



ФЕДЕРАЛЬНЫЙ
ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР
«ФУНДАМЕНТАЛЬНЫЕ
ОСНОВЫ БИОТЕХНОЛОГИИ»
РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ
НАУК

СБОРНИК ТЕЗИСОВ

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

18-20 июня 2024 г.



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

СБОРНИК ТЕЗИСОВ

отчетной конференции аспирантов

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

18 – 20 июня 2024 г.

Москва
2024

УДК 601
ББК 30.16
С23

Сборник отчетной конференции аспирантов

Общая редакция:

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

Редакционная коллегия:

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

Составители:

Ю.В. Рагузова, к.соц.н. М.В. Костоломова

С23 Сборник тезисов отчетной конференции аспирантов Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук» 18–20 июня 2024 г. / сост. Ю.В. Рагузова, М.В. Костоломова; ред. В.О. Попов, А.Н. Фёдоров. – М. : ВАШ ФОРМАТ, 2024. – 174 с.

ISBN 978-5-00147-648-1

Сборник включает тезисы ежегодной отчетной конференции аспирантов Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук» (18–20 июня 2024 г.)

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

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

Proceedings of the Federal State Institution “Federal Research Centre “Fundamentals of Biotechnology” of the Russian Academy of Sciences” Postgraduate Students` Annual Reporting Conference (June 18-20, 2024)

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

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

Материалы публикуются в авторской редакции.

УДК 601
ББК 30.16
С23

ISBN 978-5-00147-648-1

© Коллектив авторов
© Федеральный исследовательский центр
«Фундаментальные основы биотехнологии»
Российской академии наук, 2024

СОДЕРЖАНИЕ

Бакунова А.К. Взаимосвязь структуры и функции трансаминазы D аминокислот из <i>Haliscomenobacter hydrossis</i>	6
Бидюк В.А. Исследование механизмов гибели клеток дрожжей в результате генетических нарушений и внешних воздействий	10
Варфоломеева Л.А. Структурное исследование трехъядерного медного центра тиоцианатдегидрогеназы	14
Захарычева А.П. Новые прокариоты гидролитики из экстремальных мест обитаний и характеристика новой целлюлазы celNB6	18
Кривицкая А.В. Молекулярное моделирование механизмов ферментативных реакций, связанных с бактериальной резистентностью к β -лактамным антибиотикам	23
Мальцева А.И. Изучение разнообразия путей автотрофной ассимиляции углерода у термофильных прокариот.....	27
Нежданова А.В. Эффекты гетерологичной экспрессии генов транскрипционных факторов (MADS-box, YABBY) и редактирования генов метаболизма (PHO1a, PDS) на особенности регуляции онтогенеза <i>Nicotiana tabacum</i> и <i>Solanum tuberosum</i>	32
Соловьева А.Ю. Активация и изучение каталитических свойств тиоцианатдегидрогеназы из галоалкалофильной бактерии <i>Thioalkalivibrio paradoxus</i>	37
Сулейманов Р.З. Поиск и метаболическая инженерия новых метанотрофных бактерий как продуцентов кормового белка для аквакультуры.....	41
Шипков Н.С. Структура и свойства тиоцианатдегидрогеназ из различных источников	47
Бубнова А.Н. Поиск аннотированных генов за предсказанными потенциальными промоторами и создание плазмидной конструкции с MCS для последующей валидации предсказанных промоторов	51
Галлямов А.А. Протеазное картирование прионных структур дрожжевого белка RNQ1.....	54
Галуза О.А. Исследование стрессоустойчивости молочнокислых бактерий, иммобилизованных в силанольно-гуматные гели	59
Жилкина Т.А. Изучение активности семейства генов PAL в ответ на обработку низкомолекулярным гидролизатом хитозана	66
Калинин Д.С. Получение стабильных линий клеток млекопитающих, продуцирующих различные варианты колицина E9 и белка иммунитета Im9	70

Кузнецов А.С. Потенциальная функция белков gr84 и gr47 бактериофага ф24В.....	74
Кулакова А.В. Влияние вторичных метаболитов на устойчивость к холодовому стрессу у картофеля	81
Ламердонова Ф.Х. Исследование изотопии углерода и водорода в компонентах высших растений на примере винограда (<i>Vitis vinifera</i> L.), произрастающего в разных географических зонах Российской Федерации, и продуктов его переработки	86
Шабаев А.В. Метаболомный профайлинг культуральных жидкостей базидиальных грибов белой гнили различных экологических ниш	89
Бруснова Н.А. Идентификация бактерий, ассоциированных с пятнистостями на листьях древесных пород.....	93
Гололобова А.В. Особенности энергетического метаболизма новых ацетогенных прокариот	97
Колосов А.В. Определение оптимальных параметров одностадийного и двухстадийного выщелачивания отходов переработки электроники	101
Лобанова Я.В. Структурные особенности взаимодействия метил-ДНК связывающего белка Kaiso и TRIM28	108
Пахомова М.Д. Влияние нарушения гликозилирования белков в секреторном пути <i>ogataea parapolymorpha</i> на гомеостаз кальция и активацию протеинкиназы HOG1	114
Салтыкова В.А. Новая факультативная метилотрофная бактерия семейства <i>Ancalomicrobiaceae</i> , развивающаяся в ассоциации с <i>Methylococcus capsulatus</i>	118
Степанова Н.В. Влияние спектрального состава света на эффективность фото-зависимых процессов в формирующихся семенах гороха (<i>Pisum sativum</i> L.).....	123
Шевцов А.В. Определение регуляторных вариантов на основе аллель специфичных событий	127
Багаева Д.И. Метилирование порфиринов как защитный механизм выживания микобактерий	131
Володина В.Н. Изучение биологического и терапевтического эффекта производных виндебурнола на мышинных моделях экспериментального аутоиммунного энцефаломиелита	135
Ефремова А.Д. Получение и изучение структурно-функциональных взаимосвязей трансгликозилазы из лактобактерий	140
Зайцев П.Е. Изучение биоинтеграции углеродных имплантируемых материалов с различными покрытиями.....	143

Игнатенко А.В. Биологическое восстановление тяжелых металлов в различных условиях на примере хроматов.....	147
Клюшин Г.С. Роль экстремофильных электроактивных микроорганизмов в процессах биоминерализации железа	151
Лайкова А.А. Исследование оптимизации биodeградации отходов и продукции биоводорода в ходе темновой ферментации в анаэробном микробном сообществе	155
Рассомахина Н.В. Моделирование процессов, объединяющих методы генерации трёхмерных опухолевых органоидов из ксенотрансплантатов и культур лимфоцитов	159
Шашин Д.М. Фотодинамический эффект эндогенных порфиринов для инактивации микобактерий.....	164
Шехурдина С.В. Изучение различных способов оптимизации метаногенного сбраживания и стимуляции прямого межвидового переноса электронов	169

Бакунова Алина Константиновна

аспирант ФИЦ Биотехнологии РАН 4 года обучения

профиль 1.5.4 Биохимия

e-mail: bakunova@mail.com



Научный руководитель

Безсуднова Екатерина Юрьевна

доктор химических наук,

в.н.с. лаборатории инженерной энзимологии

ВЗАИМОСВЯЗЬ СТРУКТУРЫ И ФУНКЦИИ ТРАНСАМИНАЗЫ D АМИНОКИСЛОТ ИЗ HALISCOMENOBACTER HYDROSSIS

Аннотация. В данном исследовании представлена структурно-функциональная характеристика новой трансаминазы IV типа укладки PLP-связывающего домена – трансаминазы D-аминокислот из бактерии *Haliscomenobacter hydrossis* (TA_Halhy). В работе проанализирована предстационарная кинетика, а также взаимодействие с ингибиторами. Анализ структуры и функции TA_Halhy показал многофункциональность консервативных остатков активного центра, а именно и их роль в связывании субстратов, стабилизации кофактора и стабилизации функционального димера. TA_Halhy эффективна в синтезе оптически чистых D-аминокислот, что делает ее перспективным объектом для разработки биокатализатора стереоселективного аминирования.

Ключевые слова: трансаминаза D-аминокислот, предстационарная кинетика, стабильность, субстратная специфичность, первичные (R)-амины, биокатализ, взаимосвязь структуры и функции

Трансаминазы – это зависимые от пиридоксаль-5'-фосфата (PLP) ферменты, они играют ключевую роль в обмене аминокислот в природе. Трансаминазы катализируют обратимый перенос аминогруппы с аминокислот на кетокислоты. В биотехнологии они используются для получения оптически чистых аминосоединений [1]. В данном исследовании представлена структурно-функциональная характеристика новой трансаминазы IV типа укладки PLP-связывающего домена из бактерии *Haliscomenobacter hydrossis* (TA_Halhy). TA_Halhy относится к малоизученной группе неканонических трансаминаз D-аминокислот, отличающихся от канонических организацией активного центра [2]. TA_Halhy строго специфична к D-аминокислотам и характеризуется одной из наибольших каталитических констант среди известных DATA. Анализ полуреакций TA_Halhy с D-аминокислотами позволил выделить элементарные стадии процесса: образование внешнего альдимины, 1-3 перенос протона; и предположить согласованный механизм 1-3 переноса протона без образования хиноидного интермедиата.

Методом рентгеноструктурного анализа получены пространственные структуры TA_Halhy и ее варианта R90I в холоформе и с ингибиторами D циклосерином и фенилгидразином, что позволило провести детальный структурный анализ TA_Halhy. Сравнительный анализ полученных структур с известными ранее трансаминазами IV типа укладки позволил выделить особенности новой организации активного центра. Установлено, что в активном центре TA_Halhy связывание субстратов регулируется тремя остатками аргинина и остатком лизина, два остатка, R28* и R90, являются консервативными в группе неканонических DATA, третий, R179, встречается только

у двух представителей семейства DATA. Особенности устройства активного центра и взаимосвязь структуры и функции TA_Halhy были проанализированы кинетическими и спектральными методами, включая спектрофотометрию, спектроскопию кругового дихроизма и спектрофлуориметрию, методами точечного мутагенеза и кристаллографии. По результатам анализа показана многофункциональность консервативных остатков аргининов. Помимо связывания субстратов остатки R28* и R90 стабилизируют кофактор, а также функциональный димер. Остаток R179 участвует только в связывании α карбоксильной группы субстрата.

Несмотря на значительный прогресс в методах белковой инженерии, изменение субстратной специфичности TA на сегодняшний день остается сложной задачей. В ходе работы был получен вариант TA_Halhy с одиночной аминокислотной заменой R90I активный в реакциях с природными субстратами D-аминокислотами, а также с субстратами без α -карбоксильной группы, первичными (R)-аминами. Карбоксильная группа является ключевой для распознавания и связывания природных субстратов в трансаминазах. Поэтому определение структурных основ продуктивного связывания субстратов без карбоксильной группы является важным знанием для разработки биокатализаторов синтеза сложных органических молекул. Анализ структуры холофермента варианта R90I и комплекса с аналогом субстрата, фенилгидразином, а также анализ структур гомологичных неканонических DATA позволил выявить молекулярные основы пластичности активного центра.

В работе исследовано взаимодействие TA_Halhy с ингибитором D циклосерином методами спектрофотометрии, спектрофлуоресценции и кристаллографии. Комплексный подход позволил проанализировать особенности взаимодействия TA_Halhy с D-циклосерином, а также механизм регенерации активного холофермента

Проведенный в работе анализ показал, что TA_Halhy высоко эффективна в реакциях аминирования алифатических и ароматических α кетокислот с различным боковым радикалом, энантиомерный избыток продуктов, D-аминокислот, превышал 99%. Высокая операционная стабильность, эффективное восстановление холофермента, высокие скорости трансаминирования и высокая стереоселективность – очевидные достоинства TA_Halhy, которые делают новую DATA привлекательным объектом для разработки биокатализатора с целью получения оптически чистых D аминокислот.

Основные выводы:

1. Трансаминаза из *H. hydrossis* принадлежит к группе неканонических трансаминаз D аминокислот, наиболее специфична к D-глутамату, при этом фермент «быстрый» k_{cat} составляет $215 \pm 6 \text{ с}^{-1}$ в реакции между D-глутаматом и пируватом при 40 °C.
2. В полуреакции трансаминазы из *H. hydrossis* с D-аминокислотами выделены три стадии: (1) образование внешнего альдимины, (2) 1-3-перенос протона, (3) выход продукта и РМР из активного центра с накоплением апофермента. Образование хиноидного интермедиата не зафиксировано.
3. Остатки R28* и R90 в активном центре трансаминазы из *H. hydrossis* выполняют несколько функций: (1) связывание субстратов, (2) стабилизация активной формы кофактора и (3) стабилизация функционального димера. Вариант с заменой R90I имеет дополнительную активность с первичными (R)-аминами.
4. D-циклосерин обратимо ингибирует трансаминазы из *H. hydrossis*. Активный фермент можно полностью регенерировать добавлением кофактора PLP за счет выхода аддуктов кофактора и D-циклосерина из активного центра.
5. Трансаминаза из *H. hydrossis* эффективно катализирует аминирование разнообразных ароматических и алифатических α -кетокислот. Энантиомерный избыток продуктов D-аминокислот превышает 99%.

ЛИТЕРАТУРА

1. Wu S., Snajdrova R., Moore J.C., Baldenius K., Bornscheuer U.T. Biocatalysis: enzymatic synthesis for industrial applications // *Angew. Chemie – Int. Ed.* – 2021. – Vol. 60. – P. 88-119.
2. Bezsudnova E.Y., Popov V.O., Boyko K.M., Structural insight into the substrate specificity of PLP fold type IV transaminases // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* – 2020. – Vol. 104, № 6. – P. 2343–2357.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ РАБОТЫ

Статьи в рецензируемых журналах:

1. Bakunova A.K., Nikolaeva A.Y., Rakitina T. V., Isaikina T.Y., Khrenova M.G., Boyko K.M., Popov V.O., Bezsudnova E.Y. The uncommon active site of D-amino acid transaminase from *Haliscomenobacter hydrossis*: biochemical and structural insights into the new enzyme // *Molecules.* – 2021. – Vol. 26(16). – P. 1-18.
2. Bakunova A.K., Isaikina T.Yu., Popov V.O., Bezsudnova E.Yu. Asymmetric synthesis of enantiomerically pure aliphatic and aromatic D-amino acids catalyzed by transaminase from *Haliscomenobacter hydrossis* // *Catalysts.* – 2022. – Vol. 12(12):1551. – P. 1-17.
3. Bakunova A.K., Kostyukov A.A., Kuzmin V.A., Popov V.O., Bezsudnova E.Yu. Mechanistic aspects of the transamination reactions catalyzed by D-amino acid transaminase from *Haliscomenobacter hydrossis* // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Proteins and Proteomics.* – 2023. – Vol. 1871(2). – P 1-8.
4. Бакунова А.К., Матюта И.О., Бойко К.М., Попов В.О., Безсуднова Е.Ю. Механизм ингибирования D-циclosерином трансаминазы D-аминокислот из *Haliscomenobacter hydrossis* // *Биохимия (Москва).* – 2023. – Т. 88(5). – С. 841-853.

Тезисы докладов:

1. Бакунова А.К., Ракитина Т.В., Бойко К.М., Безсуднова Е.Ю. Трансаминаза D-аминокислот из *Haliscomenobacter hydrossis* – потенциальный биокатализатор синтеза природных и неприродных D-аминокислот // *Современные проблемы теоретической и экспериментальной химии: Межвуз. сборник науч. трудов XV Всероссийск. конф. молодых ученых с международ. участием.* – Саратов: Изд-во «Саратовский источник». – 2021. – С. 54-56.
2. Bakunova A.K., Matyuta I.O., Nikolaeva A.Yu, Boyko K.M., Popov V.O., Bezsudnova E.Yu. Interaction of D-cycloserine with a D-amino acid transaminase from *Haliscomenobacter hydrossis* // *Bioinformatics of Genome Regulation and Structure/Systems Biology (BGRS/SB-2022): The Thirteenth International Multiconference.* Institute of Cytology and Genetics, the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences. – Novosibirsk: ICG SB RAS. – 2022. – P. 273.
3. Бакунова А.К., Бойко К.М., Николаева А.Ю., Ракитина Т.В., Попов В.О., Безсуднова Е.Ю. Трансаминаза из *Haliscomenobacter hydrossis*: причины и смысл перестройки активного центра при диссоциации кофактора пиридоксаль-5'-фосфата / *Научные труды. VI съезд биохимиков России, Сочи, Дагомыс (3-8 октября 2021)* – М.: Издательство «Перо». – 2021. – Т. 2. – С. 121.
4. Bakunova A.K., Matyuta I.O., Boyko K.M., Khrenova M.G., Popov V.O., Bezsudnova E.Yu. Revealing the structural basis of promiscuous activity of D-amino acid transaminase from *Haliscomenobacter hydrossis* // *Novel Enzymes 2023. 7th International conference on Novel Enzymes.* Greifswald (Germany) – Austria: Published by ChemIT. – 2023. – P. 111.
5. Бакунова А.К., Матюта И.О., Бойко К.М., Попов В.О., Безсуднова Е.Ю. Активность трансаминазы из *Haliscomenobacter hydrossis* в реакциях с D-аминокислотами и (R)-аминами: ста-

билизация и специфичность // Тезисы докладов 13-ой Международной научной конференции «Биокатализ. Фундаментальные исследования и применения» (г. Суздаль, 25-29 июня 2023 г.) – М.: Издательство «Адмирал принт». – 2023. – С. 43.

Bakunova Alina Konstantinovna
RESEARCH CENTER OF BIOTECHNOLOGY RAS

STRUCTURE FUNCTION RELATIONSHIP TRANSAMINASE D AMINO ACID FROM HALISCOMENOBACTER HYDROSSIS

Abstract. *This study presents the structural and functional characterisation of a new pyridoxal-5'-phosphate (PLP)-dependent transaminases of fold type IV – D-amino acid transaminase from the bacterium Haliscomenobacter hydrossis (TA_Halhy). In this work we analyzed the pre-steady-state kinetic as well as the interaction with inhibitors. Analysis of the structure and function of TA_Halhy revealed the multifunctionality of the conserved residues of the active site, namely their role in substrate binding, cofactor stabilisation and stabilisation of the functional dimer. TA_Halhy is effective in the synthesis of optically pure D-amino acids, which makes it a promising target for the development of biocatalysts for synthetic chemistry.*

Keywords: *D-amino acid transaminase, pre-steady-state kinetic, stability, substrate specificity, primary (R)-amines, biocatalysis, structure-function relationship.*

Работа выполнена при поддержке гранта РФФ № 23-74-30004.

Бидюк Виктория Александровна
аспирант ФИЦ Биотехнологии РАН 4 года обучения
профиль 1.5.3 Молекулярная биология
victoria.bidiuk@gmail.com

Научный руководитель
Кушников Виталий Владимирович
доктор биологических наук,
заведующий лабораторией молекулярной генетики



ИССЛЕДОВАНИЕ МЕХАНИЗМОВ ГИБЕЛИ КЛЕТОК ДРОЖЖЕЙ В РЕЗУЛЬТАТЕ ГЕНЕТИЧЕСКИХ НАРУШЕНИЙ И ВНЕШНИХ ВОЗДЕЙСТВИЙ

Аннотация. Грибковые патогены вызывают серьезные заболевания у человека и наносят значительный экономический ущерб сельскому хозяйству, промышленности и объектам культуры. На данный момент существует необходимость в поиске новых клеточных мишеней для противогрибковых препаратов. Исследование механизмов клеточной гибели лежит в основе поиска новых противогрибковых препаратов. В рамках данной работы было проведено исследование генов, нарушение функции которых приводит к эффективной гибели клеток дрожжей, а также изучены внешние условия, способствующие клеточной гибели. Также были изучены особенности клеточной гибели в результате воздействия нового противогрибкового препарата из класса N4-алкилцитидинов.

Ключевые слова: клеточная гибель, жизненно важные гены, пермеабиллизация мембраны, окислительный стресс, ароматические аминокислоты.

Механизмы регуляции и реализации клеточной гибели достаточно подробно описаны для клеток млекопитающих, тогда как клеточная гибель одноклеточных организмов, как прокариотических, так и эукариотических, изучена в намного меньшей степени [3]. Многие особенности механизмов запуска и реализации клеточной гибели одноклеточных эукариотов, в том числе дрожжевых грибов, остаются неизвестными [1]. Помимо прикладного направления использования знаний о клеточной гибели дрожжей, таких как поиск новых противогрибковых препаратов и получение устойчивых к различным воздействиям штаммов, очень важными являются и фундаментальные аспекты этого направления исследований. Существует достаточное количество данных о том, что регуляция гибели одноклеточных микроорганизмов, существующих в виде сообществ, важна для выживания всей популяции, и, таким образом, имеет эволюционное значение [2].

В рамках данной работы было проведено исследование клеточной гибели по двум направлениям:

- поиск генов, нарушение которых вызывает наиболее эффективную клеточную гибель дрожжей, а также описание условий, в которых эффективность гибели повышается
- изучение механизма действия нового противогрибкового препарата, и влияние на эффективность его воздействия нарушения отдельных генов и изменений внешних условий

В ходе данной работы был впервые проведен скрининг жизненно важных генов с целью поиска генов, нарушение которых приводит к быстрой гибели клеток дрожжей, с учетом контекста

наличия условий для клеточного деления. Клетки проверяли на жизнеспособность после отключения функции гена при условии наличия или отсутствия питательных веществ. В результате проведенного скрининга нами были обнаружены гены, нарушение функции которых приводит к быстрой клеточной гибели в питательной среде, то есть во время активного клеточного деления. Оказалось, что продукты большей части этих генов участвуют в обеспечении правильной клеточной полярности путем регуляции внутриклеточного транспорта и организации клеточных компонентов.

В результате скрининга нами было обнаружено очень ограниченное количество генов, гибель которых наступает в условиях отсутствия питательных веществ. Среди штаммов, которые прекращали свой рост при инкубации в воде, нами были обнаружены те, которые гибнут без пермеабиллизации клеточной стенки. Выявленные гены (*pan1*, *tip20*, *pol1*, *orc2*, *ura6* и *kar2*) относятся к разным функциональным группам, однако можно заметить, что три из шести обнаруженных генов относятся к процессам клеточного транспорта. Вероятно, клеточная гибель в этом случае связана с запуском неких апоптозоподобных процессов, что обуславливает их потерю способности к размножению, но сохранению клеточной целостности и функционирования.

В ходе изучения клеточной гибели в результате снижения, а не полного отключения функции жизненно важных генов, в нашей лаборатории было показано, что при снижении уровня экспрессии 83 жизненно важных генов из 879 наблюдается повышение количества погибших в результате потери клеточной целостности клеток. Мы предположили, что нарушение этих генов приводит к нарушению функции клеточной мембраны или клеточной стенки, что в итоге приводит к повышенной вероятности гибели в результате ее разрушения. Мы показали, что абсолютное большинство штаммов чувствительны к стрессорам клеточной мембраны, тогда как чувствительностью к стрессору клеточной стенки обладали только шесть из 61 исследуемого штамма. Количество пермеабиллизированных клеток снижается при повышении концентрации ионов K^+ и H^+ , которые важны для поддержания трансмембранного потенциала. Таким образом, нарушение функции описанных жизненно важных генов приводит скорее к нарушению функции мембраны, нежели клеточной стенки.

Помимо этого, мы также проанализировали уровень окислительного стресса в исследуемых штаммах, так как известно, что активные формы кислорода (АФК) способны повреждать клеточную мембрану, и, соответственно, приводить к ее пермеабиллизации. Окрашивание флуоресцентными красителями, детектирующими АФК, а также обработка клеточной суспензии антиоксидантами показали, что окислительный стресс в данном случае не является причиной нарушения клеточной целостности и гибели в данном случае.

В рамках данного исследования было проанализировано влияние инактивации отдельных генов на эффективность воздействия нового вещества с противогрибковой активностью – 3'-дезоксигуанидин-3'-амино-N4-алкилцитидина с рабочим названием SOV4. Мы показали, что нарушение функции генов, ответственных за биосинтез тирозина и триптофана приводит к чувствительности к воздействию SOV4. Обеспечение внешним источником ароматических аминокислот снимает чувствительность штаммов с нарушенным биосинтезом тирозина и триптофана только в присутствии антиоксидантов в среде инкубации, что указывает на значимую роль окислительного стресса в повышении уровня клеточной гибели в результате воздействия SOV4 у штаммов с нарушенным биосинтезом ароматических аминокислот. Эффективность воздействия SOV4 на штамм дикого типа также существенно снижается при совместной инкубации с антиоксидантами. С целью поиска клеточных систем, участвующих в механизме устойчивости к SOV4, был проведен полногеномный скрининг. В результате было обнаружено, что делеция гена *cka2*, ответственного за активацию клеточного ответа на стресс, приводит к повышению устойчивости к воздействию SOV4.

Основные выводы:

В результате проведенного скрининга дрожжевой коллекции было обнаружено, что инактивация генов *pan1*, *tip20*, *pol1*, *orc2*, *ura6* и *kar2* вызывает клеточную гибель без потери клеточной целостности в условиях отсутствия питательных веществ в среде инкубирования. Было выявлено, что наиболее критичным для выживания клетки в присутствии питательных веществ и активного деления было сохранение правильной регуляции клеточной полярности и везикулярного транспорта. Нарушение функций генов, ответственных за выполнение этой функции, приводило к наиболее быстрой гибели клеточной популяции.

При снижении уровня экспрессии 83 жизненно важных генов, наблюдается клеточная гибель, сопровождающаяся активной потерей целостности клеточной мембраны. В результате данной работы было показано, что у исследуемых штаммов наблюдается нарушение клеточной мембраны, связанное с нарушением функции жизненно важных генов. При этом, окислительный стресс не является причиной клеточной гибели для этих штаммов.

Было обнаружено, что в механизме чувствительности дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* к SOV4 важную роль играет достаточный внутриклеточный уровень аминокислот тирозина и триптофана, а также присутствие антиоксидантов. В результате полногеномного скрининга нами было показано, что делеция гена *cka2*, ответственного за регуляцию запуска защитных систем клетки, приводит к повышению устойчивости к исследуемому N4-алкилцитидину.

