS, Abdullin RR, Poltaraus AB, Toshchakov SV, Nazina TN. Whole-genome sequence data and analysis of type strains ‘*Pusillimonas nitritireducens*’ and ‘*Pusillimonas subterraneus*’ isolated from nitrate- and radionuclide-contaminated groundwater in Russia. **Data in Brief.** 2018. 21, pp. 882–887. <https://doi.org/10.1016/j.dib.2018.10.060> **Q1**
5. Сафонов А.В., Захарова Е.В., Назина Т.Н., Понизов А.В., Зубков А.А. Российский опыт микробиологических исследований подземных вод в зоне глубинного захоронения жидких радиоактивных отходов. **Радиоактивные отходы.** 2018. № 3(4). С. 39–49.

АДАПТИВНЫЕ АЛЬГОБИОТЕХНОЛОГИИ ДЛЯ ПРОИЗВОДСТВЕННЫХ СОРТОВ ЗЕРНОБОБОВЫХ КУЛЬТУР

Зотов В.С., Хапчаева С.А., Пыркин В.О.

ИНБИ ФИЦ Биотехнологии РАН

В период 2016-2018 гг коллектив группы альгобиотехнологии проводил исследования и разработки в области создания полифункциональных биопрепаратов для растениеводства, стабилизированных фототрофными микроорганизмами с целью экологизации современного растениеводства. Решалась задача повышения уровня использования адаптивных биотехнологий для производственных сортов зернобобовых культур и раскрытия природного потенциала современных сортов растений, почвы и интродуцированных (с биопрепаратами) микроорганизмов. За это время было изучено биоразнообразие перспективных для нужд сельского хозяйства симбиотических почвенных бактерий (более 200) – симбионтов нута, сои, фасоли, гороха и бобов. Проведены идентификация и дифференциация клубеньковых бактерий до уровня группы штаммов и составлены их подробные генетические портреты с применением следующих маркеров: 16S рРНК, фрагменты генов *rhoB* и *gyrB*, межгенных регионов ITS (16-23S рРНК) и *hin*-регион, симбиотических генов *nodD*, *nodC*, *nifH*, *nifD*-К.

В результате проведённых исследований были выявлены генетические маркеры специфичности бобово-ризобияльного симбиоза, и предложен подход для конструирования «персонализированных» формул биопрепаратов под конкретные сорта бобовых растений для достижения максимального симбиотического потенциала и раскрытия природного потенциала сорта. Для обеспечения полифункционального действия (азотфиксация, фосфатмобилизация, стимуляция роста, защита от патогенов, поддержание плодородия почв) в состав биопрепарата вводились почвенные цианобактерии рода *Nostoc*.

Для эффективного культивирования фототрофных микроорганизмов были разработаны и сконструированы автоматизированные культивационные модули объёмом от 1 до 100 л. Разработан опытно-промышленный регламент на получение полифункционального биопрепарата цианобактериальный консорциум (ЦБК). Нарботана и испытана опытная партия экспериментальных форм биопрепаратов для производственных сортов зернобобовых культур, которые прошли успешную апробацию в условиях полевого опыта Московской и Самарской областей.

Заключено соглашение о долгосрочном научно-производственном сотрудничестве с ООО «2Д-Фарма» в области агrobiотехнологий и перспективных для коммерческого внедрения научных разработок. На завершающей стадии находится организация и запуск пилотного производство полифункциональных биопрепаратов для зернобобовых культур.

В декабре 2018 настоящий проект был представлен в рамках Конкурса инновационных решений «УРАЛХИМ – ЭЛЕМЕНТ РОСТА», по итогам которого АО «ОХК «УРАЛХИМ» выразило заинтересованность и готовность инвестировать в проведение дальнейших НИОКР по направлению «Консорциумы микроорганизмов для восстановления и поддержания плодородия почв».

Публикации

1. Хапчаева С.А., Дидович С.В., Топунов А.Ф., Мулюкин А.Л., Зотов В.С. Специфичность симбиотических взаимодействий бактерий рода *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* с растениями трибы *Viciae*. **Экологическая генетика**. 2018, Т.16, №4, стр. 51-60.
2. Хапчаева С.А., Зотов В.С., Дидович С.В., Топунов А.Ф. Маркирование микросимбионтов *Phaseolus vulgaris* L. и способы повышения эффективности бобово-ризобияльного симбиоза. **Таврический вестник аграрной науки**. No 4(16), 2018, стр. 176-191.
3. Пыркин В.О., Хапчаева С.А., Дидович С.В., Зотов В.С. Влияние комплексных биопрепаратов на почвенный микробиом. **Таврический вестник аграрной науки** № 2 (14). 2018, стр. 35-45.

ИЗМЕНЕНИЕ УРОВНЯ VHL ПРИ ОНКОТРАНСФОРМАЦИИ: ОБРАТИМОСТЬ И ПОСЛЕДСТВИЯ

Артемов А.В., Мазур А.М., Женило С.В., Каплун Д.С., Старшин А., Жигалова Н.А., Прохорчук Е.Б.

ФИЦ Биотехнологии РАН

Онкологические заболевания – одна из наиболее распространённых причин смерти в развитых странах. Несмотря на то, что рак почки составляет около 4% всех злокачественных опухолей у взрослых, данное заболевание характеризуется крайне высоким уровнем смертности ввиду агрессивного метастатического процесса. В 70-90% случаев светлоклеточного рака почки ассоциировано с инактивацией онкосупрессора VHL. В норме фактор VHL, связываясь с гидроксированными HIF белками, участвует в их убиквитинировании и последующей деградации. При гипоксии уменьшение концентрации кислорода приводит к снижению активности гидроксилаз, негидроксированные HIF белки не могут взаимодействовать с VHL, стабилизируются, делокализуются в ядро и активируют гены-мишени. Аналогичная картина стабилизации HIF наблюдается при отсутствии VHL. VHL инактивируется в ряде опухолей с помощью различных механизмов: метилирование регуляторных областей, мутации в нормальном аллеле гена. Инактивация VHL может происходить как в нормальных клетках и способствовать онкотрансформации, так и в раковых клетках. Исследование механизмов, вовлеченных в прогрессию раковых заболеваний, позволит разработать новые клеточные и молекулярные подходы для ингибирования данного процесса.