ЛИТЕРАТУРА

1. Grosfeld E. V. [и др.]. A systematic survey of characteristic features of yeast cell death triggered by external factors // Journal of Fungi. 2021. Т. 7. № 11.
2. Kireeva N. A. [и др.]. Adaptive Role of Cell Death in Yeast Communities Stressed with Macrolide Antifungals // mSphere. 2021. № 6 (6). С. e00745-21.
3. Newton K. [и др.]. Cell death // Cell. 2024. № 2 (187). С. 235–256.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ РАБОТЫ

Статьи в рецензируемых журналах:

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

Тезисы докладов:

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

// Механизмы адаптации микроорганизмов к различным условиям среды обитания: тезисы докладов Второй Всероссийской научной конференции с международным участием. Иркутск, Байкал, 28 февраля – 6 марта 2022 г. / СИФИБР СО РАН; [отв. ред. Ю. А. Маркова]. – Иркутск: Издательство ИГУ, 2022. – С. 26-28

3. Бидюк В.А. Фотоконверсия GFP в результате окислительного стресса ассоциированного с гипоксией во время флуоресцентной микроскопии // Сборник тезисов отчётной конференции аспирантов ФИЦ Биотехнологии РАН: направление подготовки 06.06.01 Биологические науки (21–25 июня 2021 г.) / под ред. В.О. Попова, А.Н. Фёдорова; сост. Е.С. Титова. – М.: ВАШ ФОРМАТ, 2021. – С. 6–9. (тезисы и устный доклад)
4. Бидюк В.А. Роль триптофана и тирозина в токсичности фунгицидных нуклеозидов с липофильной группой // Сборник тезисов отчётной конференции аспирантов ФИЦ Биотехнологии РАН: направление подготовки 06.06.01 Биологические науки (23-30 июня 2022 г.) / под ред. В.О. Попова, А.Н. Фёдорова; сост. Е.С. Титова, С.В. Соловьева. – М.: ВАШ ФОРМАТ. – 2022. – С. 16-22. (тезисы и устный доклад)
5. Бидюк В.А. Роль окислительного стресса и дефицита ароматических аминокислот в механизме действия новых фунгицидных нуклеозидов с липофильной группой // Сборник тезисов отчётной конференции аспирантов Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук» 19 – 21 июня 2023 г.». Москва: Ваш Формат, 2023 / под ред. В.О. Попова, А.Н. Фёдорова; сост. Ю.В. Рагузова, М.В. Костоломова. – М.: ВАШ ФОРМАТ. – 2023. – С. 49-52. (тезисы и устный доклад)
6. Бидюк В.А., Макаров Д.А., Александрова Л.А., Жгун А.А., Э.Ш.М.О. Гази, Александров А.И. Роль окислительного стресса и дефицита ароматических аминокислот в механизме действия новых фунгицидных нуклеозидов с липофильной группой // Материалы IV Российского микробиологического конгресса (24 – 29 сентября 2023 г.) – Томск: ТГУ, 2023. – С. 112. (публикация и стендовый доклад)

Bidiuk Victoria Alexandrovna

FEDERAL RESEARCH CENTER OF BIOTECHNOLOGY INVESTIGATING

THE MECHANISMS OF YEAST CELL DEATH RESULTING FROM GENETIC DISORDERS AND EXTERNAL INFLUENCES

Abstract. *Fungal pathogens cause serious human disease and significant economic damage to agriculture, industry and cultural institutions. There is a need for the discovery of new cellular targets for antifungal drugs. The study of the mechanisms of cell death is the basis for the search for new antifungal drugs. This work has involved searching for genes whose dysfunction leads to effective death of yeast cells and studying the external conditions that contribute to cell death. Characteristics of cell death following exposure to a novel N4-alkylcytidine antifungal agent were also investigated.*

Keywords: *cell death, essential genes, membrane permeabilization, oxidative stress, aromatic amino acids.*

Варфоломеева Лариса Александровна
аспирант ФИЦ Биотехнологии РАН 4 года обучения
профиль 1.5.4 Биохимия
e-mail: l.varfolomeeva@fbras.ru

Научный руководитель
Бойко Константин Михайлович
кандидат биологических наук
с.н.с. лаборатории инженерной энзимологии



СТРУКТУРНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ТРЕХЪЯДЕРНОГО МЕДНОГО ЦЕНТРА ТИОЦИАНАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ

Аннотация. Медьсодержащий фермент – тиюцианатдегидрогеназа (TcDH) участвует у ряда галоалкалофильных микроорганизмов в метаболическом пути окисления тиюцианата с образованием цианата и элементной серы, что сопровождается переносом двух электронов на акцептор. Фермент функционирует в виде гомодимера, а его трехъядерный медный центр обладает уникальным строением. В рамках работы была установлена роль ряда остатков активного центра TcDH, выявлены ключевые конформационные изменения трехъядерного медного центра фермента при связывании субстрата, методами рентгеноструктурного анализа (РСА) и ЭПР-спектроскопии предположено окислительно-восстановительное состояние каждого из ионов меди, а также исследованы первые этапы каталитической реакции.

Ключевые слова: тиюцианатдегидрогеназа, трехъядерный медный центр, закрытая и открытая конформации, комплексы с ингибиторами, перестроение активного центра, точечный мутагенез, рентгеноструктурный анализ, ЭПР-спектроскопия.

Окисление тиюцианата по «цианатному пути» у бактерии *Thioalkalivibrio paradoxus* ARh1 катализирует фермент – тиюцианатдегидрогеназа (trTcDH), содержащий трехъядерный медный центр с уникальным строением [1]. Структура trTcDH была установлена методом рентгеноструктурного анализа с разрешением 1.45 Å, однако качество структурных данных не позволило верифицировать предложенные модель связывания субстрата и механизм первой стадии каталитической реакции [1], что диктовало необходимость дополнительной работы по улучшению деталей структуры.

На первом этапе работы проводили эксперименты по улучшению качества кристаллов trTcDH. Точечные замены аминокислотных остатков на поверхности с целью модификации кристаллических контактов не привели к улучшению качества кристаллов trTcDH. В связи с этим был проведен поиск гомологичного фермента из другого организма. В качестве нового объекта исследования была выбрана pmTcDH из бактерии *Pelomicrobium methylotrophicum*, кристаллы которой позволили установить структуру фермента с атомным разрешением. PmTcDH, как и trTcDH, представляет собой димер и содержит трехъядерный медный центр, образованный ионами Cu1, Cu2 и Cu3. В отличие от trTcDH, субъединицы димера pmTcDH находились в двух разных конформациях – открытой и закрытой. Атомное разрешение позволило точно охарактеризовать архитектуру трехъядерного медного центра фермента в обеих конформациях, выявить несколько положений для ионов меди Cu2 и Cu3 и описать конформационные перестройки активного центра, происходящие при переходе от открытой конформации к закрытой.

Ингибитор тиомочевина и аналог субстрата - селеноцианат были обнаружены только в закрытой конформации фермента. Полученные структурные данные для комплексов pmTcDH подтвердили модель связывания субстрата в активном центре, предложенную нами ранее [1].

В рамках работы показана важная роль остатка F436 в стабилизирующих взаимодействиях в активном центре trTcDH, важных для правильности переходов от открытой конформации фермента к закрытой.

Для исследования окислительно-восстановительного состояния трехъядерного медного центра TcDH методом ЭПР-спектроскопии в Q- и X-диапазонах был получен ряд точечных мутантных вариантов pmTcDH, у которых один или два иона меди предположительно не связывались в активном центре вследствие замены координирующих их остатков. Форма ЭПР-спектров мутантных форм pmTcDH, где отсутствовали ион Cu1 или Cu2, отличалась от формы спектров фермента дикого типа, в то время как форма спектров фермента с низкой заселенностью иона Cu3 была похожа на форму спектров фермента дикого типа. Инкубация pmTcDH с 1 мМ тиоцианатом или селеноцианатом в отсутствие акцептора электронов приводила к изменению ЭПР-спектров в Q- и X-диапазонах, в то время как инкубация с 10 мМ тиомочевинной сходного эффекта не оказывала. Таким образом, можно предположить, что тиоцианат и селеноцианат приводят к восстановлению трехъядерного центра фермента.

Основные выводы и результаты:

Получены пространственные структуры pmTcDH с атомным разрешением, что позволило детально охарактеризовать архитектуру активного центра фермента в закрытой и открытой конформациях. Ингибиторы тиомочевина и селеноцианат обнаружены в активном центре субъединиц в закрытой конформации. Остаток F436 участвует в стабилизирующих взаимодействиях в активном центре и важен для корректного перехода между открытой и закрытой конформациями. Уменьшение заселенности иона Cu3 в активном центре не влияет на форму ЭПР-спектра фермента в X- и Q-диапазонах. Инкубация pmTcDH с 1 мМ тиоцианатом или селеноцианатом в отсутствие акцептора электронов приводит к изменению ЭПР-спектров в Q- и X-диапазонах, в то время как присутствие 10 мМ тиомочевины на ЭПР-спектры фермента влияния не оказывает.

ЛИТЕРАТУРА

1. Tikhonova T.V., Sorokin D.Y., Hagen W.R., Khrenova M.G., Muyzer G., Rakitina T.V., Shabalin I.G., Trofimov A.A., Tsallagov S.I., Popov V.O. Trinuclear copper biocatalytic center forms an active site of thiocyanate dehydrogenase // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2020. – Vol. 117(10). – P. 5280-5290.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИИ ПО ТЕМЕ РАБОТЫ

Статьи в рецензируемых журналах:

1. Varfolomeeva L.A., Solovieva A.Yu., Shipkov N.S., Kulikova O.G., Dergousova N.I., Rakitina T.V., Boyko K.M., Tikhonova T.V., Popov V.O. Probing the Role of a Conserved Phenylalanine in the Active Site of Thiocyanate Dehydrogenase // *Crystals*. – 2022. – Vol. 12. – P. 1787.
2. Варфоломеева Л.А., Поляков К.М., Комолов А.С., Ракитина Т.В., Дергоусова Н.И., Дороватовский П.В., Бойко К.М., Тихонова Т.В., Попов В.О. Улучшение дифракционных свойств кристаллов тиоцианатдегидрогеназы // *Кристаллография*. – 2023. – Т. 68 (6). – С. 888-893.

Тезисы докладов:

1. Варфоломеева Л.А., Поляков К.М., Комолов А.С., Ракитина Т.В., Бойко К.М., Тихонова Т.В., Попов В.О. Модификация поверхностных остатков тиоцианатдегидрогеназы (TCDH) предотвращает двойникование кристаллов фермента // Сборник тезисов «XXXIII Зимняя молодежная научная школа «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии» (8–11 февраля 2021, ИБХ РАН). – 2021. – С. 8. (стендовый доклад)
2. Варфоломеева Л.А., Бойко К.М. ИЗУЧЕНИЕ МЕХАНИЗМА РЕАКЦИИ ТИОЦИАНАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ МЕТОДОМ РЕНТГЕНОСТРУКТУРНОГО АНАЛИЗА // Сборник тезисов отчётной конференции аспирантов: 21–25 июня 2021 г.: направление 06.06.01 «Биологические науки» / под редакцией В.О. Попова, А.Н. Фёдорова; сост. Е.С. Титова. – М.: МАКС Пресс. – 2021. – С. 44–47. (устный доклад)
3. Варфоломеева Л.А., Поляков К.М., Шипков Н.С., Дергоусова Н.И., Бойко К.М., Тихонова Т.В., Попов В.О. Перестройки медного кластера тиоцианатдегидрогеназы из *Hydrogenophila bacterium* в процессе каталитической реакции на основе рентгеноструктурных данных с атомным разрешением // Сборник тезисов «XXXIV Зимняя молодежная научная школа «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии» (8–11 февраля 2022, ИБХ РАН). – 2022. – С. 13. (устный доклад)
4. Варфоломеева Л.А., Бойко К.М. ИЗУЧЕНИЕ МЕХАНИЗМА РЕАКЦИИ ТИОЦИАНАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ МЕТОДОМ РЕНТГЕНОСТРУКТУРНОГО АНАЛИЗА // Сборник тезисов отчётной конференции аспирантов: 23–30 июня 2022 г.: направление 06.06.01 «Биологические науки» / под редакцией В.О. Попова, А.Н. Фёдорова; сост. Е.С. Титова, С.В. Соловьева. – М.: МАКС Пресс. – 2022. – С. 59–63. (устный доклад)
5. Варфоломеева Л.А., Поляков К.М., Цаллагов С.И., Шабалин И.Г., Хренова М.Г., Бойко К.М., Ракитина Т.В., Хаген В.Р., Тихонова Т.В., Попов В.О. Новый медь-содержащий фермент тиоцианатдесульфуреза – от структурных исследований к механизму действия // Сборник тезисов “III Объединенный научный форум физиологов, биохимиков и молекулярных биологов. VII Съезд биохимиков России. X Российский симпозиум «белки и пептиды». VII Съезд физиологов СНГ” (Сочи – Дагомыс, Россия 3–8 октября 2021) – 2022. – Т II, С. 122. (устный доклад)
6. Варфоломеева Л.А., Соловьева А.Ю., Шипков Н.С., Дергоусова Н.И., Ракитина Т.В., Бойко К.М., Тихонова Т.В., Попов В.О. Консервативный остаток F436 не участвует в сборке медного кластера активного центра, но стабилизирует конформацию последнего в тиоцианатдегидрогеназе // Сборник тезисов “Актуальные аспекты современной микробиологии XIII молодежная школа-конференция с международным участием. Сателлитная конференция для молодых ученых «Современная структурная биология» (Институт микробиологии им. С.Н. Виноградского, ФИЦ Биотехнологии РАН. Москва, 16–18 ноября 2022 г.) – 2022. – С. 48-49. (постерный доклад)
7. Варфоломеева Л.А., Бойко К.М. ИЗУЧЕНИЕ МЕХАНИЗМА РЕАКЦИИ ТИОЦИАНАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ МЕТОДОМ РЕНТГЕНОСТРУКТУРНОГО АНАЛИЗА // Сборник тезисов отчётной конференции аспирантов: 19–21 июня 2023 г.: направление 06.06.01 «Биологические науки» / под редакцией В.О. Попова, А.Н. Фёдорова; сост. Ю.В. Рагузова, М.В. Костоломова. – М.: МАКС Пресс. – 2023. – С. 53–55. (устный доклад)
8. Варфоломеева Л.А., Поляков К.М., Соловьева А.Ю., Шипков Н.С., Дергоусова Н.И., Бойко К.М., Тихонова Т.В., Попов В.О. Перестроение трехъядерного медного центра тиоцианатдегидрогеназы в процессе катализа // Сборник тезисов 13-ой Международной научной конференции «Биокатализ. Фундаментальные исследования и применения» (г. Суздаль, Россия 25-29 июня 2023) – 2023. – Т. I, С. 52 (тезисы и устный доклад)

Основные достижения

1. Призер в конкурсе работ молодых ученых в XXXIV международной зимней молодежной научной школе «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии».
2. Призер в конкурсе работ молодых ученых на 13-ой Международной научной конференции «Биокатализ. Фундаментальные исследования и применения».

Varfolomeeva Larisa Aleksandrovna
FEDERAL RESEARCH CENTER OF BIOTECHNOLOGY RAS

STRUCTURAL STUDY OF THE TRINUCLEAR COPPER CENTER OF THIOCYANATE DEHYDROGENASE

Abstract. *The copper-containing enzyme thiocyanate dehydrogenase (TcDH) is involved in a number of haloalkaliphilic microorganisms in the metabolic pathway of thiocyanate oxidation with the formation of cyanate and elemental sulfur, which is accompanied by the transfer of two electrons to the acceptor. The enzyme functions as a homodimer, and its trinuclear copper center has a unique structure. As part of the work, the role of a number of residues in the active center of TcDH was established, key conformational changes in the trinuclear copper center of the enzyme during substrate binding were identified, the redox state of each of the copper ions was assumed using X-ray diffraction analysis and EPR spectroscopy, and the first stages of the catalytic reaction were studied.*

Keywords: *thiocyanate dehydrogenase, trinuclear copper center, closed and open conformations, complexes with inhibitors, active site rearrangements, point mutagenesis, X-ray diffraction analysis, EPR spectroscopy.*

Захарычева Алиса Павловна

аспирант ФИЦ Биотехнологии РАН 4 года обучения

профиль 1.5.11 Микробиология

e-mail: alice-keytown@ya.ru



Научный руководитель

Хижняк Татьяна Владимировна

доктор биологических наук

зав. лабораторией экологии и геохимической

деятельности микроорганизмов

НОВЫЕ ПРОКАРИОТЫ ГИДРОЛИТИКИ ИЗ ЭКСТРЕМАЛЬНЫХ МЕСТ ОБИТАНИЙ И ХАРАКТЕРИСТИКА НОВОЙ ЦЕЛЛЮЛАЗЫ CELNB6

Аннотация. Исследование сосредоточено на поиске и характеристике новых экстремофильных микроорганизмов и их энзимов, в частности, галоалкалофильных актиномицетов и археи. В результате работы проведена характеристика двух новых штаммов галоалкалофильных актиномицетов – АСПА22 и АСПА39, выделенных из содовых солончаков. Эти штаммы проявляют значительную гидролитическую активность на различных субстратах и растут в широком диапазоне pH, солености и температур. Наряду с этим изучена целлюлаза celNB6 из экстремально галоалкалофильной археи *Natronobiforma cellulositropha*. Проведен биоинформатический анализ её структуры, созданы рекомбинантные клоны в системах *Escherichia coli* и *Haloferax volcanii*, исследованы основные биохимические свойства фермента, включая его активность, стабильность в различных буферных системах и устойчивость к денатурирующим агентам. Полученные результаты имеют высокий потенциал для применения в биотехнологических процессах при экстремальных условиях.

Ключевые слова: гиперсоленые среды, актиномицеты, галоархеи, гидролитические ферменты, целлюлаза.

До 75% всех производимых ферментов, используемых в промышленной биотехнологии, относится к классу гидролитических ферментов (или гидролаз). Их получают из ограниченного числа мезофильных видов грибов (*Trichoderma*, *Aspergillus*), бактерий (*Bacillus*) и дрожжей (*Saccharomyces cerevisiae*), поэтому эти белки работают оптимально только в узких диапазонах физических и химических условий. Гидролазы часто становятся неэффективными в экстремальных условиях промышленных процессов, таких как высокие и низкие температуры, кислые или щелочные показатели pH среды или высокая соленость. Поэтому работа по поиску новых организмов и характеристике их ферментов с уникальными свойствами является актуальной [1, 2]. Гиперсоленые среды являются интересными объектами для изучения и поиска новых экстремофильных микроорганизмов, которые могут стать источником экстремозимов с новыми свойствами.

Одной из наиболее представленных групп из домена *Bacteria* в гиперсоленых средах являются актинобактерии (или актиномицеты). Это грамположительные нитчатые бактерии с высоким содержанием гуанина и цитозина в геноме. Они используют стратегию “salt-out” для выживания в экстремальных условиях: синтезируют различные электрически нейтральные органические вещества внутри клетки для обеспечения осмотического баланса цитоплазмы. В большинстве

случаев данные организмы – свободноживущие бактерии, которые широко распространены в наземных и в водных экосистемах. В биотехнологии алкалофильные, галофильные и галоалкалофильные актиномицеты вызывают большой интерес, поскольку они могут стать источником новых антибиотиков и ферментов, способными работать при высоких значениях pH и солености.

Галофильные археи (класс *Halobacteria*) являются доминирующими представителями в гиперсоленых местообитаниях. Большинство представителей галоархей относятся к экстремальным галофилам – оптимальный рост клеток наблюдается при 2.5–5М соли. Для жизни в условиях осмотического стресса галоархеи используют стратегию “salt-in”, когда концентрация ионов калия и хлорида внутри клетки аналогична ионному составу окружающей среды. Белки внутри клеток галоархей остаются в нативной форме и функциональными благодаря увеличению кислотных остатков на их поверхностях, уменьшению количества гидрофобных остатков, а также наличию дополнительных пептидных вставок с кислыми аминокислотами [3].

Цель исследования – а) охарактеризовать два новых штамма галоалкалофильных актиномицетов, выделенных из содовых солончаков, и б) изучить гидролитический фермент гликозидазу на примере целлюлазы celNB6 экстремально галоалкалофильной археи *Natronobiforma cellulositropha*.

Для описания новых штаммов были проверены их основные ростовые характеристики (потребление субстратов, рост при различных pH, температурах и солености), а также проведен филогенетический и хемотаксономический анализы.

В ходе работы выяснено, что штаммы актиномицетов проявляют высокую активность, используя широкий спектр различных субстратов – сахаров, полисахаридов, органических кислот, при этом, у штамма АСПА39 этот спектр больше. В результате изучения ростовых характеристик получено, что диапазон роста по pH у АСПА22 составил от 7 до 10.3 (опт. 7.3-9.0), а у АСПА39 от 7.5 до 10.0 (опт. 8.2-8.5); диапазон роста по солености колебался от 0.1 до 2М у штамма АСПА22 и от 0.1 до 2.5М – у штамма АСПА39; температурный диапазон роста штаммов составил от 18 °C до 47 °C с оптимумом роста 23-27 °C. На основании полученных морфологических, физиологических, биохимических свойств и филогенетического анализа штаммов они описаны как новые роды и виды: штамм АСПА22 – *Natronoglycomyces albus* gen. nov., sp. nov. и штамм АСПА39 – *Natronosporangium hydrolyticum* gen. nov., sp. nov.

В рамках работы гранта РФФИ в результате биоинформатического анализа в геноме галоалкалофильной археи *Natronobiforma cellulositropha* [4] было обнаружено несколько десятков генов гидролаз, участвующих в разложении целлюлозы и относящиеся к различным семействам – GH5, GH9, GH51, GH10, среди которых преобладает семейство GH5. Поэтому для дальнейшей работы была выбрана эндоглюканаза из семейства GH5 (кодирующий ген, ID 2642502327). Так как галоалкалофильная архея растет в сильносоленых средах с накоплением небольшого количества биомассы, целлюлаза была клонирована в двух модельных системах.

Для характеристики целлюлазы celNB6 были поставлены следующие задачи: провести биоинформатический анализ структуры celNB6; получить клоны *Escherichia coli* и *Haloferax volcanii* со вставкой целевого гена фермента со специальными метками (His6-таг и Strep-II таг, соответственно); получить высокий выход рекомбинантной целлюлазы при экспрессии гена, а также чистый гомогенный ферментный препарат; проанализировать вторичную структуру рекомбинантного фермента celNB6.

По на основе аминокислотной последовательности была построена теоретическая структура белка на сервере Phyre2. Для более детального изучения полученная модель была загружена и визуализирована в программе PyMOL. Исследование фермента на основе базы данных InterPro показало, что рекомбинантная целлюлаза содержит несколько функциональных доменов – в начале последовательности с 1 по 49 а. к. находится сигнальный пептид, далее гликозид-гидролаз-

ный домен семейства GH5 и три фибронектиновых домена типа-III (FN3). В конце аминокислотной последовательности обнаружен Ca-связывающий сайт EF-Hand1.

Далее, следуя плану работы были получены клоны с целевым геном: *Escherichia coli* BL21-CodonPlus (DE3)-RIPL (pET-46 Ek/LIC с His6-тагом), *Escherichia coli* BL21(DE3) (pET22 TEV с His6-тагом) и *Haloferax volcanii* 3-2_1 DS70 ΔpyrE2 (pTA1392 с Strep-II тагом). Данные клоны выращивали на богатых средах, проводили экспрессию гена, концентрировали и разрушали биомассу для получения фракции растворимых белков. Очистку целевого фермента проводили при помощи аффинной хроматографии: Ni-аффинная, ионно-обменная, гель-фильтрация.

Во всех клонах получена активность фермента на бета-глюкане, лихенане и КМЦ. Дополнительно, для клона *H. volcanii* 3-2_1 были подобраны условия для сверхэкспрессии, т.к. было важно увеличить максимальный выход рекомбинантного белка – после добавления 3 мМ триптофана сверхэкспрессию следует проводить в течении 24 ч при температуре 42 °С. Работа с клоном *H. volcanii* 3-2_1 была приостановлена, так как очищенный фермент терял активность. Для клонов *E. coli* была проверена возможность работы эндоглюканазы в зависимости от концентрации NaCl – целлюлаза celNB6 активна в диапазоне солености от 0 до 2М NaCl.

На очищенном ферменте celNB6 из клона *E. coli* с плазмидой pET22 получены его основные биохимические свойства (активность и стабильность при разных значениях pH в органических, минеральных буферах и разной температуре, влияние денатурирующих агентов). Оптимальный диапазон работы фермента в средах с pH 6-8, при этом в органических буферах активность ниже, чем в солевых. Температурный оптимум эндоглюканазы celNB6 составил 37–42 °С, а диапазон – от 25 до 50 °С, что соответствует оптимуму и диапазону температур, в которых растет *Natronobiforma cellulositropha*. Фермент способен сохранять активность в течение 92-94 ч.

Для изучения вторичной структуры рекомбинантной целлюлазы были использованы методы флюоресценции и кругового дихроизма. Полученные данные показали, что фермент обладает формой, характерной для альфа/бета белков. При изучении влияния солей на стабильность белка выяснилось, что при добавлении 0.5М и 1М NaCl конформационные изменения белка при повышении температуры не наблюдаются. При отсутствии в буфере NaCl белок денатурирует при повышении температуры 75 °С и выше. Это говорит о том, что соли помогают поддерживать стабильность вторичной структуры целлюлазы. При добавлении денатурирующих агентов, таких как мочевины, белок начинает разворачиваться (при концентрации 4М мочевины и выше).

Основные выводы:

Проведена характеристика и описание двух галоалкалофильных штаммов актиномицетов, выделенных ранее из солончаковых почв и обладающих гидролитической активностью. На основании полученных морфологических, физиологических, биохимических, молекулярных свойств штаммов они описаны как новые роды и виды: АСРА22 – *Natronoglycomyces albus* gen. nov., sp. nov. (DSM 106290 = VKM 2771) и АСРА39 – *Natronosporangium hydrolyticum* gen. nov., sp. nov. (DSM 106523 = VKM 2772).

Проведена характеристика рекомбинантной целлюлазы celNB6 из *N. cellulositropha* AArce15. Целевой фермент (ID 2642502327) обладает многодоменной структурой; рекомбинантный фермент из клонов *E. coli* и *H. volcanii* проявляет эндоглюканазную активность на КМЦ, бета-глюкане и лихенане; celNB6 сохраняет свою активность при температуре от 25 до 50 °С с оптимумом в диапазоне 37–42 °С; фермент стабилен и активен при солености от 0 до 2М NaCl; эндоглюканаза стабильна в солевом и органическом буферах в диапазоне pH от 6 до 8, при этом активность в солевых буферах выше, чем в органических; рекомбинантная целлюлаза обладает структурной формой, характерной для альфа/бета белков; конформация белка в соле-

ных условиях (при 0.5-1M NaCl) не изменяется при температурах до 95 °С; в отсутствии NaCl белок стабилен до температуры 75 °С; фермент стабилен в присутствии высоких концентраций денатурирующих агентов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Johnson J., Sudheer P.D.V.N., Yang Y.-H., Kim Y.-G., Choi K.-Y. Hydrolytic activities of hydrolase enzymes from halophilic microorganisms // *Biotechnology and Bioprocess Engineering*. – 2017. – Vol. 22(4). – P. 450–461.
2. Sarmiento F., Peralta R., Blamey J.M. Cold and hot extremozymes: industrial relevance and current trends // *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. – 2015. – Vol. 3. – article 148.
3. Reed C.J., Lewis H., Trejo E., Winston V., Evilia C. Protein adaptations in archaeal extremophiles // *Archaea*. – 2013. – Vol. 2013. – article 373275.
4. Sorokin D.Y., Khijniak T.V., Kostrikina N.A., Elcheninov A.G., Toshchakov S.V., Bale N.J., Sinninghe Damste J.S., Kublanov I.V. *Natronobiforma cellulositropha* gen. nov., sp. nov., a novel haloalkaliphilic member of the family *Natrialbaeaceae* (class *Halobacteria*) from hypersaline alkaline lakes // *Systematic and Applied Microbiology*. – 2018. – Vol. 41(4). – P. 355–362.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ РАБОТЫ

Статьи в рецензируемых журналах:

1. Sorokin D.Y., Elcheninov A.G., Khijniak T.V., Zaharycheva A.P., Boueva O.V., Ariskina E.V., Bunk B., Spröer C., Evtushenko L.I., Kublanov I.V., Hahnke R.L. *Natronosporangium hydrolyticum* gen. nov., sp. nov., a haloalkaliphilic polyhydrolytic actinobacterium from a soda solonchak soil in Central Asia // *Syst. Appl. Microbiol.* – 2022. – 45(3). – article 126307. doi: 10.1016/j.syapm.2022.126307.
2. Sorokin D.Y., Khijniak T.V., Zaharycheva A.P., Elcheninov A.G., Hahnke R.L., Boueva O.V., Ariskina E.V., Bunk B., Kublanov I.V., Evtushenko L.I. *Natronoglycomyces albus* gen. nov., sp. nov., a haloalkaliphilic actinobacterium from a soda solonchak soil // *Int J Syst Evol Microbiol.* – 2021. – 71(5). – article 004804. doi: 10.1099/ijsem.0.004804.