Цель нашего исследования заключается в определении механизмов, вовлеченных в прогрессию рака при инактивации гена VHL, происходящей в раковых клетках. Нами была получена модельная система Caki1-mutVHL на основе клеточной линии Caki-1 (светлоклеточный рак почки), в которой все аллели гена vhl были отредактированы с помощью CRISPR/Cas9 системы так, что ген vhl инактивировался и происходила стабилизация HIF1alpha. Инактивация гена VHL в раковых клетках приводила к гиперметилированию генома, в том числе регуляторных областей целого ряда транскрипционных регуляторов. Также мы наблюдали активацию генов-мишеней HIF белков. Для того чтобы, изучить влияние мутации VHL и восстановление нормального VHL на рост и формирование первичной опухоли, были получены клеточные линии с восстановленным VHL. Голым мышам прививали клетки Caki1, с мутантным VHL (Caki1-mutVHL) и восстановленным VHL (Caki1-mutVHL+HAVHL). Время формирования опухолей составило 21 день. По истечению этого времени проводили анализ сформировавшейся первичной опухоли. Инактивация VHL привела к значительному увеличению объема опухоли, в то время как клетки с восстановленным VHL, продемонстрировали снижение объема первичной опухоли по сравнению с мутантными клетками, доходя до размеров контрольных клеток Caki1. Анализ транскриптомы клеток показал, что инактивация VHL приводит к активации генов, вовлеченных в различные каскадные и сигнальные пути, в том числе те, которые активируются при гипоксии. В Caki1-mutVHL+HAVHL клетках наблюдается восстановление экспрессии генов. Однако, отметим, что при инактивации VHL изменения в экспрессии целого ряда генов, кодирующих транскрипционные факторы, вовлеченных в онкотрансформацию (muc, lmo2, p21, tlx3), оказались необратимыми. Таким образом, инактивация VHL в раковых клетках почки способствует сильному росту первичной опухоли. При этом восстановление нормального уровня VHL снижает размер опухоли, но транскриптома клеток полностью не восстанавливается и в первую очередь остается высокой экспрессия целого ряда генов, вовлеченных в прогрессию и метастазирование рака

Работа поддержана РФФ 14-14-01202

Публикации

- Жигалова Н.А., Женило С.В., Артемов А.В., Прохорчук Е.Б. Моделирование гипоксии в клетках рака почки при помощи CRISPR/CAS9-редактирования. **Молекулярная биология** 2017. Т. 51. № 5. С. 728-732.
- Artemov A., Zhigalova N, Zhenilo S, Mazur A, Prokhortchouk E. VHL inactivation without hypoxia is sufficient to achieve genome hypermethylation **Scientific Reports** volume 8, Article number: 10667 (2018)

ИССЛЕДОВАНИЕ МОЛЕКУЛЯРНОГО МЕХАНИЗМА КЛЕТОЧНОГО СИГНАЛЬНОГО ПУТИ, ЗАДЕЙСТВОВАННОГО В ОТВЕТЕ РАКОВЫХ КЛЕТОК НА ОКИСЛИТЕЛЬНЫЙ СТРЕСС, ИНДУЦИРУЕМЫЙ ПРОТИВООПУХОЛЕВОЙ ТЕРАПИЕЙ

Вейко В.П.¹, Костюк С.В.², Огорокова Н.А.¹, Мордкович Н.Н.¹, Малиновская Е.М.², Ершова Е.С.², Конькова М.С.², Кожина Е.А.²

¹ ИНБИ ФИЦ Биотехнологии РАН

² Медико-генетический научный центр РАН

В раковых клетках развивается устойчивость к терапии, направленной на уничтожение опухоли. Ранее было показано, что внеклеточная ДНК, образующаяся при гибели раковых клеток, может значительно повышать жизнеспособность оставшихся раковых клеток. Авторами предложен и подтвержден экспериментально новый механизм, который объясняет наблюдаемое повышение жизнеспособности раковых клеток в присутствии фрагментов внеклеточной ДНК (вкДНК). Исследование было проведено на линии клеток опухоли молочной железы MCF-7. В качестве модельных вкДНК были сконструированы плазмиды, которые содержат легко окисляемые dGn мотивы ДНК и репортерный ген белка EGFP. С использованием специально сконструированных плазмид проведен «нокдаун» (siRNA) и «нокаут» (CRISPR/Cas9) генов *AIM2* и *TLR9* в клетках MCF-7, свойства которых были исследованы. Показано, что адаптивный ответ, индуцируемый легко окисляемыми фрагментами внеклеточной ДНК, включает активирование репарационных систем, блокировку апоптоза и активацию транскрипционного фактора NF-κB. Все три фактора приводят к увеличению резистентности раковых клеток к неблагоприятным внешним факторам. Результатом развития адаптивного ответа в присутствии легко окисляемых фрагментов ДНК является: снижение числа клеток с поврежденной ДНК, усиление их пролиферации, снижение уровня апоптоза. Описан новый механизм развития адаптивного ответа в раковых клетках в присутствии легко окисляемых или окисленных фрагментов внеклеточной ДНК, который объясняет возникновение резистентности раковых клеток к терапии.

Работа выполнена при поддержке Гранта РФФИ №16-04-00576 А.