Тезисы докладов:

1. Захарычева А.П., Хижняк Т.В. Рекомбинантные целлюлазы экстремально галоалкалофильной археи *Natronobiforma cellulositropha* // Актуальные аспекты современной микробиологии, XIII молодежная школа-конференция с международным участием, Институт микробиологии им. С.Н. Виноградского, ФИЦ Биотехнологии РАН, г. Москва, 16-18 ноября 2022 г. – 2022. – Стр. 79–81. – М: ВАШ ФОРМАТ. – ISBN: 978-5-00147-435-7 (постерный доклад).
2. Захарычева А.П. Изучение гидролитических ферментов экстремально галофильной археи *Natronobiforma cellulositropha* // Сборник тезисов ежегодной отчетной конференции аспирантов Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук», 23-30 июня 2022. – Стр. 157–164. – М: ВАШ ФОРМАТ. – ISBN: 978-5-00147-399-2.
3. Захарычева А.П., Хижняк Т.В., Ельченинов А.Г. Новые экстремально гало(алкало)фильные гидролитические эвриархеи гиперсоленых озер // 3-й Российский микробиологический конгресс (г. Псков, 26 сентября - 1 октября 2021 г.): материалы конгресса. – 2021. – Стр. 185–186. – ООО «Конкорд». – ISBN: 978-5-6046553-7-5 (постерный доклад).
4. Захарычева А.П. Экстремально гало(алкало)фильные гидролитические эвриархеи гиперсоленых озер // Сборник тезисов ежегодной отчетной конференции аспирантов Федерального

государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук», 21-25 июня 2021.— Стр. 151–156. – М: ВАШ ФОРМАТ. – ISBN: 978-5-00147-303-9.

Zakharycheva Alisa Pavlovna
RESEARCH CENTRE OF BIOTECHNOLOGY RAS

NEW HYDROLYTIC PROKARYOTES FROM EXTREME HABITATS AND CHARACTERISATION OF THE NEW CELLULASE CELNB6

Abstract. *The study focused on the search and characterization of new extremophilic microorganisms and their enzymes, in particular, haloalkalophilic actinomycetes and archaea. Two new strains of haloalkalophilic actinomycetes, ACPA 22 and ACPA 39, isolated from soda solonchaks were characterized. These strains exhibit significant hydrolytic activity on various substrates and grow in a wide range of pH, salinity and temperature. Along with this, cellulase celNB6 from the extremely haloalkalophilic archaea Natronobiforma cellulositropha was studied. A bioinformatic analysis of its structure was performed, recombinant clones were created in Escherichia coli and Haloferax volcanii, and the main biochemical properties of the enzyme were investigated, including its activity, stability in various buffer systems, and resistance to denaturing agents. These results emphasize the potential of the studied actinomycetes and celNB6 for biotechnological applications under extreme conditions.*

Keywords: *hypersaline environment, actinomycetes, haloarchaea, hydrolytic enzymes, cellulase.*

Работа выполнена в рамках гранта РФФИ №20-14-00250.

Кривицкая Александра Вячеславовна
аспирант ФИЦ Биотехнологии РАН 4 года обучения
профиль 1.5.4 Биохимия
e-mail: al_krivickaya@mail.ru

Научный руководитель
Хренова Мария Григорьевна
доктор физико-математических наук, проф. РАН
в.н.с. группы молекулярного моделирования



МОЛЕКУЛЯРНОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ МЕХАНИЗМОВ ФЕРМЕНТАТИВНЫХ РЕАКЦИЙ, СВЯЗАННЫХ С БАКТЕРИАЛЬНОЙ РЕЗИСТЕНТНОСТЬЮ К β -ЛАКТАМНЫМ АНТИБИОТИКАМ

Аннотация. В работе установлены механизмы реакции гидролиза антибиотика имипенема металло- β -лактамазами L1 и NDM-1, и проведена интерпретация различного состава продуктов, наблюдаемая в эксперименте. Показано, что мутации в гене, кодирующем пенициллин-связывающий белок 2 из *Neisseria Gonorrhoeae*, влияют как на связывание цефтриаксона, так и на механизм его ацилирование, что объясняет экспериментально наблюдаемое изменение эффективного каталитического параметра k_2/K_S . Предложены уравнения, определяющие взаимосвязь рассчитываемых микроскопических параметров и экспериментально наблюдаемых свойств системы, для прогнозирования новых соединений: медленно гидролизующихся β -лактамных антибиотиков и более эффективных ингибиторов класса органических бороновых кислот металло- β -лактамазы NDM-1.

Ключевые слова: β -лактамные антибиотики, металло- β -лактамазы, пенициллин-связывающие белки, молекулярное моделирование, КМ/ММ.

В данной работе рассматриваются два механизма устойчивости к β -лактамным антибиотикам: гидролиз β -лактамных антибиотиков металло- β -лактамазами и появление аминокислотных замен в пенициллин-связывающем белке 2 (PBP2) из *Neisseria Gonorrhoeae*, которые ухудшают их ингибирование антибиотиком цефтриаксоном. Также в работе обсуждается поиск новых антибактериальных препаратов, основанный на анализе электронной плотности активного центра фермента.

Исследование механизма инактивации антибиотика имипенема в активных центрах металло- β -лактамаз L1 и NDM-1 показало, что наблюдаемый в экспериментальных исследованиях продукт гидролиза имипенема (R)-имин образуется не в активных центрах ферментов, а в результате таутомеризации из енамина в растворе [1]. В активном центре L1 в ходе реакции гидролиза имипенема образуется енамин, в NDM-1 преобладающим продуктом является енамин, однако может происходить конкурирующая реакция с большим энергетическим барьером, продуктом которой является (S)-имин. Также показано, что особенности протекания реакции в активных центрах данных ферментов определяются гибкостью активного центра.

Молекулярное моделирование механизма реакции ингибирования PBP2 из штаммов FA19, 35/02, H041 цефтриаксоном показало, что изменение положения субстрата в активном центре фермента, вызванное аминокислотной заменой Gly545Ser, отражается на формировании оксианионного центра и, как следствие, на механизме реакции. Высота энергетических барьеров пер-

вой стадии реакции увеличивается с ростом резистентности вследствие ухудшения активации цефтриаксона. Механизм реакции в мутантных PBP2 и из штамма дикого типа отличаются: разрыв связи C–N и отрыв фрагмента антибиотика происходит последовательно в белке из штамма дикого типа и одновременно в мутантных белках. Анализ конформационных изменений петли β_3 - β_4 , показал, что с ростом резистентности петля становится менее подвижной и плоской. Данные изменения в механизме реакции объясняют наблюдаемое в эксперименте уменьшение эффективного каталитического параметра k_2/K_S [2].

Для построения уравнения, связывающего экспериментальные константы скорости реакции и расчетные квантово-механические величины была выбрана хорошо изученная как экспериментально, так и теоретически реакция – гидролиз нитроцефина металло- β -лактамазой L1 [3]. Известно, что лимитирующей стадией реакции является протонирование интермедиата реакции – перенос протона с каталитического остатка на атом азота антибиотика через атом кислорода с сопутствующим разрывом координационной связи. Поэтому в первую очередь были рассмотрены расчетные энергетические барьеры данной стадии реакции для десяти антибиотиков цефалоспоринового ряда. Вычисленные энергетические барьеры лимитирующей стадии и значения экспериментальных каталитических констант не коррелируют друг с другом. Это связано с тем, что погрешность даже в 1 ккал/моль на энергетической шкале соответствует ошибке определения константы скорости в 5-6 раз. В связи с чем для анализа активного центра фермента был применен подход квантово-топологической теории атомов в молекулах, согласно которой межатомные взаимодействия характеризуют критические точки связи (КТС). В каждой из КТС были рассчитаны дескрипторы электронной плотности. Монотонные зависимости получены только между дескрипторами электронной плотности в КТС на линии водородной связи N...N структуры переходного состояния и каталитическими константами реакции гидролиза, наблюдаемыми в эксперименте. Установленная взаимосвязь может использоваться для предсказания константы скорости реакции гидролиза новых соединений цефалоспоринового ряда металло- β -лактамазой L1 при поиске новых негидролизующихся или медленно гидролизующихся антибиотиков. В работе также предложены модификации антибиотика цефокситина, способствующие снижению скорости его гидролиза.

Анализ связывания бензо[b]тиофен-2-бороновых кислот с NDM-1 показал, что реакция нуклеофильной атаки гидроксид-аниона на атом бора бензо[b]тиофенового ингибитора происходит самопроизвольно в результате связывания в активном центре фермента. Построено уравнение, связывающее экспериментальные параметры IC50 и параметры электронной плотности в КТС, расположенных на линиях координационных связей атомов кислорода тетраэдрического бороната с ионами цинка в активном центре NDM-1. На основе полученного уравнения были предложены пять новых структур ингибиторов. Среди них наиболее перспективными являются cpd14 и cpd15, для которых рассчитанные значения составляют IC50 40 мкМ и 47 мкМ соответственно. Однако и эти значения являются большими, чем уже известные экспериментально [4]. Следовательно, дальнейшего снижения значения IC50 можно добиться, изменив органическое ядро соединений.

Основные выводы:

1. В реакции гидролиза имипенема металло- β -лактамазами L1 и NDM-1 образуется енамин, который после выхода в раствор таутомеризуется в (R)-имин, наблюдаемый в эксперименте. В активном центре NDM-1 в качестве побочного продукта образуется (S)-имин, что обусловлено разным аминокислотным составом петли L10 металло- β -лактамаз L1 и NDM-1.
2. Аминокислотная замена Gly545Ser в PBP2 мутантных штаммов ухудшает связывание цефтриаксона, увеличивая константу диссоциации K_S , и ослабляет активацию субстрата, понижая

константу скорости ацилирования k_2 , что объясняет наблюдаемое уменьшение эффективного каталитического параметра k_2/K_s .

3. Определена взаимосвязь между наблюдаемым параметром k_{cat} и рассчитываемыми дескрипторами электронной плотности, характеризующими водородную связь N...H в структурах переходного состояния лимитирующей стадии реакции гидролиза цефалоспоринов металло- β -лактамазой L1, что можно использовать для оценки константы скорости реакции гидролиза новых соединений.
4. Устойчивые бензо[b]тиофен-2-боронаты формируются безбарьерно в активном центре NDM-1 в результате образования ковалентной связи с каталитическим гидроксид-анионом. Все рассмотренные ингибиторы этого ряда характеризуются величинами IC50 не ниже 30 μ M.

ЛИТЕРАТУРА

1. Lohans C.T., Freeman E.I., van Groesen E. Mechanistic Insights into β -Lactamase-Catalysed Carbapenem Degradation Through Product Characterisation // Scientific Reports. – 2019. – Vol. 9. – № 1. – P. 1-9.
2. Tomberg J., Unemo M., Davies C., Nicholas R. A. Molecular and structural analysis of mosaic variants of penicillin-binding protein 2 conferring decreased susceptibility to expanded-spectrum cephalosporins in *Neisseria gonorrhoeae*: Role of epistatic mutations // Biochemistry. – 2010. – Vol. 49. – № 37. – P. 8062-8070.
3. Wang Z., Fast W., Benkovic S. J. Direct observation of an enzyme-bound intermediate in the catalytic cycle of the metallo- β -lactamase from *Bacteroides fragilis* // Journal of the American Chemical Society. – 1998. – Vol. 120. – № 41. – P. 10788-10789.
4. Santucci M., Spyraakis F., Cross S. Computational and biological profile of boronic acids for the detection of bacterial serine- and metallo- β -lactamases // Scientific Reports. – 2017. – Vol. 7. – № 1. – P. 1-15.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ РАБОТЫ

Статьи в рецензируемых журналах:

1. Khrenova M.G., Krivitskaya A.V., Tsirelson V.G., The QM/MM-QTAIM approach reveals the nature of different reactivity of cephalosporins in the active site of L1 Metallo- β -Lactamase // New Journal of Chemistry. – 2019. – Vol. 43(19). – P. 7329-7338.
2. Krivitskaya A.V., Khrenova M.G. Boronic Acids as Prospective Inhibitors of Metallo- β -Lactamases: Efficient Chemical Reaction in the Enzymatic Active Site Revealed by Molecular Modeling // Molecules. – 2021. – Vol. 26(7). – P. 2026-2039.
3. Кривицкая А.В., Хренова М.Г. Молекулярное моделирование активации цефтриаксона в активных центрах пенициллин-связывающих белков 2 // Известия Академии наук. Серия химическая. – 2022. – Т. 71(5). – С. 915-920.
4. Krivitskaya A.V., Khrenova M.G. Interplay between the Enamine and Imine Forms of the Hydrolyzed Imipenem in the Active Sites of Metallo- β -lactamases and in Water Solution // Journal of Chemical Information and Modeling. – 2022. – Vol. 62(24). – P. 6519-6529.
5. Krivitskaya A.V., Khrenova M.G. Influence of the Active Site Flexibility on the Efficiency of Substrate Activation in the Active Sites of Bi-Zinc Metallo- β -Lactamases // Molecules. – 2022. – Vol. 27(20). – P. 7031-7043.
6. Krivitskaya A.V., Khrenova M.G. Evolution of Ceftriaxone Resistance of Penicillin-Binding Proteins 2 Revealed by Molecular Modeling // International Journal of Molecular Sciences. – 2023. – Vol. 24(1). – P. 176-188.

Тезисы докладов:

1. Кривицкая А.В. Механизмы реакции гидролиза имипенема металло-бета-лактамазами L1 и NDM-1. IX Всероссийская научная молодежная школа-конференция «Химия, физика, биология: пути интеграции», Москва (20-22 апреля 2022 г.).
2. Кривицкая А.В., Хренова М.Г. Механизм ингибирования пенициллин-связывающего белка 2 из штаммов FA19, 35/02 и H041 *Neisseria gonorrhoeae* цефтриаксоном. XXXV Зимняя молодёжная научная школа «ПЕРСПЕКТИВНЫЕ НАПРАВЛЕНИЯ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКОЙ БИОЛОГИИ И БИОТЕХНОЛОГИИ», Москва (7-10 февраля 2023 г.).
3. Кривицкая А.В., Хренова М.Г. Молекулярные механизмы антибиотикорезистентности, связанные с гидролизом β -лактамов антибиотиков. VII Съезд биофизиков России, Краснодар (17-23 апреля 2023).
4. Кривицкая А.В. Саммит разработчиков лекарственных препаратов «Сириус.БИОТЕХ», университет «Сириус», Сочи (11-13 мая 2023 г.).
5. Кривицкая А.В. Определение скорости инактивации цефалоспориновых антибиотиков металло-бета-лактамазами из квантово-химических моделей. 13-я Международная научная конференция «БИОКАТАЛИЗ. ФУНДАМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ И ПРИМЕНЕНИЯ» (БИОКАТАЛИЗ - 2023), Суздаль (25-29 июня 2023 г.).
6. Кривицкая А.В., Хренова М.Г. Уравнение структура-свойство для определения скорости инактивации цефалоспориновых антибиотиков металло-бета-лактамазой L1. I Междисциплинарная всероссийская молодежная научная школа-конференция с международным участием «Молекулярный дизайн биологически активных веществ: биохимические и медицинские аспекты», Казань (18-22 сентября 2023 г.).

Krivitskaia Aleksandra Vyacheslavovna
RESEARCH CENTER OF BIOTECHNOLOGY RAS

MOLECULAR MODELING OF FERMENTATIVE REACTIONS MECHANISMS RELATED TO BACTERIAL RESISTANCE TO β LACTAM ANTIBIOTICS

Abstract. *In this study, the reaction mechanisms of hydrolysis of the antibiotic imipenem by metallo- β -lactamases L1 and NDM-1 were established, and the different composition of the products observed in the experiment was interpreted. It was shown that mutations in the gene encoding penicillin-binding protein 2 from *Neisseria Gonorrhoeae* affect both the binding of ceftriaxone and the mechanism of its acylation, which explains the experimentally observed change in the effective catalytic parameter k_2/K_s . Equations defining the relationship between calculated microscopic parameters and experimentally observed properties of the system are proposed for the prediction of new compounds: slowly hydrolyzed β -lactam antibiotics and more effective benzo[b]thiophen boronic acids inhibitors of metallo- β -lactamase NDM-1.*

Keywords: *β -lactam antibiotics, metallo- β -lactamases, penicillin-binding proteins, molecular modeling, QM/MM.*

Мальцева Анастасия Игоревна

аспирант ФИЦ Биотехнологии РАН 4 года обучения

профиль 1.5.11 Микробиология

e-mail: an.malts@mail.ru

Научный руководитель

Фролов Евгений Николаевич

кандидат биологических наук

зав. лабораторией метаболизма экстремофильных прокариот



ИЗУЧЕНИЕ РАЗНООБРАЗИЯ ПУТЕЙ АВТОТРОФНОЙ АССИМИЛЯЦИИ УГЛЕРОДА У ТЕРМОФИЛЬНЫХ ПРОКАРИОТ

Аннотация. Исследован механизм автотрофии и влияние факторов среды (температура, pH, парциальное давление газов и окислительно-восстановительный потенциал (ОВП)) на вклад трансальдозного варианта цикла Кальвина и пути Вуда-Льюнгдаля в общую ассимиляцию углекислоты у *Desulfothermobacter acidiphilus* 3408-1T. Выделены новые термофильные изоляты и дана физиологическая и филогенетическая характеристика штаммов 3907-1M, 3462-1 и 4217-1. Штамм 3907-1M и 3462-1 являются новыми представителями рода *Thermodesulfovibrio*, штамм 4217-1 являющегося третьим представителем филума *Thermodesulfobiota*. Было проанализировано микробное сообщество осадков и воды (отдельно) кислого горячего источника № 4229 (кальдера Узон, Камчатка).

Ключевые слова: автотрофия, трансальдозный вариант цикла Кальвина, путь Вуда-Льюнгдаля, *Desulfothermobacter acidiphilus*, *Thermodesulfovibrio*, *Thermodesulfobium*.

Ассимиляция неорганического углерода автотрофными организмами является важнейшей стадией цикла углерода. Начиная с 50-х гг. прошлого века и до настоящего времени было описано 8 путей фиксации CO₂ [1-3]. Поскольку термофильные микроорганизмы обладают наибольшим разнообразием биохимических механизмов, это делает их перспективными объектами для поиска новых автотрофных путей. Целью данной работы является исследование разнообразия механизмов автотрофной фиксации CO₂ у термофильных прокариот, в том числе поиск и изучение новых механизмов ассимиляции CO₂, выявление модификаций уже известных путей автотрофной ассимиляции CO₂, и исследование эволюции процессов первичной продукции органического вещества, играющих важнейшую роль в развитии и существовании жизни на нашей планете.

Был исследован механизм автотрофии у термоацидофильной факультативно автотрофной сульфатредуцирующей бактерии *Desulfothermobacter acidiphilus* 3408-1. В хемолитоавтотрофных условиях в присутствии водорода в качестве донора электронов и сульфата в качестве акцептора электронов была получена кривая роста *D. acidiphilus* 3408-1, а анализ генома позволил выявить гены кодирующие все ферменты сразу двух путей фиксации CO₂ – трансальдозного варианта цикла Кальвина (ТЦК) и пути Вуда-Льюнгдаля (ПВЛ), что является крайне редким явлением. На основании протеомного анализа было показано одновременное функционирование двух путей при автотрофном росте, а биохимический анализ подтвердил функционирование именно ТЦК, а не классического варианта цикла Кальвина.

Далее нами было выдвинуто предположение о том, что вклад каждого пути в общую ассимиляцию углекислоты может зависеть от таких значимых внешних факторов среды,

как температура, pH, парциальное давление газов и окислительно-восстановительный потенциал среды (ОВП). При изменении температуры культивирования в ходе протеомного анализа было показано, что значительного изменения экспрессии ключевых генов белков ПВЛ не происходило. Для ферментов цикла Кальвина изменение температуры оказывало влияние на экспрессию генов тех ферментов цикла, которые также принимают участие в центральном метаболизме углеводов, но не на экспрессию гена ключевого фермента цикла – РубисКО. Исследование протеомов, полученных при культивировании бактерии в условиях пониженного парциального давления водорода в газовой фазе и соответствующего увеличенного окислительно-восстановительного потенциала показало, что в случае ТЦК наблюдалось увеличение экспрессии генов, кодирующих ключевые ферменты данного автотрофного пути, а следовательно увеличению вклада цикла Кальвина в общую ассимиляцию углекислоты. В то время как достоверного изменения экспрессии генов, кодирующих белки ПВЛ, не происходило.

При понижении значения pH ключевые гены ферментов ТЦК оказались up-regulated, однако представленность кодируемых ими белков в протеоме менялась незначительно. Экспрессия других генов, входящих в генный кластер *cbbL* ТЦК достоверно не изменялась. Для генов ферментов ПВЛ при росте микроорганизма в условиях кислого pH показано, что некоторые гены относились к числу up-regulated, однако ген ключевого гена фермента – СО-дегидрогеназы, относился к числу down-regulated.

Из 13 чистых культур термофильных автотрофных микроорганизмов, выделенных из проб термальных источников полуострова Камчатка и Кунашир, три штамма представляли наибольший интерес. Так, штамм 3907-1М по последовательности гена 16S рРНК и средней идентичности нуклеотидных последовательностей (ANI) является новым видом рода *Thermodesulfovibrio*, и что особенно интересно, первым его автотрофным представителем за счет функционирования ТЦК. Штамм 3462-1 является ближайшим родственником штамма 3907-1М, но в отличие от него утратившим способность к автотрофному росту за счет наличия стоп-кодонов в генах ключевых генов ферментов ТЦК. Штамм 4217-1 – третий представитель нового филума *Thermodesulfobiota* [4], растущий автотрофно за счет функционирования ТЦК. Штамм 3827-6 по последовательности гена 16S рРНК на 99,5% схож с *Pyrobaculum ferrireducens*, однако, он значительно отличается от типового штамма по своим фенотипическим признакам.

Для кислого горячего источника 4229 показано отличие в составе микробного сообщества воды и осадка. В осадках доминируют такие некультивируемые глубокие филогенетические линии гетеротрофных архей как ARK-15 (*Thermoplasmatota*) и ‘Ca. Marsarchaeales’ (*Thermoproteota*), в то время как микробное сообщество термальных вод представлено термоацидофильными, (микро)аэробными, хемолитоавтотрофными, водород- и сероокисляющими бактериями родов *Hydrogenobaculum* (*Aquificota*) и *Acidithiobacillus* (*Pseudomonadota*).

Основные выводы:

Выделены и охарактеризованы новые термофильные автотрофные микроорганизмы, среди которых, два штамма являются представителями новых видов *Thermodesulfovibrio autotrophicus* (штамм 3907-1М) и *Thermodesulfobium autotrophicus* (штамм 4217-1). Определены последовательности полных геномов *Thermodesulfovibrio autotrophicus* 3907-1М, *Thermodesulfovibrio obliviosus* 3462-1, *Thermodesulfobium autotrophicus* 4217-1, *Pyrobaculum* sp. 3827-6 и *Desulfothermobacter acidiphilus* 3408-1Т. Впервые показано наличие трансальдозазного цикла Кальвина для представителей филума Nitrospirota. В ходе протеомных и биохимических исследований, на примере *Desulfothermobacter acidiphilus* 3408-1^T, впервые доказано одновременное функционирование двух путей ассимиляции углекислоты – трансальдозазного варианта цикла Кальвина и пути

Вуда-Льонгдала. Установлено, что температура и pH не оказывают значительного влияния на выбор автотрофного пути, в то время как снижение парциального давления водорода и рост окислительно-восстановительного потенциала среды приводят к увеличению вклада трансальдозного варианта цикла Кальвина в общую ассимиляцию углекислоты. Для кислого термального источника 4229 показано, что микробное сообщество осадков принципиально отличается от микробного сообщества воды.

ЛИТЕРАТУРА

1. Berg I. A. Ecological aspects of the distribution of different autotrophic CO₂ fixation pathways // Applied and Environment Microbiology. – 2011. – Vol. 77. – P. 1925-36.
2. Nunoura T., Chikaraishi Y., Izaki R., Suwa T., Sato T., Harada T., Mori K., Kato Y., Miyazaki M., Shimamura S., Yanagawa K., Shuto A., Ohkouchi N., Fujita N., Takaki Y., Atomi H., Takai K. A primordial and reversible TCA cycle in a facultatively chemolithoautotrophic thermophile // Science. – 2018. – Vol. 359. – P. 559-563.
3. Song Y., Lee J.S., Shin J., Lee G.M., Jin S., Kang S., Lee J.K., Kim D.R., Lee E.Y., Kim S.C., Cho S., Kim D., Cho B.K. Functional cooperation of the glycine synthase-reductase and Wood-Ljungdahl pathways for autotrophic growth of *Clostridium drakei* // Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A.– 2020. Vol. – 117. – P. 7516-7523.
4. Frolov E.N., Lebedinsky A.V., Elcheninov A.G., Kublanov I.V. Taxonomic proposal for a deep branching bacterial phylogenetic lineage: transfer of the family Thermodesulfobiaceae to Thermodesulfobiales ord. nov., Thermodesulfobiia classis nov. and Thermodesulfobiota phyl. nov // Syst Appl. Microbiol. – 2023. – Vol. 46(1). – P. 126388.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ РАБОТЫ

Статьи в рецензируемых журналах:

1. Frolov E.N., Maltseva A.I., Elcheninov A.G., Kublanov I.V. Draft Genome Sequence of *Pyrobaculum* sp. strain 3827-6, a Hyperthermophilic Crenarchaeon, Isolated from a Kamchatka Hot Spring // Microbiol Resour Announc. – 2023. – Vol. 12(1). – :e0115922.
2. Maltseva A.I., Klyukina A.A., Elcheninov A.G., Pimenov N.V., Rusanov I.I., Kublanov I.V., Kochetkova T.V., Frolov E.N. Water and Sediments of an Acidic Hot Spring—Distinct Differentiation with Regard to the Microbial Community Composition and Functions // Water. – 2023. – Vol. 15. – P. 3415.

Тезисы докладов:

1. Мальцева А.И. Изучение разнообразия путей автотрофной ассимиляции углерода у термофильных прокариот // Отчетная конференция аспирантов, Москва (Россия), 21-25 июня 2021 г.: сборник тезисов ежегодной отчетной конференции аспирантов федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук», Москва, 2021. С. 157. (Устный доклад)
2. Мальцева А.И., Лебединский А.В., Кубланов И.В., Фролов Е.Н. Первый автотрофный представитель рода *Thermodesulfobivibrio* // 3-й Российский Микробиологический конгресс, Псков (Россия), 26 сентября - 1 октября 2021 г.: материалы конгресса, Псков, 2021. С. 227. (Стендовый доклад)
3. Фролов Е.Н., Мальцева А.И., Черных Н.А., Лебединский А.В., Кубланов И.В. Распространение трансальдозного варианта цикла Кальвина у термофильных прокариот // 3-й Россий-

ский Микробиологический конгресс, Псков (Россия), 26 сентября - 1 октября 2021 г.: материалы конгресса, Псков, 2021. С. 82. (Устный доклад)

4. Фролов Е.Н., Мальцева А.И., Гололобова А.В., Лебединский А.В., Кубланов И.В. Сульфатредуцирующие прокариоты термальных источников Курило-Камчатской зоны // Механизмы адаптации микроорганизмов к различным условиям среды обитания, Иркутск (Россия), 26 февраля – 6 марта 2021 г.: материалы второй всероссийской конференции с международным участием, Иркутск, 2021. С. 98. (Устный доклад)
5. Мальцева А.И. Изучение разнообразия путей автотрофной ассимиляции углерода у термофильных прокариот // Отчетная конференция аспирантов, Москва (Россия), 23-30 июня 2022 г.: сборник тезисов ежегодной отчетной конференции аспирантов федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук», Москва, 2022. С. 165. (Устный доклад)
6. Мальцева А.И., Ельченинов А.Г., Кубланов И.В., Фролов Е.Н. Одновременное функционирование двух путей автотрофной ассимиляции углерода у термофильной бактерии *Desulfothermobacter acidiphilus* // Актуальные аспекты современной микробиологии, Москва (Россия), 16-18 ноября 2022 г.: материалы XIII молодежной школы-конференции с международным участием, Москва, 2022. С. 160. (Стендовый доклад)
7. Мальцева А.И. Изучение разнообразия путей автотрофной ассимиляции углерода у термофильных прокариот // Отчетная конференция аспирантов федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук», Москва (Россия), 19-21 июня 2023 г. (Устный доклад)
8. Мальцева А.И., Кубланов И.В., Фролов Е.Н. Изменение механизма автотрофной фиксации углекислоты термофильной бактерии *Desulfothermobacter acidiphilus* в зависимости от внешних факторов. 4-й Российский Микробиологический конгресс, Томск (Россия), 24–29 сентября 2023 г. (Устный доклад)

Основные достижения, патенты:

1. Диплом второй степени за лучший стендовый доклад на XIII Молодежной школе-конференции с международным участием «Актуальные аспекты современной микробиологии», 2022 г.
2. Первое место в конкурсе статей молодых ученых Межрегионального Микробиологического Общества, 2023 г.