Публикации

1. S.V. Kostyuk, N. N. Mordkovich, N.A. Okorokova, V. P. Veiko, E. M. Malinovskaya, E. S. Ershova, M.S. Konkova, E. A. Savinova, M. A. Borzikova, T.A. Muzaffarova, L. N. Porokhovnik, N. N. Veiko, S. I. Kutsev Increased Transfection of the Easily Oxidizable GC-Rich DNA Fragments into the MCF7 Breast Cancer Cell. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**. Vol. 2019, ID 2348165, 15 pages.
2. Kostyuk S.V., Porokhovnik L.N., Ershova E.S, Malinovskaya E.M, Konkova M.S., Kameneva L.V., Dolgikh O.A., Veiko V.P., Pisarev V.M, Martynov A.V., Sergeeva V.A., Kaliyanov A.A., Filev A.D., Chudakova J.M., Abramova M.S., Kutsev S.I., Izhevskaya V.L., Veiko N.N. Changes of KEAP1/NRF2 and IKB/NF-κB Expression Levels Induced by Cell-Free DNA in Different Cell Types. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**. Vol. 2018, ID 1052413, 17 pages.
3. Sergeeva V.A., Ershova E.S., Veiko N.N., Malinovskaya E.M., Kalyanov A.A., Kameneva L.V., Stukalov S.V., Dolgikh O.A., Konkova M.S., Ermakov A.V., Veiko V.P., Izhevskaya V.L., Kutsev S.I., Kostyuk S.V. Low-Dose Ionizing Radiation Affects Mesenchymal Stem Cells via Extracellular Oxidized Cell-Free DNA: A Possible Mediator of Bystander Effect and Adaptive Response. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, Vol. 2017, ID 9515809, 22 pages.

РОЛЬ ТРЕГАЛОЗЫ И ЦАМФ-ЗАВИСИМОГО СИНТЕЗА БЕЛКА RpfA В ПОДДЕРЖАНИИ И РЕАКТИВАЦИИ ПОКОЯЩИХСЯ МИКОБАКТЕРИЙ

Шлеева М.О.¹, Трутнева К.А.¹, Демина Г.Р.¹, Никитушкин В.Д.¹, Сорокоумова Г.М.², Лаптинская П.К.¹, Шумкова Е.С.¹, Кондратьева Т.К.³, Гончаренко А.В.¹, Рубакова Е.Л.³, Апт А.С.³, Капрельянц А. С.¹

¹ ИНБИ ФИЦ Биотехнологии РАН

² Московский технологический университет, кластер МИТХТ

³ Центральный научно-исследовательский институт туберкулеза Российской академии наук

Данная серия работ посвящена установлению молекулярных событий, происходящих при реактивации покоящихся микобактерий, в том числе *Mycobacterium tuberculosis*.

Ранее была установлена роль белков семейства Rpf, в частности RpfA, при переходе покоящихся микобактерий (ПМ) в активное состояние. Однако при реактивации ПМ активный синтез белков Rpf происходит на поздних стадиях, которым предшествует длительная лаг-фаза. Нельзя исключить, что в этих условиях существует некий механизм, включающийся на ранней стадии и приводящий к экспрессии белков Rpf. Целью данной работы являлось выяснение молекулярных механизмов, лежащих в основе начальных стадий реактивации микобактерий.

Было обнаружено, что повышенная экспрессия аденилатциклазы, а также цАМФ-зависимого транскрипционного фактора (цАМФ-ТФ), который контролирует экспрессию RpfA, приводит к стимулированию роста *Mycobacterium tuberculosis* в неблагоприятных условиях, более быстрой реактивации бактерий из покоящегося состояния и приобретению повышенной вирулентности для мышей, очевидно, за счет поддержания патогена в активно размножающемся состоянии.

В ПМ было обнаружено накопление трегалозы в значительных количествах (16-18 % от сухого веса клеток), соответственно в протеоме покоящихся *Mycobacterium smegmatis* были выражены ферменты синтеза трегалозы. Как известно, в спорах дрожжей и грибов трегалоза накапливается в значительных количествах и принимает участие в стабилизации внутриклеточных компонентов.

При реактивации ПМ происходило снижение концентрации трегалозы на ранних сроках и повышение концентрации глюкозы, в это же время наблюдался всплеск активности трегалазы. Активность трегалазы в покоящихся микобактериях ингибировалась в присутствии 2 мМ АТФ. Ингибитор трегалазы валидамицин А оказывал негативное влияние на реактивацию. Подобный механизм выявляет сходство между истинными спорами и покоящимися неспорулирующими бактериями.

Предложена новая схема реактивации ПМ, в которой на первом этапе активируется трегалаза, гидролизующая трегалозу с высвобождением глюкозы и повышением уровня АТФ (скорее всего за счет анаэробного гликолиза). На следующей стадии реактивации в игру включается аденилатциклаза и повышается уровень цАМФ в клетке, что активирует цАМФ-ТФ, который запускает экспрессию 150 генов, в том числе *rpfA*. На следующем этапе реактивации происходит синтез белка RpfA и посредством продуктов его ферментативной деятельности (муропептидов) активация протеинкиназы PknB, что запускает реакцию автофосфорилирования с последующей активацией ряда процессов, приводящих в итоге к стимуляции клеточного деления.

Публикации

1. Shleeva MO, Trutneva KA, Demina GR, Zinin AI, Sorokoumova GM, Laptinskaya PK, Shumkova ES, Kaprelyants AS. Free Trehalose Accumulation in Dormant *Mycobacterium smegmatis* Cells and Its Breakdown in Early Resuscitation Phase. **Front Microbiol.**, 2017; 8:524.
2. Shleeva MO, Kondratieva TK, Demina GR, Rubakova EI, Goncharenko AV, Apt AS, Kaprelyants AS. Overexpression of Adenylyl Cyclase Encoded by the *Mycobacterium tuberculosis* Rv2212 Gene Confers Improved Fitness, Accelerated Recovery from Dormancy and Enhanced Virulence in Mice. **Front Cell Infect Microbiol.**, 2017; 7:370.
3. Trutneva K.A, Shleeva MO, Nikitushkin VD, Demina GR, Kaprelyants AS. Protein composition of *Mycobacterium smegmatis* differs significantly between active cells and dormant cells with ovoid morphology. **Front Microbiol.**, 2018; 9:2083.
4. Шлеева М.О., Кондратьева Т. К., Гончаренко А. В., Апт А.С., Капрельянц А.С. Зависимый от цАМФ транскрипционный фактор в *Mycobacterium tuberculosis*, кодируемый геном *Rv3676*, как возможная мишень при создании противотуберкулезных соединений. **Прикладная биохимия и микробиология**, 2019, том 55, No 3, с. 1–6.

УПРАВЛЕНИЕ РОСТОМ МОНО- И МУЛЬТИВИДОВЫХ МИКРОБНЫХ БИОПЛЕНОК И ИЗУЧЕНИЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ВХОДЯЩИХ В НИХ МИКРООРГАНИЗМОВ

Ганнесен А.В.¹, Мартьянов С.В.¹, Журина М.В.¹, Данилова Н.Д.¹, Нетрусов А.И.³, Лезуатье О.², Фейоле М.², Плакунов В.К.¹

¹ ИНМИ ФИЦ Биотехнологии РАН

² Университет Руана, Лаб. микробиологии, сигналов и микроокружения LMSM EA4312, Франция

³ МГУ им. М.В. Ломоносова, биологический факультет

Разрабатываемая нами стратегия управления ростом и функционированием микробных биопленок развивается по трем направлениям. Во-первых, разработана тест система для поиска антибиопленочных агентов (к настоящему времени особый интерес вызывают 4-гексипезорцин и никлозамид). Во-вторых, исследуется возможность стимуляции полезных для биотехнологии биосинтетических способностей биопленок. Так, в 2018 г. нами открыт способ стимуляции синтеза в биопленках *Chromobacterium violaceum* антибактериального и антиопухолевого агента виолацеина. И, наконец, в-третьих, предпринимаются попытки расшифровать взаимоотношения между микробными компонентами мультивидовых (аналогичных природным) биопленок, а также взаимоотношений микробиоты человека с организмом хозяина. В 2018 г. особенное внимание уделено именно этой последней проблеме, чему способствовало успешное сотрудничество с французскими коллегами.

Продемонстрирован регуляторный эффект некоторых косметических препаратов (термальная вода Уриажа и тefлоза) на рост моновидовых и бинарных биопленок кожных *Cutibacterium acnes*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, а также способность данных препаратов влиять на взаимодействие микроорганизмов в составе бинарных биопленок: добавление термальной воды в среду культивирования снижало во всех случаях количество биомассы патогенного *S. aureus*, и увеличивало количество биомассы микроорганизмов-комменсалов.

Нами обнаружен аналогичный регулирующий эффект натрийуретических пептидов А- и С-типа человека в отношении моновидовых и бинарных биопленок кожных *Cutibacterium acnes*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*. Впервые показан сильный эффект пептидов в отношении моновидовых биопленок, причем этот эффект зависит от условий культивирования, что позволяет предполагать различный эффект пептидов при разных состояниях кожи человека. Подобно косметическим средствам, данные пептиды также способны регулировать рост бинарных биопленок, ослабляя рост патогенного *S. aureus*.

Публикации

1. Мартьянов С.В., Летаров А.В., Иванов П.А., Плакунов В.К. Стимуляция биосинтеза виолацеина в биопленках *Chromobacterium violaceum* под воздействием диметилсульфоксида // **Микробиология**. 2018. V. 87. № 3. P. 325-329.
2. Ганнесен А.В., Лезуатье О., Нетрусов А.И., Плакунов В.К., Фейоле М.Ж.Ж. Регуляция натрийуретическими пептидами формирования моновидовых и бинарных биопленок бактерий микробиоты кожи *Staphylococcus epidermidis* и *Staphylococcus aureus* // **Микробиология**. 2018. V. 87. № 5. P. 469-482.
3. Gannesen A.V., Borrel V., Lefeuvre L., Netrusov A., Plakunov V.K., Feuilleley M.G. Effect of two cosmetic compounds on the growth, biofilm formation activity, and surface properties of acneic strains of *Cutibacterium acnes* and *Staphylococcus aureus* // **MicrobiologyOpen**. 2018. P. e00659.
4. Gannesen A.V., Lesouhaitier O., Racine P.J., Barreau M., Netrusov A.I., Plakunov V.K., Feuilleley M.G. Regulation of monospecies and mixed biofilms formation of skin *Staphylococcus aureus* and *Cutibacterium acnes* by human natriuretic peptides // **Front. Microbiol.** 2018. V. 9. P. 2912. doi: 10.3389/fmicb.2018.02912
5. Lesouhaitier O., Clamens T., Rosay T., Desriac F., Louis M., Rodrigues S., Gannesen A., Plakunov V.K., Bouffartigues E., Tahrioui A., Bazire A., Dufour A., Cornelis P., Chevalier S., Feuilleley M.G.J. Host peptidic hormones affecting bacterial biofilm formation and virulence // **J. Innate Immun.** 2018. P. 1-15. doi: 10.1159/000493926

ЛАККАЗЫ ДЕРЕВОРАЗРУШАЮЩИХ БАЗИДИОМИЦЕТОВ ПОРЯДКА POLYPORALES: ПЕРВИЧНЫЕ VS ВТОРИЧНЫЕ КСИЛОТРОФЫ

Глазунова О.А.¹, Поляков К.М.^{1,2}, Моисеенко К.В.¹, Курзеев С.А.³, Васина Д.В.¹, Савинова О.С.¹, Федорова Т.В.¹

¹ ФИЦ «Биотехнологии» РАН

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

³ МГУ им. М.В. Ломоносова, химический факультет

Мицелиальные грибы обладают мощным потенциалом к разложению растительных, в том числе древесных субстратов, и тем самым являются необходимыми элементами углеродного цикла Земли, генерации гуминового составляющего почвы и формирования ее тонкой структуры. Дереворазрушающие грибы, принадлежащие к отделу Basidiomycota, уникальны по своей способности разрушать компоненты клеточных стенок ксилемы. Экология дереворазрушающих грибов напрямую связана с видом поражаемой ими древесины. В природных экосистемах базидиальные грибы белой гнили встречаются на неразрушенной, частично разрушенной и погребенной древесине, а также корнях. В зависимости от типа и состояния колонизируемого субстрата (разрушенная или неразрушенная древесина, древесина в почве) процессы роста гриба и утилизации лигнина, целлюлозы и гемицеллюлоз существенно различаются.