Maltseva Anastasia Igorevna
FEDERAL RESEARCH CENTRE OF BIOTECHNOLOGY

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

Abstract. *The mechanism of autotrophy and the influence of environmental factors (temperature, pH, partial pressure of gases, and redox potential (ORP)) on the contribution of the transaldolase variant of the Calvin cycle and the Wood-Ljungdahl pathway to total carbon dioxide assimilation in *Desulfothermobacter acidiphilus* 3408-1T were investigated. New thermophilic isolates were isolated and physiological and phylogenetic characterization of strains 3907-1M, 3462-1, and 4217-1 was*

performed. Strain 3907-1M and 3462-1 are new representatives of the genus Thermodesulfovibrio, strain 4217-1 is the third representative of the phylum. The microbial community of sediments and water (separately) of acidic hot spring № 4229 (Uzon caldera, Kamchatka) was analyzed.

Keywords: *autotrophy, transaldolase variant of the Calvin cycle, Wood-Ljungdahl pathway, Desulfothermobacter acidiphilus, Thermodesulfovibrio, Thermodesulfobium.*

*Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ 20-54-12031 НННО_а
(протеомный анализ) и при поддержке Совета по грантам
Президента Российской Федерации, проект МК-2776.2021.1.4
(выделение и описание штамма 4217-1).*

Нежданова Анна Владимировна

аспирант ФИЦ Биотехнологии РАН 4 года обучения

профиль 1.5.6 Биотехнология

e-mail: anna-negdanova@mail.ru

Научный руководитель

Щенникова Анна Владимировна

кандидат химических наук,

с.н.с. лаборатории системной биологии растений



**ЭФФЕКТЫ ГЕТЕРОЛОГИЧНОЙ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ
ТРАНСКРИПЦИОННЫХ ФАКТОРОВ (MADS-box, YABBY)
И РЕДАКТИРОВАНИЯ ГЕНОВ МЕТАБОЛИЗМА (PHO1a, PDS)
НА ОСОБЕННОСТИ РЕГУЛЯЦИИ ОНТОГЕНЕЗА
Nicotiana tabacum и *Solanum tuberosum***

Аннотация. Транскрипционным факторам MADS-box и YABBY принадлежат ключевые роли в регуляции роста, развития и адаптации растений. Настоящая работа посвящена характеристике генов MADS-box и YABBY у различных видов растений. Структурно-филогенетический анализ распределил гены по подсемействам, что позволило предположить их функции. Анализ индивидуальной или комбинированной сверхэкспрессии отобранных генов MADS-box и YABBY в растениях табака показал, что YABBY-гены подсемейства FILAMENTOUS FLOWER могут определять асимметричное развитие латеральных органов растения, а MADS-box гены – идентичность репродуктивных меристем и органов цветка. Анализ растений табака и картофеля с нарушением метаболизма крахмала или каротиноидов (мутация или нокаут отдельных генов путей) продемонстрировал участие MADS-box генов в стрессовом ответе растений.

Ключевые слова: онтогенез и адаптивность растений; транскрипционные факторы; семейства MADS- и YABBY-доменных ТФ; сверхэкспрессия генов; нокаут генов; трансгенные растения.

Транскрипционным факторам (ТФ) MADS-box и YABBY принадлежат ключевые роли в регуляции роста, развития, стрессового ответа и доместикации растений. Эволюционная дупликация и неофункционализация генов MADS-box и YABBY считается одной из главных причин возникновения репродуктивной системы и морфологического разнообразия растений (Smacznik et al., 2012). ТФ семейства MADS-box участвуют в регуляции путей метаболизма, включая биосинтез и деградацию углеводов и каротиноидов (Castelán-Muñoz et al., 2019). У сельскохозяйственных культур с активностью генов YABBY и MADS-box связывают регуляцию хозяйственно ценных признаков (Smacznik et al., 2012; Castelán-Muñoz et al., 2019). Таким образом, результаты квалификационной работы имеют перспективы использования в селекции агрокультур, направленной на улучшение качества урожая.

Объектами научно-квалификационной работы стали гены семейств MADS-box и YABBY отдельных видов Пасленовых, Астровых и Вересковых.

Цель работы заключалась в определении возможных функций исследуемых генов в онтогенезе и стрессовом ответе растения.

Для реализации цели были поставлены следующие задачи:

1. Провести структурно-филогенетическую характеристику ТФ семейств *MADS-box* и *YABBY* у исследуемых видов Пасленовых, Астровых и Вересковых.
2. Получить и охарактеризовать трансгенные растения табака с индивидуальной и комбинированной сверхэкспрессией генов *MADS-box*, а также со сверхэкспрессией генов *YABBY*.
3. Получить и охарактеризовать на предмет изменения активности генов *MADS-box* трансгенные растения табака или картофеля с редактированной последовательностью генов пути метаболизма каротиноидов или крахмала.

В результате проведенной работы была охарактеризована филогения семейств генов, кодирующих ТФ *MADS-box* и *YABBY* хризантемы, подсолнечника, томата, картофеля, табака и подбелника в сравнении с генами модельного вида *Arabidopsis thaliana*. Было определено, к каким консервативным подсемействам относятся исследуемые гены, на основе чего были сделаны предположения об их функциях в растении и отобраны гены для дальнейшего изучения на основании степени значимости их возможного участия в репродуктивном развитии. Целевыми стали *MADS-box* гены В-, С- и Е-активности, которые могут иметь роль в спецификации различных органов цветка, а также *YABBY* гены подсемейства *FILAMENTOUS FLOWER*, которые могут определять асимметрию боковых органов растения.

Далее был осуществлен анализ влияния сверхэкспрессии отобранных генов *MADS-box* и *YABBY* на онтогенез трансгенных растений табака. В случае генов *MADS-box* были охарактеризованы растения со сверхэкспрессией как индивидуальных генов, так и их комбинаций. На основе полученных данных было выявлено, что *MADS-box* гены могут отвечать за идентичность лепестков/тычинок (В-гены *CDM86* и *CDM115* хризантемы), пестика/семязачатков (С-гены *CDM37* (хризантема), *HAM45* и *HAM59* (подсолнечник)) и лепестков/гинецея (Е-гены *CDM44* (хризантема) и *SIMADS5* (томат)). Гены, гомологичные *FILAMENTOUS FLOWER* (*MhyFIL1*, *MhyFIL3* (подбелник) и *CDM51* (хризантема)), могут участвовать в определении идентичности клеток абаксиальных поверхностей наземных боковых органов растения. Полученные данные являются подтверждением консервативности процессов онтогенеза у видов высших растений, несмотря на морфологические различия.

Следующим этапом стало получение трансгенных растений табака и картофеля с редактированной (CRISPR-Cas9) последовательностью гена пластидной крахмалфосфорилазы *PHO1a*, которая является уникальным ферментом, важным и для деградации, и для синтеза крахмала. Также, были получены трансгенные растения табака с нокаутом гена *PDS*, кодирующего фитоиндесатуразу – второй фермент в пути биосинтеза каротиноидов. Таким образом, были получены растения с измененным содержанием углеводов или каротиноидов. В обоих случаях растение испытывает стресс, так как и углеводы, и каротиноиды являются метаболитами, с помощью которых растение нейтрализует воздействие неблагоприятных факторов.

Изучение полученных отредактированных растений показало, что нокаут целевых генов приводит к таким нарушениям, как изменение гравитропизма корней, архитектуры надземной части и содержания крахмала (*PHO1a*), а также содержания хлорофиллов и каротиноидов (*PHO1a*, *PDS*), в том числе при воздействии низких положительных температур. Анализ экспрессии генов *MADS-box* подсемейств *SEP* и *FUL* (как генов, экспрессирующихся в норме и в вегетативной, и в репродуктивной части растения) выявил изменение уровня их транскриптов в сравнении с контролем, в том числе в ответ на холодовой стресс. Таким образом, было продемонстрировано, что *MADS-box* гены могут участвовать в стрессовых реакциях растения путем регуляции транскрипции генов метаболизма углеводов и каротиноидов, и, следовательно, определять степень стрессоустойчивости растения.

Основные выводы:

1. *YABBY*-гены подсемейства *FILAMENTOUS FLOWER* хризантемы и подбельника участвуют в определении идентичности клеток абаксиальных поверхностей наземных боковых органов растения.
2. *MADS-box* гены В-активности хризантемы участвуют в определении идентичности лепестков и тычинок цветка.
3. *MADS-box* гены С-активности Астровых (хризантема, подсолнечник) участвуют в инициации развития меристемы цветка и органов гинецея.
4. *MADS-box* гены Е-активности хризантемы и томата участвуют в спецификации лепестков и гинецея.
5. *MADS-box* гены подсемейств *SEP* и *FUL* дифференциально экспрессируются в ответ на изменение метаболизма углеводов или каротиноидов и пониженные температуры и могут быть участниками стрессового ответа растений.

ЛИТЕРАТУРА

1. Castelán-Muñoz N., Herrera J., Cajero-Sánchez W., et al. MADS-box genes are key components of genetic regulatory networks involved in abiotic stress and plastic developmental responses in plants //Frontiers in Plant Science. – 2019. – Т. 10. – С. 853.
2. Smaczniak C., Immink R. G. H., Angenent G. C., Kaufmann K. Developmental and evolutionary diversity of plant MADS-domain factors: insights from recent studies //Development. – 2012. – Т. 139. – №. 17. – С. 3081-3098.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ РАБОТЫ

Статьи в рецензируемых журналах:

1. Щенникова А. В., Камионская, А. М., Нежданова, А. В., и др. Факторы транскрипции MhyFIL1 и MhyFIL3 (*Monotropa hypopitys*) определяют асимметричное развитие боковых органов надземной части растения //Вавиловский журнал генетики и селекции. – 2019. – Т. 23. – №. 4. – С. 405-411.
2. Нежданова А. В., Слугина М. А., Дьяченко Е. А., и др. Структурно-функциональный анализ MADS-box гена SIMADS5 томата *Solanum lycopersicum* L //Вавиловский журнал генетики и селекции. – 2021. – Т. 25. – №. 5. – С. 492-501.
3. Нежданова А. В., Щенникова А. В. Факторы транскрипции семейства MADS растений: связь с признаками доместикации и перспективы для селекции //Сельскохозяйственная биология. – 2021. – Т. 56. – №. 5. – С. 823-842.
4. Nezhdanova A. V., Efremov G. I., Slugina M. A., et al. Effect of a Radical Mutation in Plastidic Starch Phosphorylase PHO1a on Potato Growth and Cold Stress Response //Horticulturae. – 2022. – Т. 8. – №. 8. – С. 730.
5. Нежданова А. В., Слугина М. А., Кулакова А. В., и др. Влияние мозаичного нокаутирования гена фитоиндесатуразы NtPDS на биосинтез каротиноидов у *Nicotiana tabacum* L //Физиология растений. – 2023. – Т. 70. – №. 6. – С. 601-611.

Тезисы докладов:

1. Нежданова А. В., Щенникова А. В., Скрыбин К. Г. YABBY-гены полярного развития листьев, сохранили свою функцию у растения без листьев – микогетеротрофа *Monotropa hypopitys* // Биотехнология в растениеводстве, животноводстве и сельскохозяйственной микробиологии. – 2019. – С. 50-51. (постерный доклад).

2. Nezhdanova A. V., Shchennikova A. V., Kamionskaya A. M. Characteristics of transgenic *Nicotiana tabacum* plants with ectopic expression of chrysanthemum MADS-box genes //Innovative in Agriculture. – 2019. – С. 82-83. (устный доклад).
3. Нежданова А. В., Камионская А. М., Щенникова А. В. Совместная сверхэкспрессия генов хризантемы CDM86, CDM115 и CDM37 изменяет идентичность всех органов цветка и снижает фертильность табака //Актуальная биотехнология. – 2019. – №. 3. – С. 69-71. (устный доклад).
4. Нежданова А. В., Камионская А.М., Слугина М. А., и др. Получение растений табака с редактированным геномом: оценка влияния выключения активности гена фитоен-десатуразы на развитие растения //Биотехнология: состояние и перспективы развития. – 2020. – С. 346-349. (постерный доклад).
5. Нежданова А. В., Камионская А. М., Щенникова А. В. Суперэкспрессия гена хризантемы CDM44 повышает устойчивость растений табака к пониженным температурам //Актуальная биотехнология. – 2020. – №. 3. – С. 193-194. (постерный доклад).
6. Slugina M., Nezhdanova A., Dyachenko E., Shchennikova A. Constitutive expression of tomato TF LeMADS5 gene in tobacco plants alters flower morphology //FEBS Open Bio. – 2021. (постерный доклад).
7. Nezhdanova A. V., Slugina M. A., Dyachenko E. A., et al. Functional analysis of *Solanum lycopersicum* L. MADS-box gene *SIMADS5* //Plant Genetics, Genomics, Bioinformatics, and Biotechnology. – 2021. – С. 156-156. (постерный доклад).
8. Нежданова А. В., Слугина М. А., Ефремов Г. И., и др. Получение растений картофеля с редактированным геномом и измененным метаболизмом крахмала. //Биотехнология: состояние и перспективы развития. – 2021. – С. 363-365. (постерный доклад).
9. Нежданова А. В., Щенникова А. В. Влияние отредактированной пластидной крахмалфосфорилазы PHO1a на развитие и стрессовый ответ растений картофеля //Актуальная биотехнология. – 2022. – №. 1. – С. 63-65. (устный доклад).
10. Нежданова А. В., Ефремов Г. И., Кочиева Е. З., и др. Получение отредактированных растений картофеля с измененным метаболизмом сахарозы //Международный конгресс» Биотехнология: состояние и перспективы развития». – 2022. – С. 223-224. (постерный доклад).
11. Нежданова А.В., Щенникова А.В. CRISPR/Cas9 нокаут гена фитоиндесатуразы PDS в геноме табака *Nicotiana tabacum* L. блокирует биосинтез каротиноидов в листьях //Сборник тезисов 26-ой Пущинской школы-конференции молодых ученых с международным участием «Биология – наука XXI века». Пущино: ФИЦ ПНЦБИ РАН. – 2023. – С. 298-299. (постерный доклад, диплом за лучший постерный доклад).
12. Нежданова А.В., Щенникова А.В. Получение растений табака *Nicotiana tabacum* L. с редактированным геном крахмал-фосфорилазы PHO1a //X Съезд общества физиологов растений России Всероссийская научная конференция с международным участием ТЕЗИСЫ ДОКЛАДОВ; – 2023. – С. 267-267. (заочное участие).
13. Кочиева Е.З., Слугина М.А., Нежданова А.В., Эффект CRISPR/Cas9 редактирования пластидной крахмалфосфорилазы PHO1a у сортов картофеля *Solanum tuberosum* L. //Гены и клетки. – 2023. – Т.XVIII – С. 20-21. (устный доклад).

**THEME EFFECTS OF HETEROLOGOUS EXPRESSION
OF TRANSCRIPTION FACTOR GENES (MADS-box, YABBY) AND EDITING
OF METABOLIC GENES (PHO1a, PDS) ON THE ONTOGENY
OF *Nicotiana tabacum* and *Solanum tuberosum***

Abstract. *The MADS-box and YABBY transcription factors play key roles in the regulation of plant growth, development and adaptation. This work was focused on the characterization of the MADS-box and YABBY genes in various plant species. Structural-phylogenetic analysis distributed the genes into subfamilies, which made it possible to suggest their functions. Analysis of individual or combined overexpression of selected MADS-box and YABBY genes in tobacco plants showed that YABBY genes of the FILAMENTOUS FLOWER subfamily may determine the asymmetric development of plant lateral organs, and MADS-box genes may specify the identity of reproductive meristems and floral organs. Analysis of tobacco and potato plants with changed starch or carotenoid metabolism (mutation or knockout of individual pathway genes) demonstrated the involvement of MADS-box genes in the stress response of plants.*

Keywords: *ontogeny and adaptability of plants; transcription factors; MADS- and YABBY-domain TFs families; gene overexpression; gene knockout; transgenic plants.*

Соловьева Анастасия Юрьевна
аспирант ФИЦ Биотехнологии РАН 4 года обучения
профиль 1.5.4 Биохимия
e-mail: nastya.soloveva1@yandex.ru

Научный руководитель
Тихонова Тамара Викторовна
кандидат химических наук,
с.н.с. лаборатории инженерной энзимологии



АКТИВАЦИЯ И ИЗУЧЕНИЕ КАТАЛИТИЧЕСКИХ СВОЙСТВ ТИОЦИАНАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ ИЗ ГАЛОАЛКАЛОФИЛЬНОЙ БАКТЕРИИ THIOALKALIVIBRIO PARADOXUS

Аннотация. В работе проведено изучение активации медь-содержащего фермента – тиоцианатдегидрогеназы (TcDH). Согласно полученным результатам два иона меди встраиваются в активный центр TcDH в степени окисления +2, а третий – в степени окисления +1. Определены константы диссоциации (K_d) комплексов TcDH-Cu: $7,0 \pm 2,2$ нМ и $1,9 \pm 0,5$ мкМ. Для активированного TcDH найдены эффективные ингибиторы: амитрол, цианид, цианат и тиомочевина. Охарактеризованы два медь-связывающих белка – CopC и MRP, которые могут выполнять функцию переносчиков ионов меди в активный центр TcDH в клетке, а также два потенциальных физиологических акцептора электронов в реакции окисления тиоцианата – цитохромы C552 и C546/556.

Ключевые слова: тиоцианатдегидрогеназа, медь, активация ферментов, медь-связывающий белок, CopC, MRP, цитохром C552, цитохром C546/556.

Медь – один из наиболее распространенных и важных переходных металлов в живых организмах, входящий в состав ферментов как кофактор. Основная проблема биосинтеза медь-содержащих ферментов связана с высокой токсичностью свободной меди. Живые организмы создали разнообразные системы связывания и безопасной доставки ионов меди к целевым медным ферментам и удаления избыточной меди.

Фермент тиоцианатдегидрогеназа (TcDH) в активном центре содержит три иона меди, которые обеспечивают окислительное разложение тиоцианата до цианата и серы с образованием двух электронов, которые передаются на внешний акцептор [1]. Для TcDH было изучено встраивание ионов меди в активный центр, приводящее к активации фермента, а также проведен поиск белков, которые могут участвовать в этом процессе в физиологических условиях. Другим направлением исследования было изучение каталитических свойств активированного TcDH, а именно поиск ингибиторов и поиск акцепторов электронов.

Согласно результатам работы, два иона меди встраиваются в активный центр в окисленном состоянии +2, а третий – в восстановленном +1. Медь-связывающие сайты TcDH обладают разным сродством к ионам меди. K_d комплексов TcDH-Cu составили $7,0 \pm 2,2$ нМ и $1,9 \pm 0,5$ мкМ. Ионы Zn^{2+} и Ni^{2+} могут заместить один ион меди в активном центре, что приводит к инактивации TcDH.

Охарактеризовано взаимодействие TcDH с рядом конкурентных ингибиторов, таких как продукт реакции – CNO^- ($K_i = 0,7$ мМ), а также CN^- и амитрол с константами ингибирования 1,6 мкМ

и 20 мкМ. Еще один эффективный ингибитор - тиомочевина имеет смешанный механизм ингибирования с $K_i = 0,6$ мМ, $K_i' = 2$ мМ.

В качестве потенциальных металлошаперонов, которые могут участвовать во встраивании ионов меди в активный центр TcDH, нами были рассмотрены два белка CopC и MRP (Met-Rich Protein), гены которых располагаются рядом с геном *tcdh*. Периплазматический белок CopC связывает 1 ион Cu^{2+} на субъединицу с K_d равной $1,80 \pm 0,36$ и способен переносить его в активный центр TcDH. Периплазматический домен мембранного белка MRP, способен связывать 3 иона Cu^{2+} . K_d для комплекса MRP- Cu^{2+} равна $8,9 \pm 1,1$ мкМ.

В качестве потенциального физиологического акцептора электронов в катализируемой TcDH реакции окисления тиоцианата был охарактеризован одnogемовый цитохром C552, ген которого располагается рядом с геном *tcdh*, а уровень его экспрессии повышался при росте на тиоцианате параллельно с ростом уровня экспрессии TcDH. Показано, что цитохром C552 восстанавливается в ходе каталитического окисления тиоцианата TcDH *in vitro*, TcDH и C552 образуют комплекс с $K_d = 0,85 \pm 0,25$ мкМ. Смоделирован предполагаемый путь переноса электрона от иона меди TcDH к гему C552. Охарактеризован соочищавшийся с TcDH цитохром C546/556, который также способен принимать электроны от TcDH в реакции окисления тиоцианата *in vitro*. Особенностью цитохрома C546/556 является его необычные для цитохромов с спектры поглощения с расщепленными Q-линиями, которые связаны с высокой подвижностью пропионатных групп гема с.

Основные выводы:

Для активации TcDH требуются ионы меди в разных степенях окисления +2 и +1. Медь-связывающие сайты в активном центре TcDH имеют разное сродство к ионам меди.

Наиболее эффективными конкурентными ингибиторами для TcDH являются амитрол, цианид, цианат и тиомочевина, способные образовывать мультидентатные комплексы с ионами меди активного центра.

Cu^{2+} – связывающий белок CopC способен активировать TcDH *in vitro*, что может свидетельствовать о его потенциальной физиологической роли металлошаперона.

Одnogемовые цитохромы C552 и C546/556 способны принимать электроны от TcDH в ходе каталитической реакции окисления тиоцианата *in vitro*.

ЛИТЕРАТУРА

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

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ РАБОТЫ

Статьи в рецензируемых журналах:

1. Khrenova M. G., Soloveva A. Yu., Varfolomeeva L. A., Tikhonova T. V., Popov V. O. The O to S substitution in urea brings inhibition activity against thiocyanate dehydrogenase // Mendelev Communication. – 2021. – Vol. 31(3) – P. 373–375.
2. Britikov V. V., Bocharov E. V., Britikova E. V., Dergousova N. I., Kulikova O. G., Solovieva A. Y. et al. Unusual Cytochrome c552 from *Thioalkalivibrio paradoxus*: Solution NMR Structure and Interaction with Thiocyanate Dehydrogenase // Int J Mol Sci. – 2022. – Vol. 23(17) – P. 9969.
3. Varfolomeeva L.A., Solovieva A.Yu., Shipkov N.S., Kulikova O.G., Dergousova N.I., Rakitina T.V., Boyko K.M., Tikhonova T.V., Popov V.O. Probing the Role of a Conserved Phenylalanine in the Active Site of Thiocyanate Dehydrogenase // Crystals. – 2022. – Vol. 12(12) – P. 1787.

Тезисы докладов:

1. Соловьева А. Ю. Изучение механизма действия тиоцианатдегидрогеназы методами стационарной кинетики // Сборник тезисов XXXIII Зимняя международная молодежная научная школа «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии»: 8-11 февраля 2021 / под редакцией д.х.н. Т.В. Овчинниковой, к.б.н. Е.А. Стукачевой, составитель: к.б.н. Стукачева Е.А. – С. 38. (тезисы и стендовый доклад).
2. Соловьева А.Ю., Тихонова Т. В. Исследование механизма активации тиоцианатдегидрогеназы *in vitro* и *in vivo* // Сборник тезисов отчётной конференции аспирантов: 21–25 июня 2021 г.: направление 06.06.01 «Биологические науки» / под редакцией В.О. Попова, А.Н. Фёдорова; сост. Е.С. Титова. –М.: ВАШ ФОРМАТ. –2021. – С. 53–56. (тезисы и устный доклад)
3. Соловьева А. Ю., Хренова М. Г., Тихонова Т. В., Попов В. О. Исследование механизма действия тиоцианатдегидрогеназы методом ингибиторного анализа // Сборник тезисов «III Объединенный научный форум физиологов, биохимиков и молекулярных биологов, VII съезд биохимиков России, X Российский симпозиум «белки и пептиды», VII съезд физиологов СНГ»: 3-8 октября 2021 / под редакцией А.Г. Габибова и М.А. Островского – С. 131. (тезисы и стендовый доклад).
4. Соловьева А.Ю., Тихонова Т. В. Исследование механизма активации тиоцианатдегидрогеназы *in vitro* и *in vivo* // Сборник тезисов отчётной конференции аспирантов: 23–30 июня 2022 г. / под редакцией В.О. Попова, А.Н. Фёдорова; сост. Е.С. Титова, С.В. Соловьева –М.: ВАШ ФОРМАТ. –2022. – С. 69–74. (тезисы и устный доклад)
5. Соловьева А.Ю., Варфоломеева Л.А., Дергоусова Н.И., Тихонова Т.В., Попов В.О. Необычные спектральные свойства одноклеточного цитохрома с из галоалкалофильных бактерий рода *Thiokalivibrio* // Сборник тезисов XXXV Зимняя международная молодежная научная школа «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии» 7-10 февраля 2023 / под редакцией д.х.н. Т.В. Овчинниковой, составители: Овчинникова Т. В., Шереметьева Э. В. - С.35. (тезисы и стендовый доклад).
6. Соловьева А.Ю., Тихонова Т. В. Исследование механизма активации тиоцианатдегидрогеназы *in vitro* и *in vivo* // Сборник тезисов отчётной конференции аспирантов: 19–21 июня 2023 г. / под редакцией В.О. Попова, А.Н. Фёдорова; сост. Ю.В. Рагузова, М.В. Костоломова – М.: ВАШ ФОРМАТ. –2023. – С. 72–75. (тезисы и устный доклад)
7. Соловьева А.Ю., Дергоусова Н.И., Бочаров Э.В., Варфоломеева Л.А., Устинникова Т.Б., Тихонова Т.В., Попов В.О. Структурные исследования одноклеточных цитохромов с – потенциальных акцепторов электронов в реакции, катализируемой тиоцианатдегидрогеназой // Тезисы докладов 13-ой Международной научной конференции «Биокатализ. Фундаментальные исследования и применения» (г. Суздаль, 25-29 июня 2023 г.) – М.: Издательство «Адмирал принт». –2023 – С. 216.

Основные достижения

Диплом за лучший доклад на ежегодной отчетной конференции аспирантов ФИЦ Биотехнологии РАН, 2022 г.

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

Abstract. *In this work we studied the activation of a copper-containing enzyme – thiocyanate dehydrogenase (TcDH). From the obtained results, two coppers are incorporated in the oxidation state +2, and the third – in +1. The dissociation constants (K_d) of the TcDH-Cu complex were determined: 7.0 ± 2.2 nM and 1.9 ± 0.5 μ M. Effective inhibitors have been found for activated TcDH: amitrol, cyanide, cyanate and thiourea. Two copper-binding proteins, CopC and MRP, which can act as carriers of copper ions to the active center of TcDH in the cell, as well as two potential physiological electron acceptors in the thiocyanate oxidation reaction, cytochromes C552 and C546/556.*

Keywords: *thiocyanate dehydrogenase, copper, enzyme activation, copper-binding protein, cytochrome C552.*

Сулейманов Руслан Закиевич
аспирант ФИЦ Биотехнологии РАН 4 года обучения
профиль 1.5.11 Микробиология
e-mail: suleimanov-1972@outlook.com

Научный руководитель
Дедыш Светлана Николаевна
доктор биологических наук,
заведующая лабораторией молекулярной экологии
и филогеномики бактерий



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

Аннотация. Исследования в рамках диссертационной работы ставили целью направленный поиск новых природных высокопродуктивных штаммов метанотрофных бактерий как продуцентов кормового белка на основе метана для аквакультуры, а также оптимизацию их метаболизма с помощью современных подходов генной и метаболической инженерии. Одной из важных предпосылок для развития биотехнологий с использованием метанотрофных бактерий как продуцентов кормового белка из метана является наличие штаммов-продуцентов с требуемыми физиологическими и ростовыми характеристиками. Работа четвертого года была направлена на поиск и идентификацию высокопродуктивных штаммов метанотрофных бактерий, способных к быстрому росту на морской воде.