Способностью разлагать лигнин – одного из наиболее трудно деградируемого растительного биополимера, обладают в основном базидиальные грибы – возбудители белой гнили древесины. Процесс деструкции лигнина грибами белой гнили является комплексным процессом и состоит из большого количества стадий, эффективность которого определяется уникальной лигнолитической системой, в состав которой входят такие ферменты как лакказы и различные группы пероксидаз.

Лакказа (п-дифенол: кислород оксидоредуктаза, КФ 1.10.3.2) относится к группе «голубых» медьсодержащих оксидаз, катализирующих одноэлектронное окисление широкого спектра соединений фенольной природы с сопутствующим восстановлением молекулярного кислорода до воды. Субстратом-донором электронов для лакказ могут быть замещенные монофенолы, полифенолы, анилины, некоторые неорганические соединения. В активном центре фермента содержатся четыре иона меди трех различных типов (Т1, Т2 и Т3). Эффективность окисления лакказами различных субстратов зависит от значения окислительно-восстановительного потенциала (ОВП) иона меди в центре Т1. Благодаря своим свойствам эти ферменты находят применение в различных отраслях биотехнологии для биодеградации и детоксификации, органического синтеза, производства лекарственных препаратов, в текстильной промышленности, в пищевой промышленности и др. Большинство биотехнологически значимых базидиомицетов – продуцентов лакказ принадлежит к порядку Polyporales, в связи с чем, детальное исследование свойств ферментов грибов данного порядка имеет не только фундаментальное, но еще и практическое значение.

В результате проделанной работы проведен филогенетический анализ мультигенных семейств лакказ дереворазрушающих грибов белой гнили представителей порядка полипоровых (Polyporales), относящихся к семейству *Polyporaceae* – первичные раневые ксилотрофы и семейству *Steccherinaceae* – вторичные ксилотрофы, предпочитающие древесину разной степени разрушения, а также сравнительный анализ свойств и трехмерных (3D) структур лакказ. Показано, что лакказы грибов семейства *Polyporaceae* имеют высокий ОВП (около 780 мВ), в то время как лакказы грибов семейства *Steccherinaceae* обладают средним ОВП (600-700 мВ). Лакказы – представители двух семейств имеют разную субстратную специфичность, стабильность и структуру петель вокруг активного центра Т1.

Публикации

1. Moiseenko K.V., Vasina D.V., Farukshina K.T., Savinova O.S., Glazunova O.A., Fedorova T.V., Tyazhelova T.V. Expression orchestration of the laccase multigene family in white rot basidiomycete *Trametes hirsuta* 072: evidences of transcription level subfunctionalization // **Fungal Biology**, 2018, Vol. 122, P. 353-362.
2. Glazunova O.A., Shakhova N.V., Psurtseva N.V., Moiseenko K.V., Kleimenov S.Y., Fedorova T.V. White-rot basidiomycetes *Junghuhnia nitida* and *Steccherinum bourdotii*: oxidative potential and laccase properties in comparison with *Trametes hirsuta* and *Corioloopsis caperata* // **PLoS ONE**, 2018, Vol. 13(6), e0197667.
3. Glazunova O.A., Polyakov K.M., Moiseenko K.V., Kurzееv S.A., Fedorova T.V. Structure-function study of two new middle-redox potential laccases from basidiomycetes *Antrodia faginea* and *Steccherinum murashkinskyi* // **Int. J. Biol. Macromol.**, 2018, Vol. 118, P. 406-418.
4. Glazunova, O.A.; Trushkin, N.A.; Moiseenko, K.V.; Filimonov, I.S.; Fedorova, T.V. Catalytic efficiency of basidiomycete laccases: redox potential versus substrate-binding pocket structure // **Catalysts**, 2018, Vol. 8 (152).
5. 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 Crystallogr. D**, 2017, Vol. D73(5), P.388-401.

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

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

ИНБ ФИЦ Биотехнологии РАН

Введение

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

Цель исследования – масштабирование технологии биосинтеза рапамицина высокоактивным штаммом *Streptomyces hygroscopicus* совместно с подбором оптимальных условий и параметров культивирования в ферментационных установках.

Результаты исследований

Проведено масштабирование технологии биосинтеза рапамицина штаммом *Streptomyces hygroscopicus* R 33-41 совместно с оптимизацией условий и параметров культивирования, в частности регулирование активной кислотности среды, концентрации растворенного кислорода, температуры, внесение дополнительного источника углеводного питания в лабораторных и опытно-промышленных ферментационных установках, что позволило получить высокое содержание рапамицина (1270 ± 5 мг/л) по окончании процесса культивирования. При этом были устранены сложности, связанные с низкой скоростью накопления биомассы в период логарифмической фазы роста, вызывающие стремительный лизис и снижение продуцирующей способности культуры.

Подбор оптимального состава питательной среды, параметров и условий глубинного культивирования данного штамма, позволяют в дальнейшем разработать технологию получения субстанции рапамицина на опытно-промышленном и промышленном уровне.