Ключевые слова: метанотрофные бактерии, морские метанотрофы, ростовые характеристики, кормовой белок, *Methylo Marinum*, *Methylococcus*, *Methylo Monas*.

Аэробные метанотрофы – это уникальная группа бактерий, распространенная повсеместно в экосистемах, где одновременно доступны и метан, и кислород. Микроорганизмы этой группы способны использовать парниковый газ метан (CH₄) в качестве источника углерода и энергии, играя важную роль в глобальном цикле углерода, в частности, существенно сокращая его выбросы в атмосферу [2; 3; 7]. Помимо биосферной значимости, метанотрофные бактерии имеют высокий биотехнологический потенциал [1, 5], который особенно значителен у быстрорастущих представителей родов *Methylococcus* и *Methylo Monas*.

На поиск и изучение новых представителей этих родов, активно растущих при повышенных температурах, были направлены исследования первых трех лет. Так, из образцов активного ила, осадков пресноводных экосистем и почв полигонов ТБО был получен пул изолятов метанотрофных бактерий. Культуры, показавшие наиболее высокие ростовые и продукционные характеристики, были отобраны для дальнейшей работы по культивированию в опытном биореакторе. В числе этих наиболее перспективных штаммов - представители рода *Methylococcus* – штаммы MIR и KN2 и рода *Methylo Monas* – штаммы MP1 и MY1.

Для штамма *Methylococcus capsulatus* MIR была проведена работа по делеции генов синтеза гликогена – *glgA1* и *glgA2*. Данная работа имела целью увеличение выхода белка в продуцируемой биомассе за счет перенаправления потока ассимилируемого клетками углерода с синтеза запасного питательного вещества на синтез белка. Быстрорастущий высокопродуктивный

изолят рода *Methylomonas* – штамм MP1T- был описан в качестве нового вида этого рода – *Methylomonas rapida* sp. nov.

До сих пор биотехнология преобразования метана в микробный белок предполагала использование быстрорастущих пресноводных метанотрофов. Однако многие регионы мира имеют ограниченные ресурсы пресной воды, поэтому поиск метанотрофов, способных к быстрому росту в морской или соленой воде, представляет большой интерес для дальнейшего развития этой биотехнологии.

Образцы из самосадочного гиперсоленого озера Эльтон, Волгоградская область (N 49.2085; E 46.68024), были использованы для получения накопительной культуры метанотрофных бактерий, способных расти на морской воде. Для получения накопительной культуры была использована среда MOR с общим содержанием солей 30 г л⁻¹. Получить из этой накопительной культуры изолят метанотрофов, штамм Ch1-1, удалось с помощью многочисленных последовательных серий предельных разведений культуры на жидкой среде.

Идентификация изотипа Ch1-1 с помощью анализа последовательности гена 16S рРНК показала его принадлежность к роду *Methylomarinum*. Изолят показал 97.09 – 97.24% сходства последовательности гена 16S рРНК с таксономически описанными представителями *Methylomarinum vadi*, штаммами IT-4^T и T2-1, которые были ранее получены из морских местообитаний [4]. Результаты этого анализа свидетельствуют о том, что штамм Ch1-1 принадлежит к новому, пока не описанному виду рода *Methylomarinum*. Последовательность гена 16S рРНК штамма Ch1-1 была депонирована в GenBank под номером OR427371.

Геном штамма Ch1-1 составил 4.8 млн. н.о., который содержал 4305 белок-кодирующих последовательностей. Содержание пар Г+Ц в ДНК составило 50.81%. Сравнительный геномный анализ подтвердил принадлежность нового изолята к роду *Methylomarinum*. Значение идентичности нуклеотидных последовательностей (ANI) геномов штамма Ch1-1 и описанного ранее *M. vadi* IT-4^T составило 78.8% [6]. Геном штамма содержал три копии оперона рРНК и 46 генов тРНК, одну копию кластера генов мембранной метанмонооксигеназы – *pmoCAB* и не кодировал растворимой метанмонооксигеназы.

Штамм Ch1-1 был представлен подвижными палочками (рис 1А). Размер клеток составлял 0.85 ± 0.05 мкм в ширину и 1.50 ± 0.10 мкм в длину. В жидкой среде культура росла гомогенно, приобретая со временем красноватую окраску, поверхностных пленок не образовывала. Анализ ультратонких срезов клеток с помощью электронной микроскопии выявил грамотрицательное строение клеточной стенки и наличие стопок внутрицитоплазматических мембран I типа (рис. 1Б)

В качестве источников углерода штамм Ch1-1 использовал только метан и метанол. Рост на метаноле наблюдался в широком диапазоне до концентрации 5% (об./об.), однако рост культуры прекращался после 2-3 пересевов. В качестве источников азота штамм Ch1-1 использовал нитрат и соли аммония.

Штамм Ch1-1 рос в узком диапазоне рН от 6.3 до 7.5, с оптимумом при рН 6.8. Температурный диапазон роста составил 5–38 °С, с оптимумом при 30-35 °С. Ростовой диапазон содержания NaCl в среде составил 0.1–10.0 % (вес/об.), с оптимумом в 1.5–2 %. Рост в отсутствии NaCl был невозможен.

Оценку ростовых и продукционных характеристик *Methylomarinum* sp. Ch1-1 проводили в условиях непрерывного культивирования в биореакторе объемом 1.5 л на среде с общим содержанием солей 30 г л⁻¹. Культивирование в накопительном режиме являлось стерильным. С момента перехода в проточный режим культивирования происходило формирование ассоциации метанотрофа-продуцента и бактерий-спутников. Динамика роста *Methylomarinum* sp. Ch1-1 в биореакторе показана на рисунке 2.

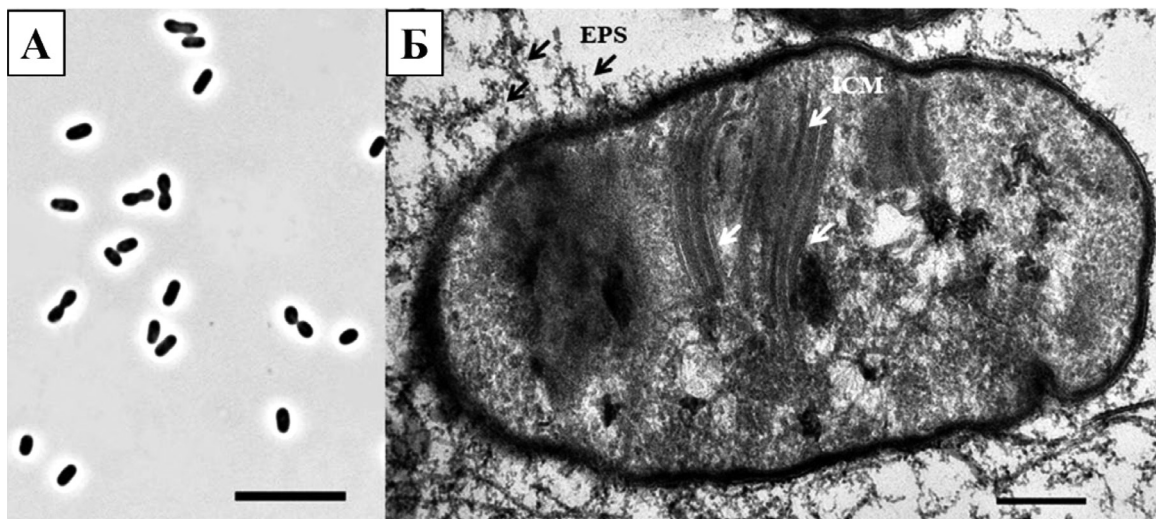


Рис. 1 – Морфология клеток (А) и ультратонкий срез клеток штамма Ch1-1 (Б). Маркеры: 10 мкм (А) и 200 нм (Б). Сокращения: EPS – экзополисахариды; ICM – внутрицитоплазматические мембраны

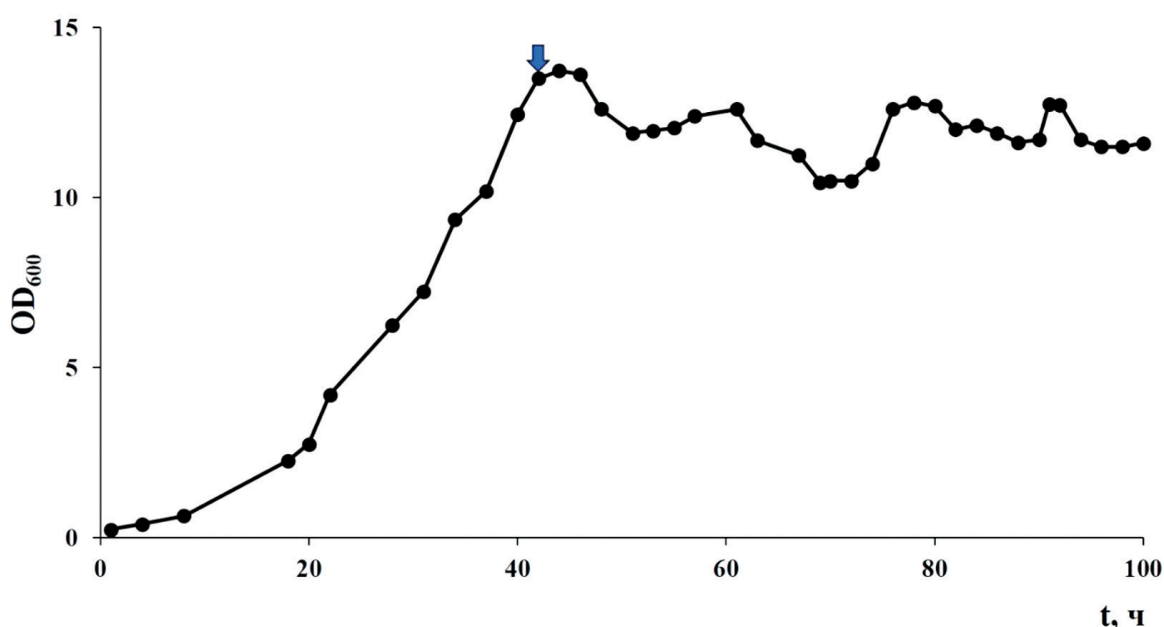


Рис. 2 – Динамика роста *Methylobacterium* sp. Ch1-1 в биореакторе. Переключение культивирования с накопительного на проточный режим указано синей стрелкой

В результате культивирования штамма Ch1-1 в биореакторе были получены следующие ростовые характеристики. В фазе накопительного режима культура показала удельную скорость роста 0.155 ч^{-1} , в проточном режиме культура поддерживала устойчивый рост со средней скоростью разбавления 0.135 ч^{-1} . Абсолютно сухой вес (АСВ) биомассы составил 3.5 г/л^{-1} при $\text{OD}_{600} = 13$. Анализ содержания белка в сухой клеточной биомассе метанотрофной ассоциации *Methylobacterium* sp. Ch1-1 показал, что биомасса этого метанотрофа (в чистой культуре) содержит до 61% белка, а в составе сообщества с гетеротрофными бактериями – порядка 66-68%. Низкое содержание белка в биомассе чистой культуры может быть связано с тем, что условия культивирования этого метанотрофа в биореакторе были не до конца оптимизированы.

В ходе эксперимента было проведено профилирование состава микробного сообщества, сформировавшегося в ходе культивирования штамма Ch1-1, с помощью анализа фрагментов генов 16S рРНК (рис. 3). Обнаружено, что основные группы бактерий-спутников этого метанотрофа были представлены галотолерантными бактериями родов *Methylophaga* и *Talassospira*.

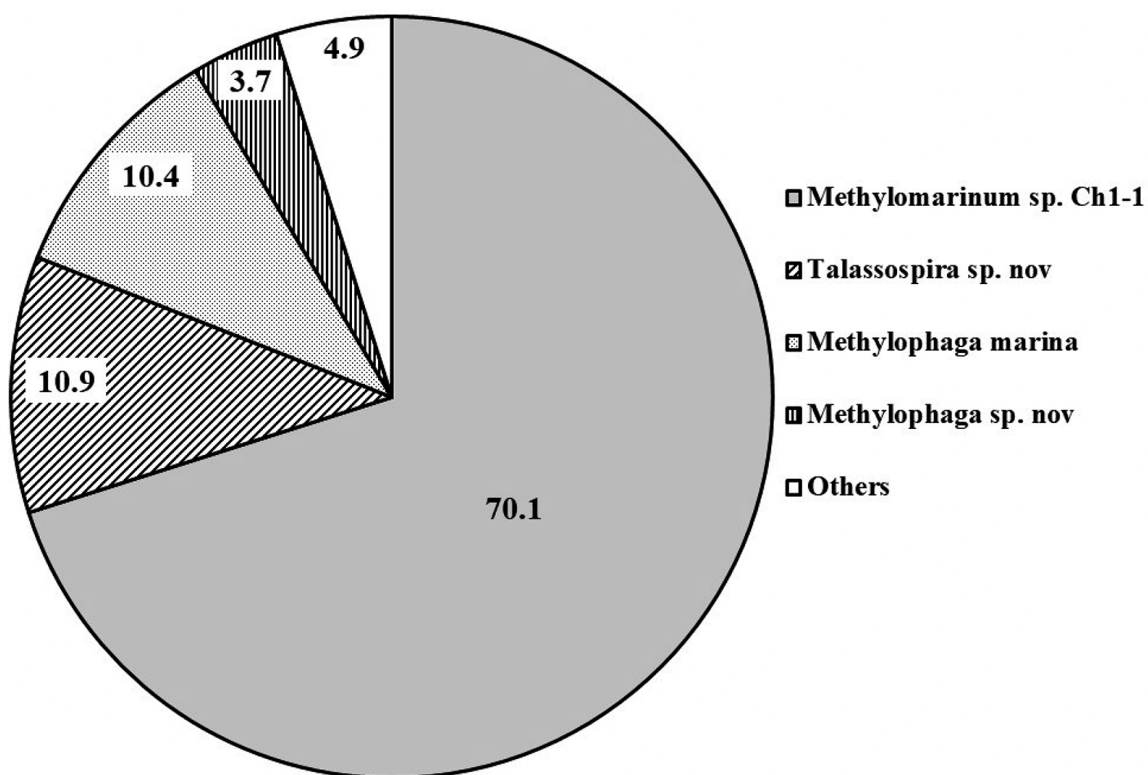


Рис. 3 – Профилирование состава сообщества, сформировавшегося в ходе культивирования штамма Ch1-1 в биореакторе, по генам 16S рРНК

Основные выводы:

В ходе работы в течение четырех лет был получен и идентифицирован ряд новых термотолерантных изолятов метанотрофных бактерий родов *Methylococcus*, *Methylomonas* и *Methylomarinum*. Для всех изолятов были получены, проанализированы и депонированы в GenBank полные последовательности геномов, что существенно пополнило число ныне доступных геномов метанотрофов высокого качества сборки. Для более полной оценки продукционных и ростовых характеристик полученные изоляты культивировали в опытном биореакторе. *Methylococcus capsulatus* штамм MIR, как наиболее быстрорастущий, был отобран для работы по метаболической инженерии, с целью улучшения ростовых и продукционных характеристик. Для этого штамма были получены мутанты по генам гликогенсинтаз (*ΔglgA1* и *ΔglgA2*) и проведен сравнительный анализ характеристик штамма дикого типа и полученных мутантов.

В ходе работы четвертого года по поиску метанотрофов-продуцентов, способных расти на морской воде, был получен изолят галотолерантных метанотрофных бактерий рода *Methylomarinum*, штамм Ch1-1, имеющий значительный биотехнологический потенциал. Данные о его ростовых характеристиках в условиях непрерывного культивирования на среде, эквивалентной по составу морской воде, являются основой для дальнейших исследований возможности получения кормового белка на природном газе в условиях дефицита пресной воды.

ЛИТЕРАТУРА

1. Гальченко В. Ф. Метанотрофные бактерии // Москва: ГЕОС. – 2001. – 500 с.
2. Троценко Ю.А. Хмеленина В.Н. Экстремофильные метанотрофы // под ред. Гальченко В. Ф. Пущино: ОНТИ ПНЦ РАН. – 2008. – 206 с.
3. Conrad R. The global methane cycle: recent advances in understanding the microbial processes involved. // Environmental microbiology reports – 2009. – Vol. 1(5). – P. 285–92.
4. Hirayama H., Fuse, H., Abe, M., Miyazaki, M., Nakamura, T., Nunoura, T., Furushima Y., Yamamoto H., Takai K. *Methylo Marinum vadi* gen. nov., sp. nov., a methanotroph isolated from two distinct marine environments // International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. – 2013. – Vol. 63(3). – P. 1073-1082.
5. Kalyuzhnaya M. G., Kumaresan D., Heimann K., Caetano N. S., Visvanathan C., Karthikeyan Ob. P. Methane: A Bioresource for Fuel and Biomolecules. // Frontiers in Microbiology. – 2020. – V. 8. – P. 9.
6. Tikhonova E. N., Suleimanov R.Z., Oshkin, I. Y., Pimenov, N. V., Dedysh, S. N., et al. Growing in saltwater: biotechnological potential of novel *MethyloTuvimicrobium*-and *Methylo Marinum*-like methanotrophic bacteria // Microorganisms. – 2023. – Vol. 11(9). – P. 2257.
7. Trotsenko YA, Murrell J. C. Metabolic aspects of aerobic obligate methanotrophy. // Adv. Applied Microbiology. – 2008. – Vol. 63. – P. 183–229.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ РАБОТЫ

Статьи в рецензируемых журналах:

1. Сулейманов Р.З., Ошкин И.Ю., Дедыш С. Н., и др. *Methylo Monas montana* sp. nov., первый непигментированный метанотроф рода *Methylo Monas*, выделенный из донных отложений горной реки // МИКРОБИОЛОГИЯ. – 2023. – Т. 92(6) – С. 766-774.
2. Ошкин И.Ю., Сулейманов Р.З., Дедыш С.Н., и др. Термотолерантные метанотрофные бактерии из осадков реки Черная, Крым, и оценка их ростовых характеристик // МИКРОБИОЛОГИЯ. – 2021. – Т. 90(5). – С. 553–563.
3. Oshkin I.Y., Suleimanov R.Z., Dedysh S.N., et al. Expanding Characterized Diversity and the Pool of Complete Genome Sequences of *MethyloCoccus* Species, the Bacteria of High Environmental and Biotechnological Relevance // Frontiers in Microbiology. – 2021. – Vol. 12:756830.
4. Tikhonova E. N., Suleimanov R.Z., et al. *Methylo Monas rapida* sp. nov., a novel species of fast-growing, carotenoid-producing obligate methanotrophs with high biotechnological potential // Systematic and Applied Microbiology. – 2023. – Vol. 46(2). – P. 126398.
5. Tikhonova E. N., Suleimanov R.Z., Oshkin, I. Y., Pimenov, N. V., Dedysh, S. N., et al. Growing in saltwater: biotechnological potential of novel *MethyloTuvimicrobium*-and *Methylo Marinum*-like methanotrophic bacteria // Microorganisms. – 2023. – Vol. 11(9). – P. 2257.
6. Oshkin I. Y., Suleimanov R.Z., et al. Complete Genome Sequence of *MethyloCoccus capsulatus* MIR, a Methanotroph Capable of Growth on Methanol // Microbiology Resource Announcements. – 2022. – Vol. 11(9). – P. e00542-22.
7. Oshkin I. Y., Tikhonova, E. N., Suleimanov, R. Z., Ashikhmin, A. A., Ivanova, A. A., Pimenov, N. V., Dedysh, S. N. All Kinds of Sunny Colors Synthesized from Methane: Genome-Encoded Carotenoid Production by *Methylo Monas* Species // Microorganisms. – 2023. – Vol. 11(12). – P. 2865.

Тезисы докладов:

1. Сулейманов Р.З., Ошкин И.Ю., Тихонова Е.Н., Дедыш С.Н. Новый вид термотолерантных метанотрофных бактерий рода *Methylo Monas* с высокими ростовыми характеристиками.

XIII Молодежная школа-конференция «Актуальные аспекты современной микробиологии» 16–18 ноября 2022 (постерный доклад).

2. Конопкин А.А., Тихонова Е.Н., Сулейманов Р.З., Дедыш С.Н. Новые изоляты бактерий рода *Methylomonas*, синтезирующие каротиноиды, и их ростовые характеристики в условиях непрерывного культивирования на метане. XIII Молодежная школа-конференция «Актуальные аспекты современной микробиологии» 16–18 ноября 2022 (постерный доклад).
3. Бут С.Ю., Розова О.Н., Сулейманов Р.З. Генетическая модификация биотехнологически перспективного штамма метанотрофа *Methylococcus capsulatus* MIR – продуцента белка одноклеточных. III Пущинская школа-конференция молодых ученых, аспирантов и студентов «Генетические технологии в микробиологии, микробное разнообразие» (в рамках IX Пущинской конференции «Биохимия, физиология и биосферная роль микроорганизмов») 5–7 декабря, 2023 (постерный доклад).
4. Сулейманов Р.З. Поиск и метаболическая инженерия новых метанотрофных бактерий как продуцентов кормового белка для аквакультуры. Ежегодная отчетная конференция аспирантов Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук». 2021–2023 гг. (устные доклады).

Suleimanov Ruslan Zakievich
FEDERAL RESEARCH CENTRE OF BIOTECHNOLOGY

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

Abstract. *Research within the framework of the Ph.D thesis aimed at a targeted search for new fast-growing strains of methanotrophic bacteria to be used as producers of feed protein from methane for aquaculture, as well as optimization of their metabolism using modern approaches of genetic and metabolic engineering. The work of the fourth year was aimed at searching and identifying highly productive strains of methanotrophic bacteria capable of rapid growth in seawater.*

Keywords: *methanotrophic bacteria, marine methanotrophs, growth characteristics, feed protein, Methylococcus, Methylomonas, Methylo Marinum.*

Шипков Николай Сергеевич

аспирант ФИЦ Биотехнологии РАН 4 года обучения

профиль 1.5.3 Молекулярная биология

e-mail: shipkov1995@yandex.ru



Научный руководитель

Попов Владимир Олегович

доктор химических наук, профессор

зав. лаборатории инженерной энзимологии

СТРУКТУРА И СВОЙСТВА ТИОЦИАНАТДЕГИДРОГЕНАЗ ИЗ РАЗЛИЧНЫХ ИСТОЧНИКОВ

Аннотация. Тиоцианатдегидрогеназа – медь-содержащий фермент впервые обнаруженный у сероокисляющей бактерии *Thioalkalibvibrio paradoxus* (tpTcDH). Анализ структуры tpTcDH позволил предположить, что шаблон из 10 аминокислотных остатков, формирующих активный центр tpTcDH, отвечает за принадлежность белка к тиоцианатадегидрогеназам. Гомологи tpTcDH можно разделить на 3 группы на основании гомологии и наличия замен в аминокислотном шаблоне. В этой работе были выделены и охарактеризованы гомологи tpTcDH из каждой группы. Проведенные исследования подтверждают предположение о важности аминокислотного шаблона для наличия тиоцианатдегидрогеназной активности.

Ключевые слова: тиоцианат, тиоцианатдегидрогеназа, сероокисляющие бактерии, цианатный путь, медь-содержащие ферменты.

Тиоцианат является токсичным соединением, образующимся как в природных, так и в промышленных процессах. Химическая стабильность и токсичность тиоцианата обуславливают необходимость поиска способов очистки промышленных сточных вод от тиоцианата. Перспективным направлением представляется биоремедиация сточных вод с помощью тиоцианат-утилизирующих организмов.

Тиоцианатдегидрогеназа – медь-содержащий фермент, катализирующий окисление тиоцианата с образованием цианата, серы и с переносом двух электронов на внешний акцептор. Первая тиоцианатдегидрогеназа (TcDH) была выделена из галоалкалофильной сероокисляющей бактерии *Thioalkalibvibrio paradoxus*. Активный центр TcDH из *Tv. paradoxus* (tpTcDH) содержит набор из 10 консервативных аминокислотных остатков, обеспечивающих поддержание структуры трехъядерного медного кластера и каталитические свойства tpTcDH [1]. Было высказано предположение, что характерный шаблон из 10 каталитически важных аминокислот, является маркером принадлежности белка к семейству тиоцианатдегидрогеназ [2]. Гомологи tpTcDH были обнаружены у более чем 50 микроорганизмов. На основании степени гомологии и присутствия замен в аминокислотном шаблоне гомологи tpTcDH были разделены на 3 группы. Первая группа – гомологи tpTcDH со степенью гомологии >50% и без замен в аминокислотном шаблоне, вторая группа – гомологи со степенью гомологии 49-35% с заменой H482Q, третья группа – наиболее удаленные гомологи tpTcDH (гомология <33%), но без замен в аминокислотном шаблоне. Целью работы являлось получение и характеристика гомологов tpTcDH из каждой группы, проверка важности аминокислотного шаблона для причисления гомологов tpTcDH к семейству тиоцианатдегидрогеназ. Для этой цели были выбраны TcDH из бактерий *Pelomicrobium methylophilum*

(pmTcDH) и *Hydrogenobacter thermophilus* (htTcDH) (первая группа), *Tautonia sociabilis* (tsTcDH) (вторая группа) и *Thiohalobacter thiocyanaticus* HRh1(ttTcDH) (третья группа). Для всех трех групп бактерий проанализированы генные кластеры, содержащие гены гомологов TcDH.

В работе показано, что бактерия *P. methylotrophicum* способна к росту на тиоцианате как источнике азота, при этом регистрируется экспрессия pmTcDH и фермента цианазы, который разлагает образующийся под действием TcDH цианат на CO₂ и аммоний, использующийся в процессах биосинтеза.

Гомологи trTcDH из первой группы (pmTcDH и htTcDH) были получены с помощью гетерологичной экспрессии в клетках *E. coli*. Оба белка являются медь-зависимыми ферментами, катализирующими окисление тиоцианата по той же схеме, что и trTcDH, то есть являются тиоцианатдегидрогеназами. Исследованы биохимические свойства обоих белков.

Вторая группа гомологов trTcDH содержит одну замену в аминокислотном шаблоне, остаток H482, который в trTcDH отвечает за координацию иона Cu³⁺, заменен на глутамин. Полученная методом гетерологичной экспрессии tsTcDH из *T. sociabilis*, относящаяся ко второй группе, не обладала тиоцианатдегидрогеназной активностью. Способность к росту на тиоцианате была также проверена для бактерии *Methylocapsa acidiphila* B2, содержащей в геноме ген гомолога TcDH из второй группы. Бактерия *M. acidiphila* B2 оказалась не способна к росту на тиоцианате. Таким образом, замены в аминокислотном шаблоне критичны, и белки, содержащие такую замену, не являются тиоцианатдегидрогеназами.

Для исследования третьей группы гомологов trTcDH была выбрана бактерия *T. thiocyanaticus*, для которой ранее была показана способность расти на тиоцианате как единственном источнике энергии и азота. Фермент ttTcDH (идентичность по аминокислотной последовательности с trTcDH 32 %), выделенный из периплазматической фракции *T. thiocyanaticus*, выращенной на минеральной среде в присутствии тиоцианата, представлял собой смесь свободного фермента и прочного комплекса ttTcDH с тиоредоксин-подобным белком (TLP), ген которого предшествует гену ttTcDH. Препарат содержал до 2.9 ионов меди в пересчете на TcDH. Тиоцианатдегидрогеназной активностью обладал только комплекс ttTcDH-TLP, свободный ttTcDH не проявлял каталитических свойств.

Для дальнейших исследований были получены рекомбинантные препараты ttTcDH и TLP. Поскольку рекомбинантный ttTcDH был нестабилен и склонен к агрегации, был проведен широкий скрининг и оптимизация методов получения и стабилизации целевого белка, позволившие увеличить выход и ttTcDH и избавиться от высокомолекулярных агрегатов. Свободный рекомбинантный ttTcDH, как и нативный, не обладал тиоцианатдегидрогеназной активностью после насыщения ионами меди. Каталитическая активность ttTcDH появляется только при насыщении ионами меди в присутствии TLP. При этом образуется комплекс ttTcDH-TLP, который наблюдается на гель-фильтрации. Обнаружена способность TLP связывать ионы меди. Возможно, TLP участвует во встраивании ионов меди в активный центр ttTcDH, это подтверждается тем, что насыщение ионами меди ttTcDH в отсутствие TLP приводит к встраиванию только 1 из 3 ионов меди.

Анализ ближайшего окружения гена TcDH у микроорганизмов разных классов показал, что у тех бактерий, где гомологи TcDH имеют консервативный шаблон из 10 аминокислотных остатков (первая и третья группы гомологов), рядом с геном TcDH расположены гены медь-связывающих белков, ответственных за перенос и встраивание ионов меди в активный центр с образованием каталитически компетентной формы фермента. В случае организмов второй группы, где у предполагаемой TcDH присутствует замена одного из остатков аминокислотного шаблона, гены белков – переносчиков ионов меди в ближайшем окружении гена TcDH отсутствуют. Поскольку из наших данных следует, что такая форма TcDH неактивна, то клетке нет необходимости создавать систему транспорта ионов меди к заведомо дефектному белку.

Основные выводы:

1. Получены и охарактеризованы гомологи trTcDH из 4-х организмов.
2. Подтверждено, что шаблон из 10 аминокислотных остатков, формирующих активный центр trTcDH, отвечает за принадлежность гомологов trTcDH к тиоцианатдегидрогеназам.
3. Все изученные тиоцианатдегидрогеназы требуют присутствия 3-х ионов меди в активном центре для каталитической активности.
4. Нативный ttTcDH находится в двух формах: свободной и в прочном комплексе с тиоредоксин-подобным белком (TLP). Только комплекс ttTcDH-TLP обладает ферментативной активностью. Свободная ttTcDH неактивна и нестабильна.
5. Оптимизирован способ получения и стабилизации рекомбинантной ttTcDH, позволивший получить гомогенный и монодисперсный препарат белка
6. Насыщение ttTcDH ионами меди приводит к встраиванию только одного из трех ионов, и фермент оказывается неактивен. Насыщение ttTcDH ионами меди в присутствии TLP приводит образованию каталитически активной формы фермента.

ЛИТЕРАТУРА

1. Tikhonova T.V. et al. Trinuclear copper biocatalytic center forms an active site of thiocyanate dehydrogenase // Proc Natl Acad Sci USA. 2020. Vol. 117, № 10. P. 5280–5290.
2. Tsallagov S.I. et al. Comparative Genomics of Thiohalobacter thiocyanaticus HRh1T and Guyparkeria sp. SCN-R1, Halophilic Chemolithoautotrophic Sulfur-Oxidizing Gammaproteobacteria Capable of Using Thiocyanate as Energy Source // Front. Microbiol. 2019. Vol. 10. P. 898.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ РАБОТЫ

Статьи в рецензируемых журналах:

1. Britikov V. V., Bocharov E. V., Britikova E. V., Dergousova N.I., Kulikova O.G., Solovieva A.Y., Shipkov N.S., Varfolomeeva L.A., Tikhonova T. V., Timofeev V.I., Shtykova E. V., Altukhov D.A., Usanov S.A., Arseniev A.S., Rakitina T. V., Popov V.O., Unusual Cytochrome c552 from Thioalkalivibrio paradoxus: Solution NMR Structure and Interaction with Thiocyanate Dehydrogenase. // Int. J. Mol. Sci. – 2022. – V. 23. – P. 9969. IF=6,2
2. Varfolomeeva L. A., Solovieva A.Y., Shipkov N.S., Kulikova O.G., Dergousova N.I., Rakitina T.V., Boyko K.M., Tikhonova T.V., Popov V.O. et al. Probing the Role of a Conserved Phenylalanine in the Active Site of Thiocyanate Dehydrogenase //Crystals. – 2022. – T. 12. – №. 12. – C. 1787.

Тезисы докладов:

1. Shipkov N. S. et al. Preliminary characterization of two novel thiocyanate dehydrogenases from halophilic sulfur oxidizing Gammaproteobacteria Thiohalobacter thiocyanaticus HRh1T and Guyparkeria sp. SCN-R1 //12th International Conference BIOCATALYSIS-2019: Fundamentals & Applications. – 2019.
2. Шипков Н.С. и др. Новые тиоцианатдегидрогеназы из сероокисляющих бактерий Thiohalobacter thiocyanaticus hrh1 и Guyparkeria sp. SCN-R1 //II Объединенный научный форум. VI съезд физиологов снг. VI Съезд биохимиков россии. IX российский симпозиум «белки и пептиды». – 2019. – с. 259-259.
3. Варфоломеева Л. А., Поляков К.М., Шипков Н.С., Дергоусова Н.И., Бойко К.М., Тихонова Т.В., Попов В.О. Перестройки медного кластера тиоцианатдегидрогеназы из *Hydrogenophilia*

bacterium в процессе каталитической реакции на основе рентгеноструктурных данных с атомным разрешением М. – 2022.

4. Шипков Н.С., Дергоусова Н.И., Тихонова Т.В., Сорокин Д.Ю., Попов В.О. В книге: перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии. сборник тезисов. XXXIII Зимняя международная молодёжная научная школа. Москва, 2021. с. 45.

Shipkov Nikolai Sergeevich
RESEARCH CENTER OF BIOTECHNOLOGY RAS

STRUCTURE AND PROPERTIES OF THIOCYANATE DEHYDROGENASE FROM VARIOUS SOURCES

Abstract. *Thiocyanate dehydrogenase is a copper-containing enzyme first discovered in the sulfur-oxidizing bacterium Thioalkalibvibrio paradoxus. It is assumed that 10 amino acid residues of the active center of tpTcDH are responsible for the protein belonging to thiocyanate dehydrogenases. tpTcDH homologues are divided into 3 groups based on the degree of homology and the presence of substitutions in the amino acid template. In this work, tpTcDH homologues from each group were isolated and characterized. It was confirmed the assumption of the importance of the amino acid template for the presence of thiocyanate dehydrogenase activity.*

Keywords: *thiocyanate, thiocyanate dehydrogenase, sulfur-oxidizing bacteria, cyanate pathway, copper-containing enzymes.*

Бубнова Анастасия Николаевна

аспирант ФИЦ Биотехнологии РАН 3 года обучения

профиль 1.5.6 Биотехнология

e-mail: an_bubnova@mail.ru

Научный руководитель

Камионская Анастасия Михайловна

кандидат биологических наук,

руководитель группы биоинженерии растений



ПОИСК АННОТИРОВАННЫХ ГЕНОВ ЗА ПРЕДСКАЗАННЫМИ ПОТЕНЦИАЛЬНЫМИ ПРОМОТОРАМИ И СОЗДАНИЕ ПЛАЗМИДНОЙ КОНСТРУКЦИИ С MCS ДЛЯ ПОСЛЕДУЮЩЕЙ ВАЛИДАЦИИ ПРЕДСКАЗАННЫХ ПРОМОТОРОВ

Аннотация. В данной работе был проведён поиск ближайших аннотированных транскриптов к предсказанным методом MADHS [1] промоторным последовательностям 1-й хромосомы генома риса *Oryza sativa* в направлении 3' (downstream) по аннотированным данным RefSeq NCBI. В результате были выявлены аннотированные гены, 5'-конец транскриптов которых совпадает с потенциальными сайтами начала транскрипции, обнаруженными ранее при первичной проверке свойств предсказанных промоторов. Для дальнейшей проверки предсказанных промоторов *in vivo* путём транзientной экспрессии была модифицирована плазмидная конструкция: 35S-промотор был заменён на сайт множественного клонирования (MCS) для обеспечения возможности дальнейшей вставки последовательностей предсказанных промоторов перед репортерным геном GFP.

Ключевые слова: предсказанные промоторные последовательности, аннотированные транскрипты, плазмидная конструкция, сайт множественного клонирования (MCS), *Oryza sativa*.

Ранее нами было подтверждено, что 126 исследуемых предсказанных методом MADHS промоторов располагаются не ближе 1000 п.о. от известных генов, проверка проводилась по обновлённой версии той же аннотации, которую использовали разработчики алгоритма предсказания промоторов при поиске ближайших к предсказанным последовательностям генов [1] – IRGSP из Ensemble Plants (доступно по адресу: https://plants.ensembl.org/Oryza_sativa/Info/Index).

В данной работе был проведён поиск аннотированных генов за предсказанными промоторами в направлении downstream в аннотации генома риса RefSeq NCBI (доступно по адресу: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/datasets/genome/GCF_001433935.1/). В данной аннотации были обнаружены биоинформатически аннотированные, но экспериментально не подтверждённые гены, 5'-конец которых пересекается с 3'-концом предсказанных промоторных последовательностей или находится на расстоянии не более 200 п.о. от них. Данный факт свидетельствует о том, что такие предсказанные последовательности действительно являются промоторами, и подтверждает действенность алгоритма предсказания промоторных последовательностей методом MADHS.

Также ранее путём анализа данных CAGE-seq нами были выявлены потенциальные сайты начала транскрипции, в том числе и располагающиеся в районе 3'-концов предсказанных промоторов, и открытые области хроматина, доступные для посадки факторов транскрипции. За 3-мя из 4-х предсказанных промоторных последовательностей, располагающихся в откры-

той области хроматина и имеющих за собой потенциальный сайт старта транскрипции (они были выбраны ранее для дальнейшей проверки *in vivo* как наиболее вероятно являющиеся регуляторными элементами генома), в аннотации RefSeq NCBI были обнаружены аннотированные гены. Это доказывает действенность метода проверки промоторных последовательностей посредством поиска неаннотированных сайтов старта транскрипции (анализ данных CAGE-seq) и изучения доступности хроматина (анализ данных ATAC-seq). Всего из 14 выявленных потенциальных сайтов старта транскрипции за предсказанными промоторами [2] у 5 подтвердились обнаруженные сайты старта транскрипции наличием аннотированных 5'-концов генов в аннотации RefSeq NCBI.

Для дальнейшей проверки функционирования предсказанных промоторных последовательностей путём транзientной экспрессии в тканях растений была модифицирована плазмида p-NR-AMV (любезно предоставленная Н.В. Равиным, лаборатория систем молекулярного клонирования, ФИЦ Основы биотехнологии РАН). Репортерный ген GFP в немодифицированной плазмиде располагается за 35S промотором и AMV-энхансером (рис. 1).

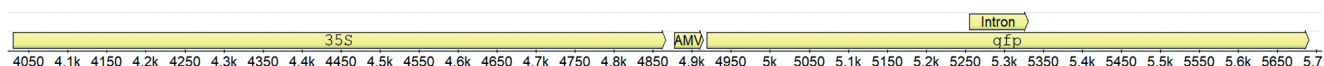


Рис. 1. Фрагмент плазмиды p-NR-AMV

Промотор 35S в исходной плазмиде был заменён на сайт множественного клонирования (MCS) (рис. 2) с несколькими уникальными сайтами узнавания рестриктаз (рис. 3), что обеспечит возможность вставки в плазмидную конструкцию последовательностей предсказанных промоторов.

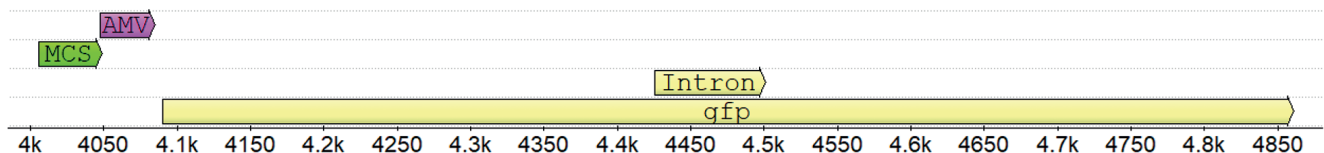


Рис. 2. Фрагмент плазмиды p-NR-AMV-MCS

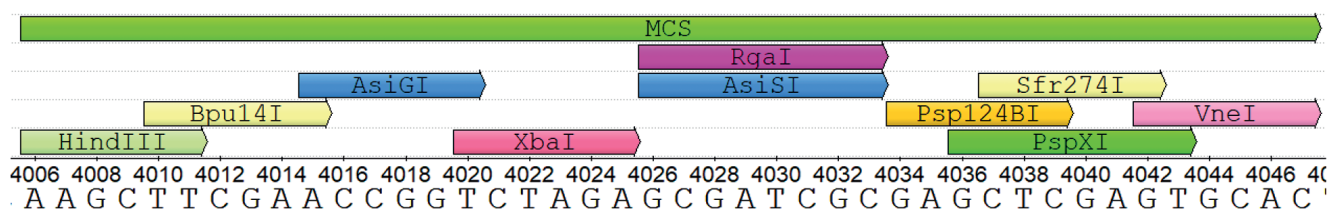


Рис. 3. Сайт множественного клонирования в плазмиде pNR-AMV-MCS

В качестве контрольных промоторов для экспериментальной проверки выбраны промоторы двух высоко экспрессивных генов: актина и убиквитина.

ЛИТЕРАТУРА

1. Korotkov E. V. et al. Mathematical Algorithm for Identification of Eukaryotic Promoter Sequences // Symmetry. – 2021. – Т. 13. – №. 6. – С. 917

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ РАБОТЫ

Статьи в рецензируемых журналах:

1. Bubnova A.N., Yakovleva I.V., Korotkov E.V., Kamionskaya A.M. In Silico Verification of Predicted Potential Promoter Sequences in the Rice (*Oryza sativa*) Genome. *Plants*. 2023; 12(20): 3573. DOI: 10.3390/plants12203573.

Тезисы докладов:

1. Бубнова А.Н., Зубрицкий А.В., Камионская А.М. Поиск стартов начала транскрипции вблизи предсказанных потенциальных промоторов риса и изучение степени открытости хроматина. В сб.: Сборник тезисов IX Международной конференции молодых ученых: вирусологов, биотехнологов, биофизиков, молекулярных биологов и биоинформатиков в рамках площадки открытых коммуникаций OpenBio — 2022: Сб. тез. / АНО «Иннов. центр Кольцово». — Новосибирск: ИПЦ НГУ, 2022. — 764 с; 2022: С. 12-12.
2. Бубнова А.Н., Яковлева И.В., Гайдукова С.Е., Камионская А.М. Изучение свойств, предсказанных промоторных последовательностей 1-й хромосомы генома риса. В сб.: Биосистемы: организация, поведение, управление: Тезисы докладов 77-й Международной школы-конференции молодых ученых (Н. Новгород, 15–19 апреля 2024 г.). Н. Новгород, Университет Лобачевского. 2024. 425 с.; 2024: С. 52-52.

Bubnova Anastasiya Nikolaevna
RESEARCH CENTER OF BIOTECHNOLOGY RAS

SEARCH FOR ANNOTATED GENES BEHIND PREDICTED POTENTIAL PROMOTERS AND CREATION OF A PLASMID CONSTRUCT WITH MCS FOR SUBSEQUENT VALIDATION OF PREDICTED PROMOTERS

Abstract. *In this study, we searched for the closest annotated transcripts to the MADHS [1] predicted promoter sequences of chromosome 1 of the rice *Oryza sativa* genome in the 3' (downstream) direction using RefSeq NCBI annotated data. As a result, we identified annotated genes which 5'-end transcripts overlap with the previously discovered potential transcription start sites in the initial validation of the properties of the predicted promoters. To further verify the predicted promoters in vivo by transient expression, the plasmid construct was modified: the 35S promoter was replaced by a multiple cloning site (MCS) to allow further insertion of the predicted promoter sequences upstream of the GFP reporter gene.*

Keywords: *predicted promoter sequences, annotated transcripts, plasmid construction, multiple cloning site (MCS), *Oryza sativa*.*

Галлямов Артур Альбертович

аспирант ФИЦ Биотехнологии РАН 3 года обучения

профиль 1.5.3 Молекулярная биология

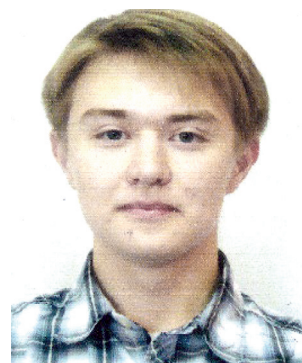
e-mail: arturens96@gmail.com

Научный руководитель

Кушников Виталий Владимирович

доктор биологических наук,

зав. лаборатории молекулярной генетики



ПРОТЕАЗНОЕ КАРТИРОВАНИЕ ПРИОННЫХ СТРУКТУР ДРОЖЖЕВОГО БЕЛКА RNQ1

Аннотация. Дрожжевой белок *Rnq1* имеет большой С-концевой потенциально приногенный участок длиной около 250 аминокислотных остатков, но предыдущие исследования обнаружили, что лишь малый С-концевой участок длиной в 40 аминокислотных остатков образует прионную структуру. В данной работе мы обнаружили и картировали другие прионные структуры в *Rnq1* в двух штаммах $[RNQ^+]$. Расположение этих структур отличались от большинства компьютерных предсказаний. Показана важность для прионных свойств *Rnq1* последних 120 остатков. Присоединение GFP к С-концу *Rnq1* нарушало формирование С-концевой прионной структуры, что указывает на неадекватность белка *Rnq1*-GFP, использованного в предыдущих исследованиях, для изучения прионных свойств *Rnq1*. Флуоресцентной микроскопией зафиксированы паттерны агрегации разных вариантов *Rnq1*, которые оказались сложнее наблюдаемой ранее агрегации *Sup35*.

Ключевые слова: дрожжевой прион, амилоид, *Rnq1*, флуоресцентная микроскопия, масс-спектрометрия.

R_{nq1} – дрожжевой белок с неизвестной функцией, способный образовывать прион $[RNQ^+]$ [1,2]. Этот прион катализирует появление *de novo* других дрожжевых прионов, в том числе наиболее изученного приона $[PSI^+]$ на основе фактора терминации трансляции *Sup35* [3]. *Rnq1* имеет большой карбоксиконцевой приногенный домен, включающий аминокислотные остатки со 153 по 405. Этот домен богат аспарагином (N) и глутамином (Q), что характерно для других прионов дрожжей [1,4].

Обычно приногенные домены являются частью прионного белка, где другая часть выполняет определённые каталитические функции. Вовлечение белка в образование приона может быть регулятором этой функции. Принято считать, что приногенные домены являются модульными и сохраняют свои свойства при слиянии с другими белками, что активно используется при изучении прионных свойств новых белков. Наиболее часто используют гибриды предполагаемых прионных доменов с функциональным С-доменом *Sup35*, что дает фенотипическую индикацию прионного превращения, или с флуоресцентным белком GFP. Приногенные домены часто располагаются на концевых участках белка, и, по всей видимости, нахождение в концевой области является важным для проявления прионных свойств. Ряд наблюдений указывает, что изменение концевой области такого домена может нарушить образование приона или передачу прионной укладки исходного приона. Тем не менее, при изучении прионных свойств белка *Rnq1* к его С-концу обычно присоединяли репор-

терные белки Sup35 или GFP. В работе мы стремились оценить важность концевой расположения прионогенного домена Rnq1.

Принято считать, что прионогенный домен Rnq1 составляет обширная QN-богатая область из 250 остатков. Однако ранее в нашей лаборатории обнаружили, что его прионная структура охватывает лишь последние 40 остатков [5]. При этом ряд других работ [6] указывает на то, что другие части QN-богатой области также важны для приона $[RNQ^+]$.

Мы создали ряд генетических конструкций Rnq1 (Рис. 1), чтобы наблюдать прионную агрегацию и картировать прионные структуры. Все конструкции находились на мультикопийной плазмиде pYes2 под контролем сильного индуцируемого промотора *GALI*. С-концевые укорочения заканчивались на 277, 355, 381 и 392 остатка. Сделано два варианта конъюгации GFP с полно-размерным Rnq1: GFP-Rnq1 и Rnq1-GFP. Также сделан вариант конъюгации GFP с последними 72 остатками Rnq1.

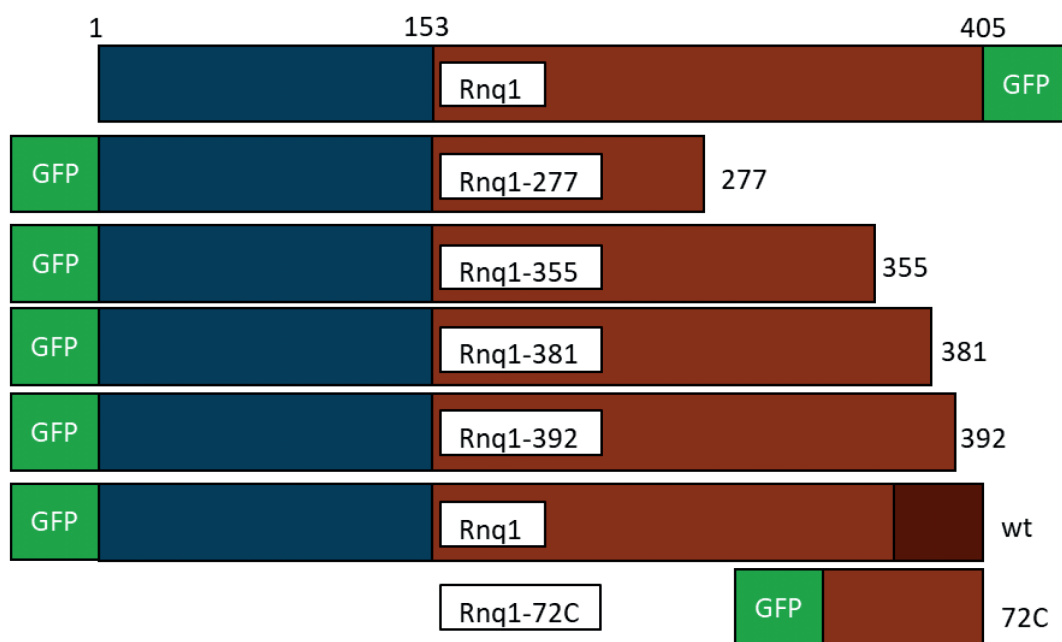


Рисунок 1. Варианты гибридов Rnq1, использованные для наблюдения за паттернами агрегации и картирования прионных структур

Штамм 74-D694 дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* содержащий два варианта $[RNQ^+]$ (high и very high) трансформировали плазмидами с полученными генетическими конструкциями и индуцировали сверхпродукцию. Фотографировали на 3 и 24 час сверхпродукции (Рис. 2).

Агрегация Rnq1 оказалась разнообразней, чем то, что ранее рассматривали при агрегации Sup35. Когда вариант Sup35 вовлекается в образование прионного агрегата, то в микроскопе наблюдается точечная агрегация, а когда вариант Sup35 образует прионную или амилоидную *de novo*, то наблюдаются кольцевые структуры.

В дрожжах с прионом $[RNQ^+]$ -high мы изменили ген *RNQ1* аналогично конструкциям на Рис. 1, но без GFP и под родным промотором. Для получения *RNQ1*-GFP мы извлекли с помощью ПЦР конструкцию, маркированную геном *HIS3* из библиотеки GFP гибридов, и этим продуктом трансформировали исходный штамм. Для совершения С-концевых укорочений мы использовали технологию CRISPR/Cas9. В результате в большинстве случаев геномные замены привели к потере приона, что было показано с помощью электрофореза с дифференциальным кипячением. Только Rnq1-392 сохранил прионную форму.

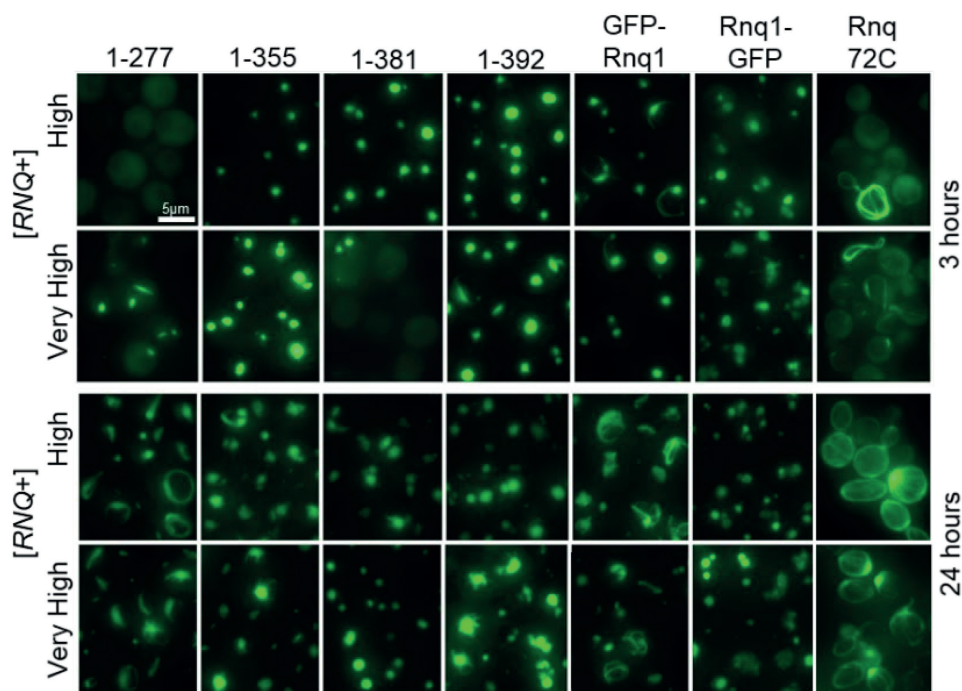


Рис. 2. Характер агрегации Rnq1 на 3 и 24 час сверхпродукции [7]

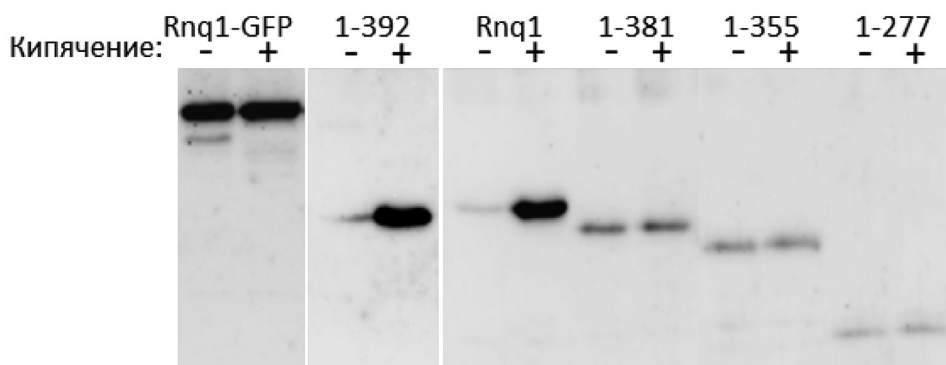


Рис. 3. Вестерн-блот с антителами на Rnq1. «+» – лизат нанесён с кипячением в 2% SDS (прионная форма заходит в гель), «-» – лизат нанесён без кипячения (прионная форма в гель не заходит) [7,8]

Разные варианты гибридов Rnq1 после сверхпродукции изолировали и обрабатывали протеиназой К, которая гидролизует бесструктурные области. Сохранившиеся пептиды идентифицировали с помощью MALDI (Рис. 4).