Публикации

1. Савельева В.В., Джавахия В.В., Глаголева Е.В., Овчинников А.И., Савушкин В.А., Глаголев В.И., Новак Н.В., Попова Е.Д., Скрыбин К.Г. Получение высокоактивного штамма *Streptomyces hygroscopicus* R 33-41 и оптимизация состава питательной среды для повышения продукции рапамицина // **Биофармацевтический журнал**. 2017. 9(6) 16-24с.
2. Савельева В.В., Джавахия В.В., Глаголева Е.В., Глаголев В.И., Савушкин В.А. Оптимизация питательной среды для *Streptomyces hygroscopicus* – продуцента фармацевтической субстанции рапамицина. Екатеринбург: **Международный научно-исследовательский журнал**, 2017. №03 (57). С.14-20.
3. Савельева В.В., Джавахия В.В., Глаголева Е.В., Савушкин В.А., Глаголев В.И., Воинова Т.М. Повышение эффективности биосинтеза рапамицина штаммом *Streptomyces hygroscopicus* R 33-41 // **Естественные и технические науки**. 2018. 3 (117). С. 15-22.
4. **Патент RU 2679051** Джавахия, В.В., Глаголева Е.В., Скрыбин К.Г., Савельева В.В., Савушкин В.А., Овчинников А.И., Глаголев В.И., Воскресенская Е.Д., Новак Н.В. Штамм *Streptomyces hygroscopicus* ВКМ АС-2737D - продуцент антибиотика рапамицина и способ увеличения его продуктивности.

АНТИОКСИДАНТНОЕ И ЦИТОПРОТЕКТОРНОЕ ДЕЙСТВИЕ ДИНИТРОЗИЛЬНЫХ КОМПЛЕКСОВ ЖЕЛЕЗА

Шумаев К.Б.¹, Космачевская О.В.¹, Топунов А.Ф.¹, Пугаченко И.С.¹, Насыбуллина Э.И.¹, Рууге Э.К.², Дудылина А.Л.², Иванова М.В.², Громов С.В.³, Новиков А.А.³, Ванин А.Ф.⁴

¹ ИНБИ ФИЦ биотехнологии РАН

² НМИЦ Кардиологии Минздрава России;

³ Национальный исследовательский технологический университет «МИСиС»;

⁴ Институт химической физики им. Н.Н. Семенова РАН

Динитрозильные комплексы железа (ДНКЖ) являются метаболитами оксида азота (NO), обладающими широким спектром биологической активности. Эти комплексы играют ключевую роль во многих биохимических, физиологических и патофизиологических процессах в живых системах. Поскольку метаболизм NO тесно связан с процессами свободнорадикального окисления, несомненный интерес представляет изучение антиоксидантных свойств ДНКЖ в условиях, моделирующих окислительный галогенирующий и карбонильный стресс.

Было исследовано антиоксидантное действие ДНКЖ в различных системах: белках, липосомах, липопротеидах низкой плотности и изолированных митохондриях. ДНКЖ, связанные с глутатионом, дозозависимо снижали уровень хемиллюминесценции, обусловленный продукцией свободных радикалов в системе, моделирующей образование сильного окислителя – пероксинитрита. Кроме того, в концентрации 20–40 мкМ глутатионовые ДНКЖ эффективно ингибировали перекисное окисление в липопротеидах низкой плотности. Глутатионовые ДНКЖ снижали уровень супероксида, продуцируемого в суспензии митохондрий. ДНКЖ, связанные с карнозином, перехватывали органические свободные радикалы, которые образовывались при декомпозиции гидропероксида трет-бутила. Образование карнозиновых ДНКЖ стимулировалось метилглиоксалем, что указывает на важную роль этих комплексов при карбонильном стрессе.

Глутатионовые ДНКЖ защищали эритроциты от лизиса, вызываемого хлорноватистой кислотой (НОСІ), проявляя цитопротекторные свойства при галогенирующем стрессе. По мере увеличения концентрации ДНКЖ скорость гемолиза снижалась, а при концентрации = 50 мкМ наблюдалось полное ингибирование лизиса эритроцитов. На основании данных спектроскопии ЭПР можно заключить, что подавление гемолиза было обусловлено перехватыванием использованными комплексами свободных радикалов, возникающих в реакции НОСІ с гидропероксидами липидов.

Мы полагаем, что обнаруженные антирадикальные свойства ДНКЖ лежат в основе их антиоксидантного и цитопротекторного действия.

Публикации

1. Shumaev K.B., Kosmachevskaya O.V., Nasybullina E.I., Gromov S.V., Novikov A.A., Topunov A.F. New dinitrosyl iron complexes bound with physiologically active dipeptide carnosine. // **J. Biol. Inorg. Chem.** 2017. V. 22. № 1. P. 153-160. DOI: 10.1007/s00775-016-1418-z.
2. Shumaev K.B., Dudylyina A.L., Ivanova M.V., Pugachenko I.S., Ruuge E.K. Dinitrosyl iron complexes: Formation and antiradical action in heart mitochondria. // **Biofactors.** 2018. V. 44. № 3. P. 237-244. DOI: 10.1002/biof.1418.
3. Пугаченко И.С., Космачевская О.В., Насыбуллина Э.И., Топунов А.Ф., Ванин А.Ф., Рууге Э.К., Шумаев К.Б. Антиоксидантное и антирадикальное действие динитрозильных комплексов железа с различными лигандами. // **Биорадикалы и антиоксиданты.** 2018. Т. 5. № 3. С. 62-64.
- 4 Космачевская О.В., Шумаев К.Б., Топунов А.Ф. Сигнальное и регуляторное действие метилглиоксала в эукариотических клетках. // **Прикл. биохимия и микробиология.** 2017. Т. 53. № 3. С. 253–270. DOI: 10.7868/S0555109917030114

ПОЛУЧЕНИЕ КЛЕТОЧНЫХ ЛИНИЙ – ПРОДУЦЕНТОВ МЕДИЦИНСКИ ЗНАЧИМЫХ ГЛИКОПРОТЕИДОВ ПРИ ПОМОЩИ ПОЛИЦИСТРОННЫХ ВЕКТОРОВ НА ОСНОВЕ НЕТРАНСЛИРУЕМЫХ УЧАСТКОВ ДНК ИЗ ГЕНА EEF1A1 КИТАЙСКОГО ХОМЯЧКА И ПРИ ПОМОЩИ КО-АМПЛИФИКАЦИИ ПАР ГЕНЕТИЧЕСКИХ КОНСТРУКЦИЙ

Орлова Н.А., Ковнир С.В., Ходак Ю.А., Синегубова М.В., Воробьев И.И.

ИНБ ФИЦ биотехнологии РАН

Центральной биотехнологической задачей, решаемой при создании препаратов рекомбинантных белков для медицинского применения, является создание линий-продуцентов, сочетающих максимальную продуктивность и достаточную генетическую стабильность при их последовательной культивации в течение нескольких месяцев. В промышленной биофармацевтике обычно используются векторные плазмиды на основе немедленного раннего промотора цитомегаловируса CMV и клетки линии CHO. Данный подход имеет ряд существенных ограничений, связанных с ограниченной стабильностью функциональных генетических элементов вирусов в геноме культивируемых клеток. Такие векторы могут быть заменены на плазмиды на основе генов домашнего хозяйства, в частности гена китайского хомячка фактора элонгации трансляции 1 альфа (EEF1A1) китайского хомячка. Ранее нами были разработаны векторные плазмиды на основе гена EEF1A1, позволяющие, в отличие от других вариантов таких плазмид, проводить стабильную трансфекцию клеток линии CHO с относительно высокой эффективностью и многократно увеличивать копияность таких плазмид в геноме продуцентов при воздействии возрастающих концентраций метотрексата.

На примере модельных флуоресцентных белков и нескольких медицински значимых гликопротеидов мы установили, что при помощи полученных нами векторов в клетках может быть проведена ко-экспрессия целевого гена и двух вспомогательных генов, что привело к получению продуцента полностью биологически активного фактора IX с конечным титром продукта 6 МЕ/мл. Для гетеродимерного белка фолликулостимулирующего гормона человека (ФСГ) было установлено, что экспрессия пары неродственных генов может быть сбалансирована при помощи использования трицистронной генетической конструкции, кодирующей два целевых гена, соединенных при помощи внутреннего сайта связывания рибосом и последующей трансфекции генетической конструкции, кодирующей ген одной из цепей. Был получен продуцент ФСГ с удельной продуктивностью более 11 пг/клетка/день, что многократно превосходит иные описанные в литературе продуценты ФСГ. На примере лютеинизирующего гормона человека было установлено, что сбалансированная экспрессия пары генов может быть проведена путем ко-трансфекции двух генетических конструкций и их последующей ко-амплификации в геноме.

Публикации

1. Orlova, N. A., S. V. Kovnir, A. G. Gabibov and Vorobiev, I. (2017). "Stable high-level expression of factor VIII in Chinese hamster ovary cells in improved elongation factor-1 alpha-based system." // *VMC Biotechnol*, 2017, **17**(1): 33.
2. Орлова Н.А., Ковнир С.В., Ходак Ю.А., Ползиков М.А., Воробьев И.И. Рекомбинантный лютеинизирующий гормон человека для терапии бесплодия: получение линий-продуцентов. // **Акушерство, Гинекология, Репродукция**. 2017. Т. 11(3). С. 33-42
3. С.В. Ковнир, Н.А. Орлова, Ю.А. Ходак, М.П. Кондрашова, А.Г. Габибов, К.Г. Скрябин, А.И. Воробьев, И.И. Воробьев. Подходы к управляемой ко-амплификации генов для получения рекомбинантных белков терапевтического назначения: Исследование динамики инсерции и амплификации генетических кассет в геноме клеток яичника китайского хомячка при ко-экспрессии пары совместимых плазмид. // **Бюллетень Экспериментальной Биологии и Медицины**. 2017. Т.163 (2), С. 245-249.
4. С.В.Ковнир, Н.А. Орлова, М.И. Шапаронов, К.Г. Скрябин, А. Г. Габибов, И. И. Воробьев. Высокопродуктивная линия-продуцент фактора свертывания крови IX человека на основе клеток CHO. // *Acta Naturae* (русскоязычная версия), 2018, 10 (1), 55-69

ДЕТАЛЬНЫЙ АНАЛИЗ МЕТАБОЛИЗМА, ФИЛОГЕНИИ И РАСПРОСТРАНЕНИЯ ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ ДВУХ РОДОВ ФИЛУМА THERMOTOGAE: ДАННЫЕ СРАВНИТЕЛЬНОЙ ГЕНОМИКИ

Кубланов И.В.¹, Подосокорская О.А.¹, Nesbø C.L.², Charchuk R.², Pollo S.M.², Budwill K.⁵, Haverkamp T.H.⁴, Foght J.², Geslin C.⁶, Lossouarn J.⁷

¹ ИИМИ ФИЦ Биотехнологии РАН

² Department of Biological Sciences, University of Alberta, Edmonton, AB, Canada

³ BioZone, Department of Chemical Engineering and Applied Chemistry, Wallberg Building, University of Toronto, Toronto, ON, Canada

⁴ Centre for Ecological and Evolutionary Synthesis, Dept. of Biosciences, University of Oslo, Blindern, Oslo, Norway

⁵ InnoTech Alberta, Edmonton, AB, Canada

⁶ Laboratoire de Microbiologie des Environnements Extrêmes (LMEE), Institut Universitaire Européen de la Mer (IUEM) - UMR 6197, Université de Bretagne Occidentale (UBO), Plouzané, France

⁷ CNRS, IUEM - UMR 6197, Laboratoire de Microbiologie des Environnements Extrêmes (LMEE), Plouzané, France

Долгое время филум Thermotogae считался одной из самых глубоких (наиболее близких к общему предку бактерий, т.н. LBCA – the Last Bacterial Common Ancestor) бактериальных веток, а также одним из двух (наряду с Aquificae) бактериальных филумов, все представители которых являются исключительно (гипер)термофилами. Позже эти представления перестали быть столь однозначными: в некоторых филогенетических (и филогеномных) деревьях термогоги потеряли место у корня, кроме того были выделены мезофильные представители, растущие в богатых органикой морских осадках и невысокотемпературных нефтяных пластах. В целом, в последнее десятилетие удалось выделить много новых представителей филума (в том числе 3 новых вида сотрудниками нашей лаборатории) благодаря чему были существенно пересмотрены представления об их физиологии, филогении и таксономии (Gupta & Bhandari, 2014). Кроме того благодаря молекулярно-экологическим и сравнительным геномным исследованиям были получены новые данные о филогеографии представителей Thermotogae. Так, на примере представителей рода *Thermotoga* было показано широкое их распространение в подземной биосфере и приспособленность к таким местообитаниям, в т.ч. и благодаря активной горизонтальной эволюции (Nesbø et al., 2015).