Основные выводы:

Получены генетические конструкции Rnq1, с помощью которых были картированы прионные структуры. Выявлены отдельные структурные единицы в прионогенном домене Rnq1, расположение которых коррелируют с высоким содержанием QN. Микроскопия показала сложный характер агрегации Rnq1, в частности для конструкции Rnq1-72C. Большинство геномных мутаций С-концевых укорочений Rnq1 приводит к потере приона, а замена на Rnq1-392 хоть и не влечёт за собой потерю, но вызывает перестройку прионной структуры, что также указывает на важную роль конечного расположения первого ядра прионогенного домена Rnq1. Присоединение GFP к С-концу Rnq1 существенно изменяло прионную структуру и приводило к потере приона при геномной замене Rnq1 на Rnq1-GFP.

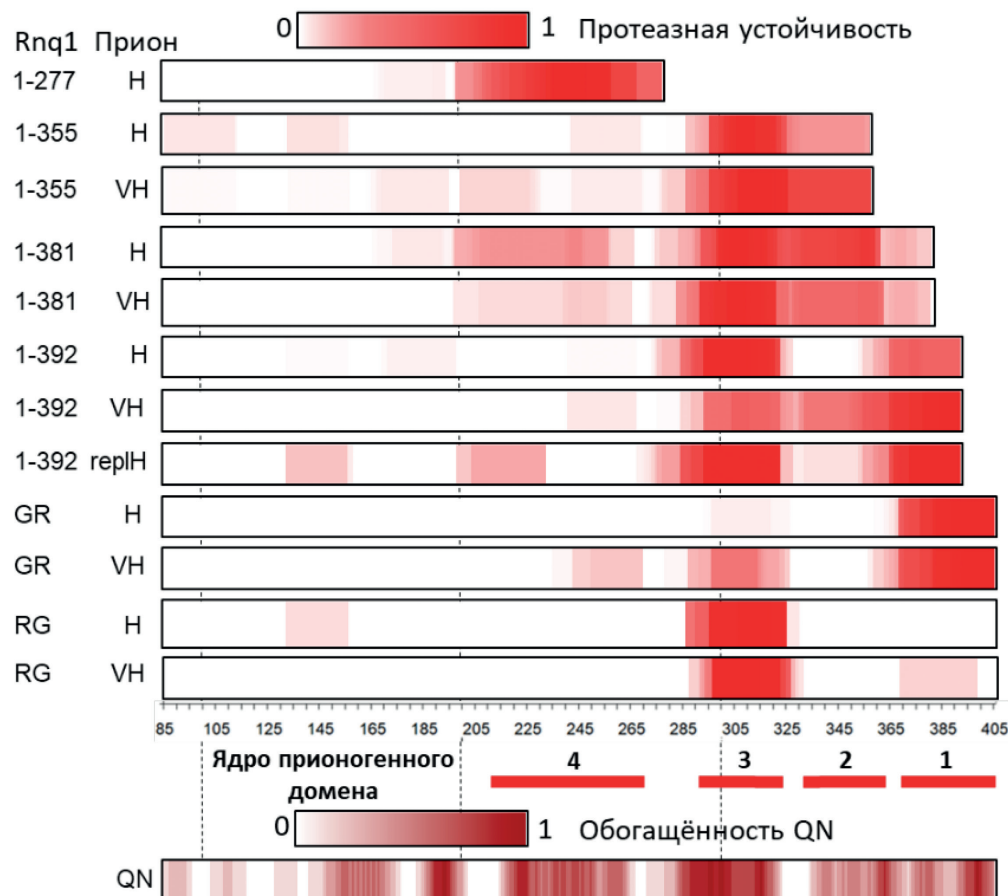


Рис. 4. Устойчивые к протеазе структуры разных гибридов Rnq1, сверхпродуцированные на фоне предсуществующего приона $[RNQ^+]$ high (H), very high (VH), или приона Rnq1-392 после геномной замены в штамме $[RNQ^+]$ high (replH) [7]

ЛИТЕРАТУРА

1. Sondheimer N., Lindquist S. Rnq1: an epigenetic modifier of protein function in yeast //Molecular cell. – 2000. – Т. 5. – №. 1. – С. 163-172.
2. Salnikova A. B. et al. Nonsense suppression in yeast cells overproducing Sup35 (eRF3) is caused by its non-heritable amyloids //Journal of Biological Chemistry. – 2005. – Т. 280. – №. 10. – С. 8808-8812.
3. Vitrenko Y. A. et al. Visualization of aggregation of the Rnq1 prion domain and cross-seeding interactions with Sup35NM //Journal of Biological Chemistry. – 2007. – Т. 282. – №. 3. – С. 1779-1787.
4. Wickner R. B., Dyda F., Tycko R. Amyloid of Rnq1p, the basis of the [PIN⁺] prion, has a parallel in-register β -sheet structure //Proceedings of the National Academy of Sciences. – 2008. – Т. 105. – №. 7. – С. 2403-2408.
5. Dergalev A. A. et al. Yeast Sup35 prion structure: Two types, four parts, many variants //International journal of molecular sciences. – 2019. – Т. 20. – №. 11. – С. 2633.
6. Kurahashi H. et al. A regulatory role of the Rnq1 nonprion domain for prion propagation and polyglutamine aggregates //Molecular and cellular biology. – 2008. – Т. 28. – №. 10. – С. 3313-3323.
7. Galliamov A. A., Malukhina A. D., Kushnirov V. V. Mapping of Prion Structures in the Yeast Rnq1 //International Journal of Molecular Sciences. – 2024. – Т. 25. – №. 6. – С. 3397.
8. Kryndushkin D. S. et al. Yeast [PSI⁺] prion aggregates are formed by small Sup35 polymers fragmented by Hsp104 //Journal of Biological Chemistry. – 2003. – Т. 278. – №. 49. – С. 49636-49643.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ РАБОТЫ

Статьи в рецензируемых журналах:

1. Galliamov A. A., Malukhina A. D., Kushnirov V. V. Mapping of Prion Structures in the Yeast Rnq1 //International Journal of Molecular Sciences. – 2024. – Т. 25. – №. 6. – С. 3397.

Тезисы докладов:

1. Галлямов А. А., Малухина А. Д., Кушников В. В. Критическая роль концевых областей белка у прионов дрожжей //Сборник тезисов 4-ого Российского микробиологического конгресса – 2023. – С. 112-112. (постерный доклад).

Galliamov Artur Albertovich
RESEARCH CENTER OF BIOTECHNOLOGY RAS

PROTEASE MAPPING OF PRION STRUCTURES IN THE YEAST PROTEIN RNQ1

Abstract. *The yeast protein Rnq1 has a large C-terminal potentially prionogenic region of about 250 amino acid residues, but previous studies have found only a small C-terminal region of 40 residues forms the prion structure. In this study, we discovered and mapped other prion structures in Rnq1 in two [RNQ+] strains. Location of this structures differed from most computer predictions. The importance of the last 120 residues for the prion properties of Rnq1 has been shown. GFP fusion to the C terminus of Rnq1 disrupted the formation of the C-terminal prion structure, indicating that the Rnq1-GFP protein used in previous studies is inadequate to investigate the prion properties of Rnq1. Aggregation patterns of different Rnq1 variants were recorded by fluorescence microscopy and found to be more complex than the previously observed aggregation of Sup35.*

Keywords: *yeast prion, amyloid, Rnq1, fluorescence microscopy, mass spectroscopy.*

Галуза Олеся Александровна
аспирант ФИЦ Биотехнологии РАН 3 года обучения
профиль 1.5.11 Микробиология
e-mail: olesya_galuza@mail.ru

Научный руководитель
Николаев Юрий Александрович
доктор биологических наук,
зав. лабораторией выживаемости микроорганизмов



ИССЛЕДОВАНИЕ СТРЕССОУСТОЙЧИВОСТИ МОЛОЧНОКИСЛЫХ БАКТЕРИЙ, ИММОБИЛИЗОВАННЫХ В СИЛАНЛЬНО-ГУМАТНЫЕ ГЕЛИ

Аннотация. *Исследования в рамках кандидатской диссертации ставят целью поиск новых эффективных способов поддержания жизнеспособности молочнокислых бактерий (МКБ), используемых в продукции функционального питания и биопрепаратах, а также исследование механизмов выживания и стрессоустойчивости иммобилизованных клеток.*

Впервые обнаружены стрессопротекторные свойства силанльно-гуматных гелей (СГГ), положительно влияющие на сохранение высокого титра жизнеспособных иммобилизованных клеток молочнокислых бактерий.

*СГГ эффективно защищает клетки бактерии *Enterococcus faecium* от гибели при длительном хранении при комнатной температуре, а также дополнительных стрессорах: температуре 4 °С, пониженной влажности, интенсивном освещении, а также при доступе кислорода воздуха.*

Ключевые слова: *молочнокислые бактерии, пищевые гели, силанльно-гуматные гели, выживаемость бактерий, длительное хранение, выживаемость, условия хранения биопрепаратов.*

Молочнокислые бактерии (МКБ) – важная группа бактерий-симбионтов, которые имеют широкое применение благодаря своим полезным свойствам в промышленности, медицине, фармакологии и сельском хозяйстве [1]. В настоящее время известны разнообразные положительные эффекты молочнокислых пробиотических бактерий, подтвержденные многочисленными клиническими исследованиями. МКБ играют важную роль в поддержании колонизационной резистентности – оказывают выраженную антагонистическую активность, продуцируя бактериоцины и другие противомикробные вещества, поддерживают естественную микрофлору кишечника, помогают усваивать микроэлементы из пищи, участвуют в синтезе витаминов и аминокислот, повышают иммунитет, сбраживают лактозу с образованием молочной кислоты и других продуктов [2, 3].

Высокая скорость отмирания МКБ является одной из главных проблем при хранении продуктов и препаратов с живыми клетками. Срок хранения продукции с МКБ (по истечению, которого, титр уменьшается в 10 и более раз) составляет не более 4 недель [4]. Одним из наиболее эффективных методов сохранения жизнеспособности является иммобилизация клеток, в том числе – в гели. Это состояние аналогично тому, когда клетки пребывают в составе биоплёнок [5].

Понимание механизмов длительного выживания, в том числе – перехода жизнеспособных клеток бактерий в покоящееся состояние и факторов, которые индуцируют данный процесс, спо-

способствуют разработке новых подходов в улучшении условий хранения пробиотической продукции и бакпрепаратов, а также их более эффективного применения [6].

Известно несколько способов продления (поддержания) жизнеспособности МКБ [7]. Новым и перспективным является иммобилизация бактерий в силанольно-гуматные гели (СГГ), которые способны уменьшать воздействие окислительного стресса благодаря наличию в составе геля гуматов, обладающих антиоксидантными свойствами [8], а также органических кислот-титрантов для создания оптимального рН. Эти кислоты могут быть использованы клетками как дополнительные источники углерода [9]. Иммобилизация в СГГ увеличивает жизнеспособность углеводородоокисляющих бактерий при длительном хранении [8]. СГГ был успешно применён для иммобилизации МКБ, что привело к продлению сроков хранения биопрепаратов до шести месяцев [9], однако, оставалось не исследованным, повышает ли СГГ выживаемость клеток МКБ в условиях действия различных стрессоров, таких как температура, влажность воздуха (влияющая на активность воды A_w), уровень освещённости и доступ кислорода воздуха (повышающий окислительный стресс), что и составило цель работы.

В работе использован гель на основе органосилана (3-аминопропилтриэтоксисилана), гумата (Паохумус, ООО Родагро), и молочной кислоты, используемой в качестве титранта [10]. Объект исследования – штамм молочнокислой бактерии *Enterococcus faecium* M3185.

Количество жизнеспособных клеток определяли с помощью микрометода – высева десятичных разведений на агаризованную среду LB и последующего подсчета образовавшихся колоний. Стрессовые факторы, исследуемые в работе: температура 45 °С, 25 °С, 5°С и -14 °С, высокая освещённость (световой поток 1400 Лм), доступ или отсутствие атмосферного воздуха, различная влажность (99%, 50% и 40%). Динамику жизнеспособных клеток определяли через 30 суток.

При иммобилизации клеток бактерий *E. faecium* в гели и последующей инкубации в течение месяца при разных температурных условиях наибольшая доля жизнеспособных клеток сохранялась при +25 и +5 °С (рис. 1). При высокой температуре 45 °С и замораживании до -14 °С защитные свойства СГГ не выражены. Доля жизнеспособных клеток при этом была ниже, чем в контрольных образцах в 1.2 раза. При температуре 25 °С доля жизнеспособных клеток в геле была выше, чем в контроле в 7.14 раз, а при температуре 5 °С – выше в 2.6 раз.

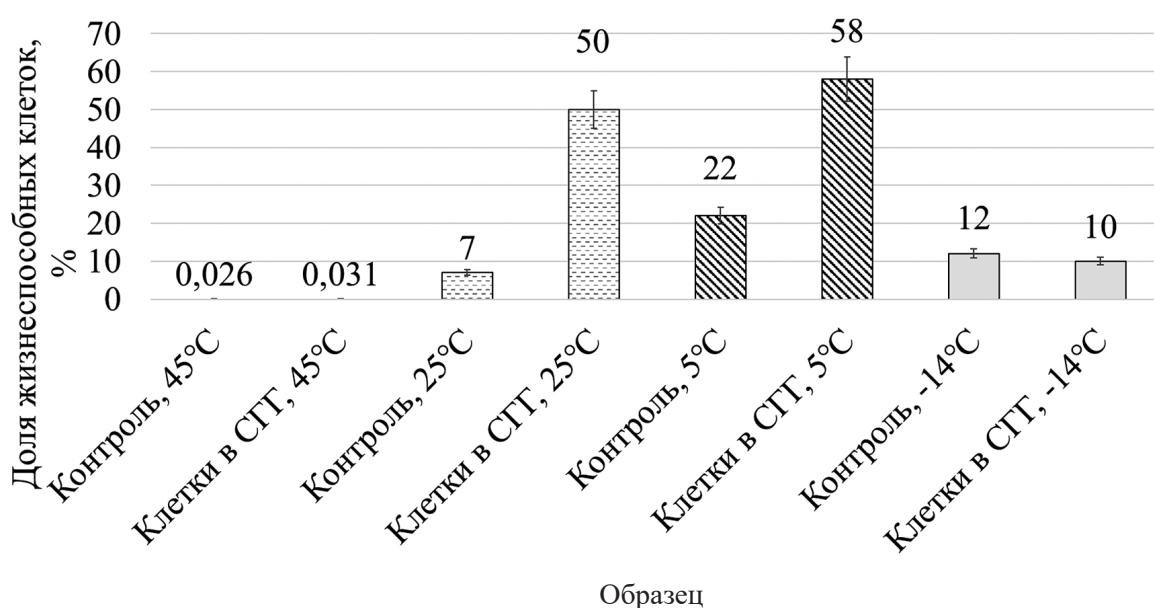


Рис.1. Доли жизнеспособных клеток *E. faecium*, иммобилизованных в гели, при хранении в разных температурных условиях в течение месяца

При иммобилизации энтерококка в гели и последующей инкубации в течение месяца при разных условиях влажности доля жизнеспособных клеток была выше, чем в контроле: при 40% влажности – в 2 раза выше, при 50% – в 3 раза, при 99% – в 14 раз (рис. 2).

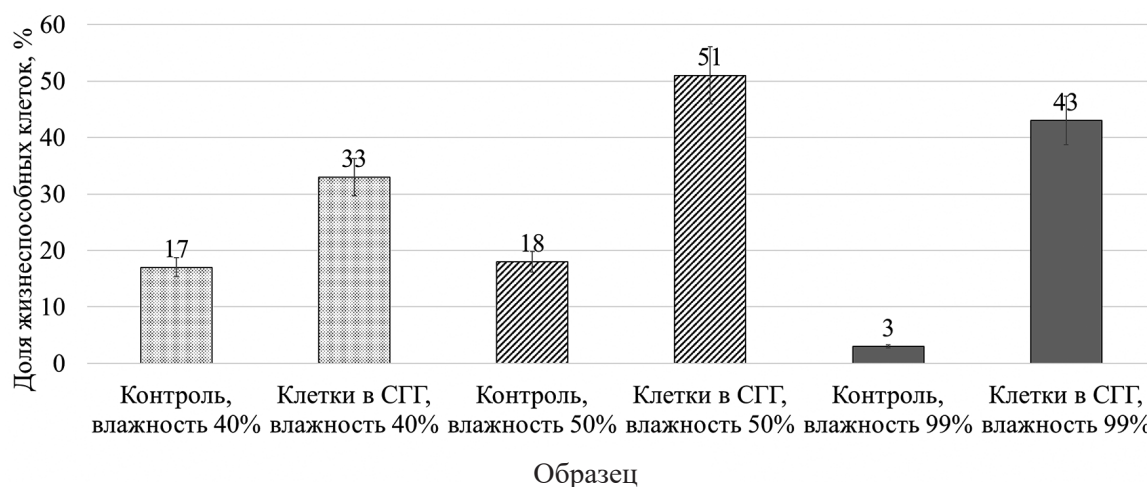


Рис.2. Доли жизнеспособных клеток *E. faecium*, иммобилизованных в гели, при хранении в разных условиях влажности в течение месяца

При иммобилизации энтерококка в гели и последующей инкубации в течение месяца при разных условиях освещённости наибольшая доля жизнеспособных клеток сохранялась при постоянном интенсивном освещении 1400 Лм (рис. 3) и была в 4 тыс. раз больше, чем в контроле. В условиях отсутствия освещённости доля жизнеспособных клеток, иммобилизованных в геле, была в 5 раз больше, чем в контроле.

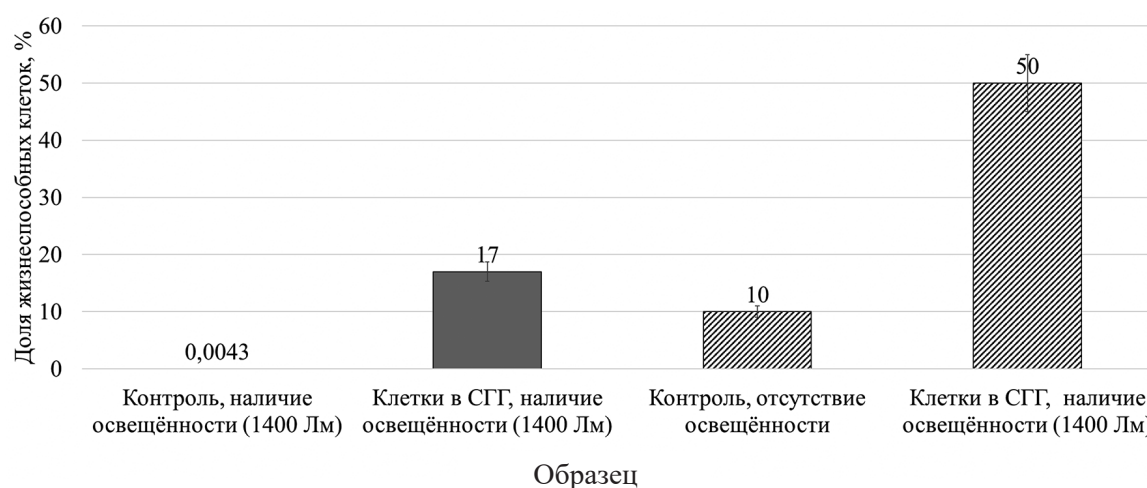


Рис.3. Доли жизнеспособных клеток *E. faecium*, иммобилизованных в гели, при хранении в разных условиях освещённости в течение месяца

При иммобилизации энтерококка в гели и последующей инкубации в течение месяца при доступе и отсутствии кислорода воздуха наибольшая доля жизнеспособных клеток сохранялась в гелях и была в 28 и 2,6 раз больше, чем в контроле (рис. 4).

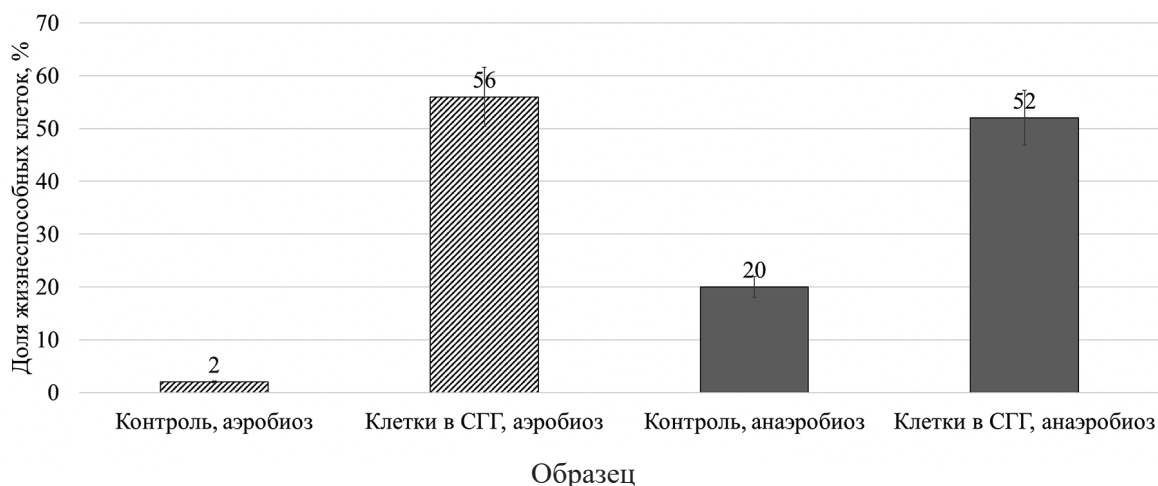


Рис.4. Доли жизнеспособных клеток *E. faecium*, иммобилизованных в гели, при хранении в доступе или отсутствии кислорода воздуха

Наиболее эффективно свои защитные свойства гель проявляет в случае хранения препаратов в условиях аэриобиоза и постоянного воздействия света. Это обусловлено тем, что в геле присутствуют гуминовые вещества (ГВ), способные стимулировать образование стрессоустойчивых персистирующих клеток, а также ГВ могут поглощать свет [11, 12]. ГВ представляют собой продукты конденсации и окисления фенольных соединений, в том числе и алкилрезорцинов, которые проявляют стресс-потенцирующую и антиоксидантную активность [13], а также индуцируют образование стрессовых регулонов, которые уже приводят к формированию клеток-персистеров (устойчивых к различным стрессовым факторам) [14].

В случае понижения влажности защитные свойства СГГ выражены меньше, чем при высокой влажности (рис. 2), что вызвано большим выживанием клеток в контрольном варианте.

Основные выводы:

В результате проведенных исследований обнаружены стрессопротекторные свойства СГГ в отношении МКБ *Enterococcus faecium* M3185, что позволяет использовать его при производстве и хранении биопрепаратов на основе молочнокислых бактерий.

Уровень выживания клеток в контроле существенно зависел от условий хранения: доступа воздуха (в присутствии его доступа – снижался), света (при высокой освещенности – снижался), температуры (повышался при +4 °C относительно комнатных условий), и влажности (повышался при понижении влажности воздуха). В СГГ в этих условиях клетки были менее подвержены стрессорам (выживание составляло 30-50%), поэтому защитный эффект иммобилизации относительно контроля существенно варьировал.

Важной особенностью СГГ является его низкая стоимость, что делает разработанный способ хранения конкурентноспособным и привлекательным для производителей молочнокислой продукции и биопрепаратов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Шендеров, Б. А. Медицинская микробная экология и функциональное питание / Б.А. Шендеров. – Т. 3. – Москва: Грантъ, – 1998. – С. 287
2. Молочнокислые бактерии и пути их использования / В.И. Квасников, О.А. Нестеренко. – Москва: Наука, – 1975. – 384 с.

3. Тюрин, М.В. Антибиотикорезистентность и антагонистическая активность лактобацилл: автореферат дис. кандидата медицинских наук: 14.00.31 / Тюрин Михаил Владимирович; [Место защиты: ВНИИ антибиотиков]. – специальность 14.00.31 «Медицинские науки»: автореферат диссертации на соискание ученой степени кандидата медицинских наук /. – Москва, 1990. – 21 с.
4. Viability of bifidobacteria in commercial dairy products during refrigerated storage / H. Shin, J.H. Lee, J.J. Pestka, Z.P. Ustinol // Food Protect. – 2000. – Vol. 63, №3. – P. 327–331.
5. Ефременко Е.Н. Имобилизованные клетки: биокатализаторы и процессы: монография // М.: РИОР, – 2018. – С. 523
6. Viable but non-culturable and persistence describe the same bacterial stress state / J.S. Kim, N. Chowdhury, R. Yamasaki, T.K. Wood // Environ Microbiol.. – 2018. – V. 20, № 6. – P. 2038–2048.
7. Immobilization Technologies in Probiotic Food Production / G. Mitropoulou, V.Nedovic, A. Goyal, Y. Kourkoutas // Journal of nutrition and metabolism. – 2013. – №5. – P. 1–15.
8. Новые биоконкомпозитные материалы, включающие углеводородокисляющие микроорганизмы, и их потенциал для деградации нефтепродуктов / Ю. А. Николаев, И.А. Борзенков, Н.Г. Лойко [и др.] // Микробиология. – 2021. – V. 90, № 6. – P. 692-705.
9. Long-Term Survival of Bacteria in Gels / O.A. Galuza, N.E. Kovina, N.A. Korotkov et al. // Microbiology. – 2023. – V. 92, № 1. – P. S17–S21.
10. Патент № 2757600 С1 Российская Федерация, МПК С12N 1/20. Способ получения биопрепаратов живых микроорганизмов с продленным сроком сохранения высокого титра жизнеспособных клеток путём иммобилизации в гели на основе силанольных производных гуминовых веществ: № 2021101780: заявл. 27.01.2021: опубл. 19.10.2021 / Николаев Ю.А., Борзенков И.А., Демкина Е.В., Лойко Н. Г., Канапацкий Т. А., Перминова И. В., Воликов А.Б., Хрептугова А.Н., Галуза О.А. – 2 с.
11. Роль гуминовых веществ в пролонгировании жизнеспособности клеток углеводородокисляющих бактерий / Ю.А. Николаев, Е.В. Демкина, И.В. Перминова [и др.] // Микробиология. – 2019. – Т. 88, № 6. – С. 725-729.
12. Изосимов, А. А. Физико-химические свойства, биологическая активность и детоксицирующая способность гуминовых препаратов, отличающихся генезисом органического сырья: автореферат дис. кандидата биологических наук: 03.02.08 / Изосимов Алексей Анатольевич; [Место защиты: Моск. гос. ун-т им. М.В. Ломоносова]. – Москва, 2016. – 26 с.
13. Эль-Регистан, Г.И. Адаптогенные функции внеклеточных ауторегуляторов микроорганизмов / Г.И. Эль-Регистан, А.Л. Мулюкин, Ю.А. Николаев [и др.] // Микробиология. – 2006. – Т. 75, № 4. – С. 446–456.
14. Голод, Н.А. Роль микробных ауторегуляторов – алкилоксибензолов, в контроле экспрессии стрессовых регулонов / Н.А. Голод, Н.Г. Лойко, К.В. Лобанов [и др.] // Микробиология. – 2009. – Т. 78, № 6. – С. 731–741.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ РАБОТЫ

Статьи в рецензируемых журналах:

1. Исследование различных способов стабилизации клеток молочнокислых бактерий при длительном хранении / О.А. Галуза, Ю.А. Николаев, Р.В. Уланова [и др.] // Материалы международного форума «Биотехнология: Состояние и перспективы развития». – Москва : ООО «Экспо-Биохим-Технологии», 2020. – С. 388-389.
2. Галуза О.А. Исследование новых способов стабилизации клеток молочнокислых бактерий при длительном хранении. – В сб.: Материалы Международного молодежного научного фо-

рума «ЛОМОНОСОВ-2020». Второе издание: переработанное и дополненное. М.: МАКС Пресс, 2020. С. 34-35.