Представляемая работа посвящена двум другим родам филума: *Thermosipho* и *Mesotoga*. Как и все остальные термогоги, оба являются облигатными органотрофами, первый – типичный обитатель различных термальных экосистем, второй – единственный мезофильный представитель филума, причем мезофильность его вторична.

Сравнительный анализ 15 геномов *Thermosipho* spp. выявил две группы: «генералистов», обладающих большими геномами, более разнообразным метаболизмом (например, спектром используемых субстратов) и, как следствие, – более распространенными, а также «специалистов», живущих исключительно в гидротермах (Haverkamp et al., 2018).

С помощью сравнительного анализа 18 геномов *Mesotoga* spp., а также транскриптомного анализа *M. prima* были исследованы филогеография представителей данного рода, а также ряд особенностей их метаболизма, в частности предложен новый механизм восстановления тиосульфата (Nesbø et al., 2018).

Работа была поддержана РФФ (гранты № 16-14-00121 и 18-44-04024).

Публикации

1. Nesbø C.L., Charchuk R., Pollo S.M., Budwill K., Kublanov I.V., Haverkamp T.H., Foght J. Genomic analysis of the mesophilic Thermotogae genus *Mesotoga* reveals phylogeographic structure and genomic determinants of its distinct metabolism // **Environ. Microbiol.** 2019. V. 21. P. 456-470. doi:10.1111/1462-2920.14477.
2. Haverkamp T.H.A., Geslin C., Lossouarn J., Podosokorskaya O.A., Kublanov I., Nesbø C.L. *Thermosipho* spp. immune system differences affect variation in genome size and geographical distributions // **Genome Biol. Evol.** 2018. doi:10.1093/gbe/evy202.

ВЛИЯНИЕ ЗАМЕН В ХАРАКТЕРИСТИЧЕСКИХ МОТИВАХ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ ТРАНСАМИНАЗ НА ПРОФИЛЬ ИХ СУБСТРАТНОЙ СПЕЦИФИЧНОСТИ

Безсуднова Е.Ю.¹, Бойко К.М.¹, Ракитина Т.В.², Зейфман Ю.С.², Николаева А.Ю.², Диброва Д.В.³, Суплатов Д.А.³, Попов В.О.^{1,2}

¹ ИНБИ ФИЦ Биотехнологии РАН

² Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт»

³ МГУ им. М.В. Ломоносова, НИИ Физико-Химической Биологии им. А.Н. Белозерского

Интерес к трансаминазам, как биокатализаторам стереоселективного переноса аминокислотной группы для процессов получения оптически активных соединений, инициировал разработку способов предсказания субстратной специфичности трансаминаз по их аминокислотной последовательности. Удачный подход был предложен для трансаминаз IV класса - IV типа укладки PLP (пиридоксаль 5'-фосфат) – связывающего домена: Nöhne et al (Nature Chem. Biol. 6 (2010), 807–813) проанализировали последовательности охарактеризованных трансаминаз этого класса с разной субстратной специфичностью, как-то: трансаминаз разветвленных L-аминокислот, трансаминаз D-аминокислот, (R)-амин:пируват трансаминаз и изохоризмат лиаз, и выделили два характеристических мотива, аминокислотные остатки которых участвуют в формировании активного центра и в связывании субстратов. Разработанный алгоритм позволил авторам предсказать новые (R)-амин:пируват трансаминазы для синтеза (R)-первичных аминов. Данный подход был взят нами за основу для поиска трансаминаз IV класса со смешанным типом активности и для обнаружения, таким образом, новых подсемейств внутри IV класса. В результате филогеномного анализа последовательностей трансаминаз из COG0115 (Galperin et al. (2015) Nucleic Acids Res 43: D261-269) и анализа характеристических мотивов в них нами обнаружены группы последовательностей, отличные от последовательностей канонических трансаминаз IV класса. Получены гомогенные препараты рекомбинантных форм трансаминаз, соответствующих последовательностям одной новой группы. Охарактеризованы субстратная специфичность и свойства новых трансаминаз, получены структуры новых ферментов. Проанализировано влияние замен в характеристических мотивах на субстратную специфичность новых трансаминаз.

Публикации

1. Bezsudnova EY, Dibrova DV, Nikolaeva AY, Rakitina TV, Popov VO. Identification of branched-chain amino acid aminotransferases active towards (R)-(+)-1-phenylethylamine among PLP fold type IV transaminases. **J Biotechnol.** 2018 271:26-28.
2. Bezsudnova EY, Boyko KM, Nikolaeva AY, Zeifman YS, Rakitina TV, Suplatov DA, Popov VO. Biochemical and structural insights into PLP fold type IV transaminase from *Thermobaculum terrenum*. **Biochimie.** 2019 158:130-138.
3. Zeifman YS, Boyko KM, Nikolaeva AY, Timofeev VI, Rakitina TV, Popov VO, Bezsudnova EY. Functional characterization of PLP fold type IV transaminase with a mixed type of activity from *Haliangium ochraceum*. Submitted to **BBA** (Proteins and Proteomics). Under review.