3. Галуза О.А. Выживаемость молочнокислых бактерий в гелях органического и смешанного состава // Сборник тезисов отчётной конференции аспирантов ФИЦ Биотехнологии РАН: направление подготовки 06.06.01 Биологические науки (23-30 июня 2022 г.) / под ред. В.О. Попова, А. Н. Фёдорова; сост. Е. С. Титова. – М.: ВАШ ФОРМАТ. – 2022. – С. 144-149 (тезисы и устный доклад).
4. Галуза О.А. Выживаемость молочнокислых бактерий в гелях органического и смешанного состава // Сборник тезисов отчетной конференции аспирантов Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук» 19 – 21 июня 2023 г.» / под ред. В. О. Попова, А. Н. Фёдорова; сост. Ю. В. Рагузова, М. В. Костоломова. – М.: Ваш Формат. – 2023. – С. 91-96 (тезисы и устный доклад).
5. Galuza, O. A. Long-Term Survival of Bacteria in Gels / O.A. Galuza, N.E. Kovina, N.A. Korotkov et al. // Microbiology. – 2023. – V. 92, № 1. – P. S17–S21.

Тезисы докладов:

1. Галуза О. А., Ковина Н. Е. Новый способ продления выживаемости молочнокислых бактерий в пищевых продуктах // Международная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов-2023», Москва, 10-21 апреля 2023 (постерный доклад).
2. Galuza O. A. Survival of lactic acid bacteria in silanol-humane gels // Seventh International 96 Conference of CIS IHSS on Humic Innovative Technologies (HIT-2022) «Humic substances and Technologies for resilience», Moscow, 18-21 November 2022 (устный доклад).
3. Галуза О. А., Ковина Н. Е., Коротков Н. А., Эль-Регистан Г. И., Николаев Ю. А. Длительное выживание бактерий в гелях // 4-ый Российский микробиологический конгресс, Томск, 24-29 сентября 2023 (постерный доклад).
4. Галуза О. А., Коротков Н. А. Выживание *Enterococcus faecium* M3185, иммобилизованного в силанольногуматный гель, при воздействии различных стрессоров // Международная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов-2024», Москва, 12-26 апреля 20234 (постерный доклад).

Основные достижения, патенты

1. Патент 2757600 Российская Федерация, МПК C12N 1/20 Способ получения биопрепаратов живых микроорганизмов с продленным сроком сохранения высокого титра жизнеспособных клеток путем иммобилизации в гели на основе силанольных производных гуминовых веществ / Николаев Ю.А., Борзенков И.А., Демкина Е.В., Лойко Н.Г., Канапацкий Т.А., Перминова И.В., Воликов А. Б., Хрептугова А. Н., Галуза О.А., Эль-Регистан Г. И.; заявитель и патентообладатель Федеральное государственное учреждение «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук». – № 2021101780; заявл. 27.01.2021; опубл. 19.10.2021, Бюл. № 29. 2 с.

STUDY OF STRESS RESISTANCE OF LACTIC ACID BACTERIA IMMOBILIZED IN SILANOL-HUMATE GELS

Abstract. *Research within the framework of the PhD thesis aims to find new effective ways to maintain the viability of lactic acid bacteria (LAB) used in functional nutrition products and biologics, as well as to study the mechanisms of survival and stress resistance of immobilized cells.*

For the first time, the stress-protective properties of silanol-humate gels (SHG) were discovered, which positively affect the preservation of a high titer of viable immobilized cells of lactic acid bacteria.

*SHG effectively protects the cells of the *Enterococcus faecium* bacterium from death during prolonged storage at room temperature, as well as additional stressors: temperature 4 °C, low humidity, intense lighting, as well as with access to oxygen in the air.*

Keywords: *lactic acid bacteria, food gels, silanol-humane gels, bacterial survival, long-term storage, survival, storage conditions of biological products.*

Жилкина Татьяна Алексеевна

аспирант ФИЦ Биотехнологии РАН 3 года обучения

профиль 1.5.6 Биотехнология

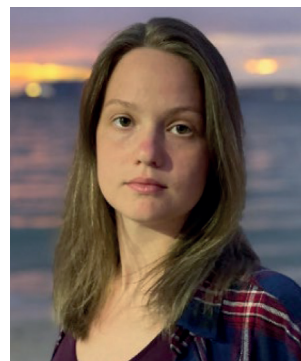
e-mail: timofeyka2033@mail.ru

Научный руководитель

Варламов Валерий Петрович

доктор химических наук, профессор

зав. лаборатории инженерии биополимеров



ИЗУЧЕНИЕ АКТИВНОСТИ СЕМЕЙСТВА ГЕНОВ PAL В ОТВЕТ НА ОБРАБОТКУ НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНЫМ ГИДРОЛИЗАТОМ ХИТОЗАНА

Аннотация. Изучение механизмов действия хитозана показало, что гидролизат хитозана действует как стимулятор роста и элиситор для растений, повышая устойчивость к биотическим и абиотическим факторам. В растениях фенилаланин-аммоний-лиаза (PAL) является важным ферментом при биосинтезе фенолов и фитоалексинов, а также гормона стресса – салициловой кислоты. В работе проведен анализ семейства генов PAL, и анализ экспрессии генов в корнях проростков томатов сортов Черри, Лель и Титан. Экспрессия генов SIPAL в проростках сорта Черри через 48 ч увеличилась в 1,5 раза, тогда как у сорта Лель экспрессия стабильно снижалась в присутствии хитозана. Полученные результаты призваны помочь понять механизмы, лежащие в основе влияния хитозана на развитие растений.

Ключевые слова: гидролизат хитозана, томат, фенолы, фенилаланин-аммоний-лиаза, PAL.

Хитозан, являющийся деацетилированной формой хитина, считается вторым по распространенности природным полимером в мире после целлюлозы. Во многих исследованиях доказано положительное влияние хитозана на всхожесть и скорость роста растений, длину корней и объем корневой системы [1, 2]. Среди эффектов, отражающихся на метаболизме растений, необходимо обратить внимание на влияние хитозана на биосинтез фенольных соединений. Фенилаланин-аммоний-лиаза (PAL, EC 4.3.1.5) – ключевой фермент фенилпропаноидного пути, принимающий непосредственное участие как в биосинтезе фенольных соединений, так и в синтезе салициловой кислоты [3, 4]. Во многих исследованиях было показано, что активность PAL усиливается хитозаном [1, 4]. В настоящем исследовании было изучено влияние низкомолекулярного гидролизата хитозана на активность генов PAL у проростков томата.

В работе использовался низкомолекулярный гидролизат хитозана (ГХ) со средней молекулярной массой 33 кДа (индекс полидисперсности = 2,1), степень деацетилирования 95%, концентрация исходного раствора 10 мг/мл, pH 5,1. ГХ был получен путем химической деполимеризации высокомолекулярного хитозана азотной кислотой [5]. В работе исследовали три сорта томата: Лель, Титан и Черри.

В результате поиска генов, кодирующих фермент фенилаланин-аммоний-лиазу, в геноме *Solanum lycopersicum* в базе данных Sol Genomics Network [6] идентифицировано 16 генов, ответственных за синтез PAL (табл. 1). Эти гены расположены в разных частях генома и сгруппированы преимущественно на хромосомах 3, 9 и 10.

Анализ уровня экспрессии идентифицированных генов в различных тканях томата проводили с помощью платформы TomExpress [6]. Анализ показал, что активность генов семейства

PAL томата варьируется в разных органах и тканях. Были проанализированы уровни экспрессии идентифицированных генов в корнях томатов сортов MicroTom и Heinz 1709. Были отмечены гены с самым высоким уровнем экспрессии. Это *Solyc09g007920*, *Solyc09g007900* для MicroTom и *Solyc10g086180*, *Solyc05g056170* для сорта Heinz 1709. *Solyc09g007920* также имеет относительно высокую экспрессию по данным экспрессии для сорта Heinz 1709. На основании полученных данных были выбраны гены для дальнейшего анализа: *Solyc10g086180*, *Solyc05g056170*, *Solyc09g007900*, *Solyc09g007910*, *Solyc09g007920*.

Для сравнения белковых последовательностей выбранных генов было проведено выравнивание с использованием Clustal W [7]. Наиболее существенным фактом является то, что гены *Solyc09g007900* и *Solyc09g007920* имеют только одну аминокислотную замену. Другие выбранные гены имеют больше различий в последовательностях белков.

Для функциональной характеристики выбранных генов также был проведен поиск цис-регуляторных элементов промоторной области этих генов с помощью инструмента Plant Care [8]. Несмотря на сходство белковых последовательностей, выбранные гены показали высокую вариабельность цис-регуляторных элементов. Группы элементов, участвующих в гормональной регуляции посредством абсцизовой и жасмоновой кислот, присутствуют в промоторных областях всех пяти генов. Кроме того, важным является наличие сайтов STRE и мотивов WUN [9], которые также характеризуют гены семейства PAL как стресс-индуцируемые.

Был проанализирован общий уровень экспрессии выбранных генов семейства PAL в томатах с помощью RT-qPCR. Была проанализирована экспрессия *SIPAL* после инкубации проростков томата с гидролизатом хитозана в течение 30 минут, 4 часов, 24 часов и 48 часов (рис. 1).

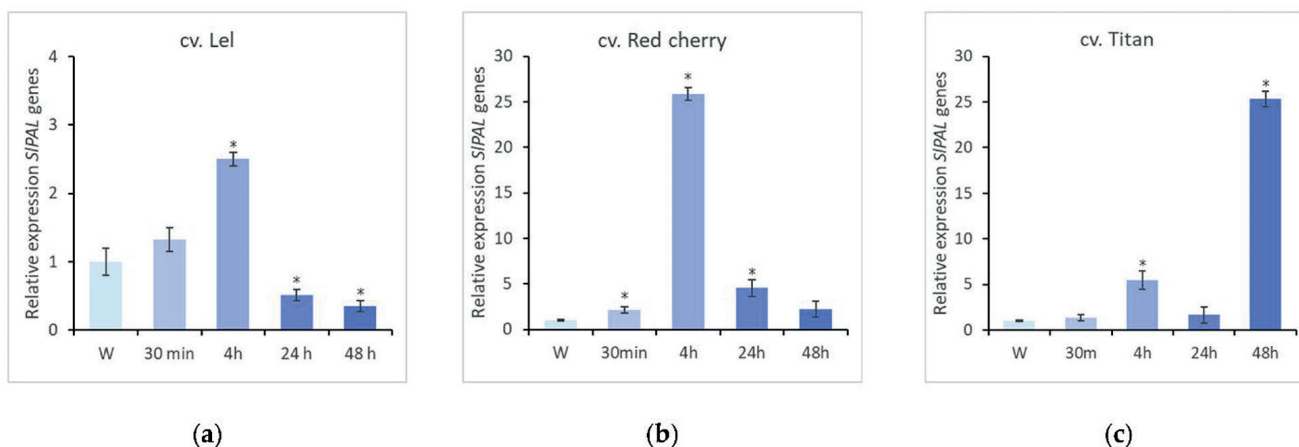


Рисунок 1. Относительная экспрессия *SIPAL* в корнях томатов через 30 минут, 4, 24 и 48 часов после обработки гидролизатом хитозана в концентрации 2 мг/мл и водой (W).

Экспрессию анализировали для (а) сорта Лель, (б) сорта Черри и (с) корней сорта Титан.

Результаты представлены в виде средних значений $\pm$ стандартное отклонение ($n = 9$) для каждого варианта.

(*) указывает на достоверную разницу по сравнению с контролем (W), $p < 0,01$

В корнях всех сортов томата экспрессия генов *SIPAL* значительно повышалась через 4 часа обработки гидролизатом хитозана. Для сорта Черри экспрессия была увеличена более чем в 25 раз по сравнению с контрольным вариантом. Через 30 минут после обработки экспрессия *SIPAL* значительно увеличивалась только для сорта Черри; через 48 ч экспрессия снова снизилась до уровня контроля. У сорта Лель наблюдалось устойчивое и достоверное снижение экспрессии *SIPAL*, которая через 24 ч была более чем в два раза ниже, чем в контроле, и далее снижалась через 48 ч. У сорта Титан экспрессия *SIPAL* повышалась в 25 раз по сравнению с контролем через 48 ч, однако через 24 ч уровень экспрессии не отличался от контроля.

Основные выводы:

Анализ семейства генов PAL выявил различную активность генов, на которую влияют ткань растения, и внешние стрессовые факторы, запускающие активацию цис-регуляторных элементов. Данные *in silico* выявили пять генов, которые могут вносить большую часть общей активности PAL в корнях. Выбранные гены имеют различные профили цис-регуляторных элементов, каждый из которых регулируется уникальным образом. Исследование активности генов *SIPAL* показало зависимость экспрессии от сорта томата, включая реакцию на обработку хитозаном. На основании полученных результатов можно предположить, что низкомолекулярный хитозан может способствовать регуляции активности PAL в корнях.

ЛИТЕРАТУРА

1. Jogaiah S. et al. Exogenous priming of chitosan induces upregulation of phytohormones and resistance against cucumber powdery mildew disease is correlated with localized biosynthesis of defense enzymes //International Journal of Biological Macromolecules. – 2020. – Т. 162. – С. 1825-1838.
2. Katiyar D., Hemantaranjan A., Singh B. Chitosan as a promising natural compound to enhance potential physiological responses in plant: a review //Indian Journal of Plant Physiology. – 2015. – Т. 20. – С. 1-9.
3. Shine M. B. et al. Cooperative functioning between phenylalanine ammonia lyase and isochorismate synthase activities contributes to salicylic acid biosynthesis in soybean //New Phytologist. – 2016. – Т. 212. – №. 3. – С. 627-636.
4. Fernandez-Pozo N., Menda N., Edwards J.D. et al. The Sol Genomics Network (SGN)-from Genotype to Phenotype to Breeding. Nucleic Acids Res. – 2015. Т. 43. – С. 1036-1041.
5. Shagdarova B. T. et al. Study of the protective activity of chitosan hydrolyzate against Septoria leaf blotch of wheat and brown spot of tobacco //Applied biochemistry and microbiology. – 2018. – Т. 54. – С. 71-75.
6. Zouine M. et al. TomExpress, a unified tomato RNA-Seq platform for visualization of expression data, clustering and correlation networks //The Plant Journal. – 2017. – Т. 92. – №. 4. – С. 727-735.
7. Thompson J. D., Higgins D. G., Gibson T. J. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice //Nucleic acids research. – 1994. – Т. 22. – №. 22. – С. 4673-4680.
8. Lescot M. et al. PlantCARE, a database of plant cis-acting regulatory elements and a portal to tools for in silico analysis of promoter sequences //Nucleic acids research. – 2002. – Т. 30. – №. 1. – С. 325-327.
9. Kojima T. et al. Transcriptional induction of capsidiol synthesis genes by wounding can promote pathogen signal-induced capsidiol synthesis //BMC plant biology. – 2019. – Т. 19. – С. 1-15.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ РАБОТЫ

Статьи в рецензируемых журналах:

1. Timofeeva T. A. et al. Phenylalanine Ammonia-Lyase-Mediated Differential Response of Tomato (*Solanum lycopersicum* L.) Cultivars with Different Stress Tolerance to Treatment with Low-Molecular-Weight Chitosan //Agronomy. – 2024. – Т. 14. – №. 2. – С. 386.
2. Timofeeva T. et al. The Effect of Chitosan Hydrolysate on *Solanum Lycopersicum* Plant Growth // KnE Life Sciences. – 2022. – P. 435–442.
3. Timofeeva T. A. et al. Low molecular weight chitosan hydrolyzate inhibits the growth of some phytopathogenic Ascomycota fungi //IOP Conference Series: Earth and Environmental Science. – IOP Publishing, 2021. – Vol. 839 (4). – P. 042027.

Тезисы докладов:

1. Тимофеева Т.А., Варламов В.П., Камионская А.М. Изучение активности генов корней томата при обработке гидролизатом хитозана. В сб.: Актуальные аспекты современной микробиологии: XIII молодежная школа-конференция с международным участием. Институт микробиологии им. С.Н. Виноградского, ФИЦ Биотехнологии РАН. Москва, 16–18 ноября 2022 г. – М.: Ваш Формат, 2022. – 286 с.; 2022: С. 256-257. (постерный доклад)
2. T. Timofeeva, B. Shagdarova, A. Zakurin Effect of chitosan hydrolysate on tomato seed germination and seedling growth. – FEBS Open Bio. – 2021. – P. 290. (постерный доклад)
3. Тимофеева Т.А., Штанько Д.А., Закурин А.О. Изучение влияния гидролизата хитозана на развитие проростков *Solanum lycopersicum* – В сб. тезисов докладов конференции молодых ученых «Биотехнология в растениеводстве, животноводстве и сельскохозяйственной микробиологии» – Москва, 2020, с. 187-188. (устный доклад)

Zhilkina Tatiana Alexeevna

RESEARCH CENTER OF BIOTECHNOLOGY RAS

STUDYING THE ACTIVITY OF THE PAL GENE FAMILY IN RESPONSE TO TREATMENT WITH LOW MOLECULAR CHITOSAN HYDROLYZATE

Abstract. *The chitosan effects researching showed that chitosan acts as a growth stimulator and elicitor for plants, includes increasing resistance to biotic and abiotic factors. In plants, phenylalanine ammonia-lyase (PAL) is an important enzyme in phenolics and phytoalexins biosynthesis, as well as the stress hormone salicylic acid. The work carried out an analysis of the PAL gene family and an analysis of gene expression in the roots of tomato seedlings of the Cherry, Lel and Titan varieties. The expression of SlPAL genes in seedlings of the Cherry variety increased 1.5 times after 48 hours, while in the Lel variety the expression steadily decreased in the presence of chitosan. The results obtained are intended to help understand the mechanisms underlying the effect of chitosan on plant development.*

Keywords: *chitosan hydrolysate, tomato, phenolics, phenylalanine ammonia-lyase, PAL.*

Калинин Данил Сергеевич

аспирант ФИЦ Биотехнологии РАН 3 года обучения

профиль 1.5.3 Молекулярная биология

e-mail: 309163@gmail.com

Научные руководители

Федоров Алексей Николаевич

доктор биологических наук,

з.н.с. лаборатории молекулярной биотехнологии

Грановский Игорь Эдуардович

кандидат биологических наук,

с.н.с. лаборатории молекулярной биотехнологии



ПОЛУЧЕНИЕ СТАБИЛЬНЫХ ЛИНИЙ КЛЕТОК МЛЕКОПИТАЮЩИХ, ПРОДУЦИРУЮЩИХ РАЗЛИЧНЫЕ ВАРИАНТЫ КОЛИЦИНА E9 И БЕЛКА ИММУНИТЕТА Im9

Аннотация. Работа направлена на изучение возможности использования неспецифической нуклеазы колицина E9 для подавления репродукции вируса африканской чумы свиней в культуре клеток млекопитающих. Получены стабильные клеточные линии HEK293T и VERO, которые кодируют колицин E9 с сигналами локализации в люмене или мембране ЭПР. Анализ экспрессии подтвердил соответствующую локализацию колицина в клетках. В полученных клеточных линиях наблюдалась умеренная токсичность колицина, что проявлялось в снижении скорости роста культуры. При цитоплазматической локализации колицин E9 был летальным для клеток. Для защиты клеток от вредоносного воздействия ДНКазы были получены стабильные линии клеток VERO, которые кодируют слитый с сигналом ядерной локализации белок иммунитета Im9 либо дикого типа, либо его модифицированный вариант, с сайтом протеазы pS273R вируса АЧС. Проведена их экспрессия и подтверждена их ядерная локализация. Показано эффективное расщепление модифицированного белка иммунитета протеазой pS273R в лизатах экспрессирующих клеток *in vitro*.

Ключевые слова: вирус АЧС, протеаза pS273R, колицин E9, белок иммунитета Im9.

Главной целью работы является разработка новых молекулярных механизмов устойчивости животных к вирусным инфекциям на клеточном уровне на примере вируса африканской чумы свиней (АЧС). Для этого будет разработана клеточная модель и апробирован подход к ограничению развития вируса, основанный на деградации вирусной ДНК неспецифической бактериальной нуклеазой колицин E9 (Col E9).

На первом этапе были проверены полученные ранее конструкции, кодирующие слитый с EGFP колицин E9, закоренный на цитоплазматической стороне ЭПР, внутри ЭПР или в цитоплазме. Для этого были получены стабильные клеточные линии HEK293T, кодирующие Col E9. Экспрессия колицина была индуцирована в клетках доксициклином, и клетки исследованы методами флуоресцентной микроскопии (Рис. 1) и вестерн-блот анализа (данные не приведены). Флуоресценция EGFP наблюдалась в клетках, экспрессирующих ОРС колицина с сигналом локализации мембране или люмене ЭПР (Рис.1 A2 и B2). Получить клеточные линии, экспрессирующие цитоплазматический вариант колицина, не удалось ввиду его высокой токсичности.

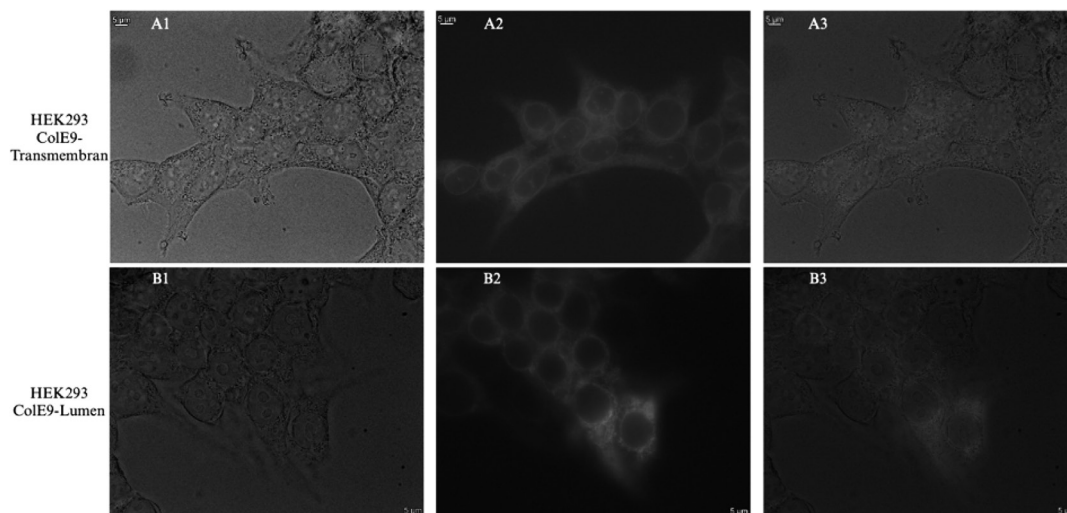


Рис. 1. Микрофотографии клеток HEK 293Т, экспрессирующих колицин Е9 с сигналом локализации в мембране ЭПР или с доменом локализации в люмене ЭПР (В).

Получено с помощью флуоресцентного микроскопа. 1 – светловольное изображение в проходящем свете; 2 – зеленый канал, флуоресценция EGFP в области 505 нм; 3 – наложение 1 и 2

Культура клеток почки африканской зеленой мартышки VERO была выбрана для дальнейшей в качестве модельной в связи с тем, что к ней адаптирован штамм BA71V вируса АЧС. По аналогии с HEK293Т были получены стабильные клеточные линии VERO с тремя вариантами локализации колицина Е9. Сравнительный клоногенный анализ клеток, трансформированных векторной ДНК или конструкциями, кодирующими колицин Е9, позволил установить, что рост культуры замедляется в 6 и в 5 раз при локализации колицина в мембране или люмене ЭПР соответственно.

Для защиты клеток от вредоносного воздействия неспецифической ДНКазы были получены стабильные линии клеток VERO, которые кодируют белок иммунитета Im9 либо дикого типа (Im9 WT), либо его модифицированный вариант с сайтом протеазы pS273R вируса АЧС (Im9 1.4). Данные линии клеток были культивированы в присутствии доксициклина, и экспрессия белков иммунитета проанализирована методами флуоресцентной микроскопии (Рис. 2). Результаты анализа позволяют судить о преобладающем нахождении белка иммунитета непосредственно в ядре клетки.

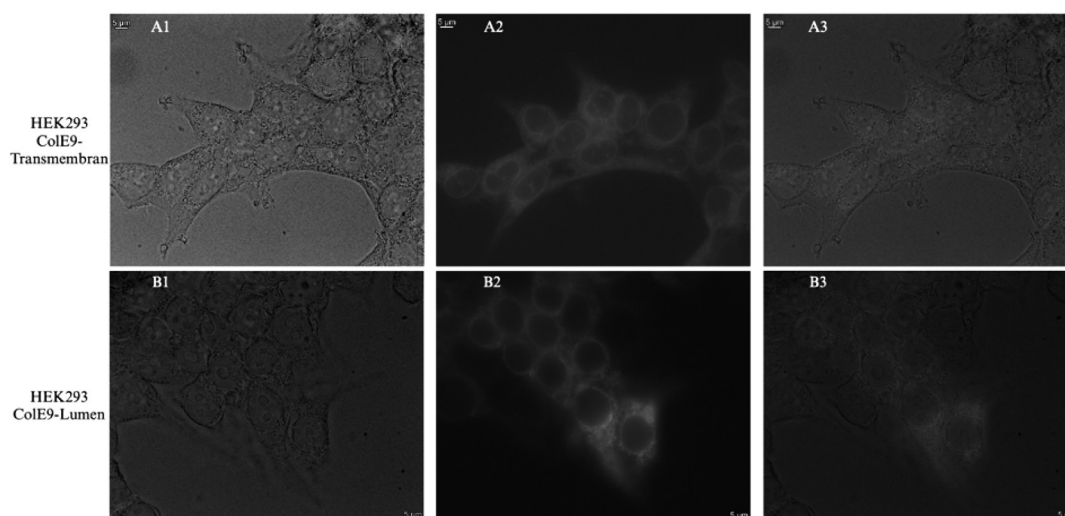


Рис. 2. Микрофотографии клеток VERO, экспрессирующих Im9 1.4 (А) или Im9 WT (В).

Получено с помощью флуоресцентного микроскопа. 1 – светловольное изображение в проходящем свете; 2 – зеленый канал, флуоресценция tagYFP в области 524 нм; 3 – наложение 1 и 2

Анализ последовательностей полибелков pp62 и pp220 в области сайтов процессинга позволил выявить консенсус GG↓X только в области сайта гидролиза протеазы pS273R (указан стрелкой). Тем не менее, протеаза вируса АЧС не расщепляет белки в любых участках, содержащих два остатка глицина подряд, что свидетельствует о структуро-специфическом узнавании субстрата. Мы проверили, сохраняет ли субстратную специфичность препарат полученной нами рекомбинантной протеазы pS273R.

В качестве субстрата для протеазы pS273R был использован белок ASF-GFP (46,4 кДа), который получен слиянием тиоредоксина *E. coli* и EGFP. Между ними находится сайт вирусной протеазы (YKRRKEGG↓GNPD) из полибелка pp62 вируса АЧС. При специфическом расщеплении субстрата ASF-GFP протеазой pS273R образуется два протеолитических фрагмента с молекулярным весом 29,1 и 17,3 кДа, которые можно разделить электрофорезом в ПААГ. Поскольку фрагмент большего размера представлен EGFP то за гидролизом можно наблюдать по флуоресценции субстрата и протеолитического продукта в ПААГ в нативных условиях.

Как видно из рисунка 3, протеаза pS273R расщепляет субстрат ASF-GFP в присутствии значительного количества разнообразных белков клеток VERO так же эффективно, как и в их отсутствии. Таким образом, полученный препарат протеазы pS273R сохраняет специфичность фермента, экспрессируемого в клетках млекопитающих при вирусной инфекции.

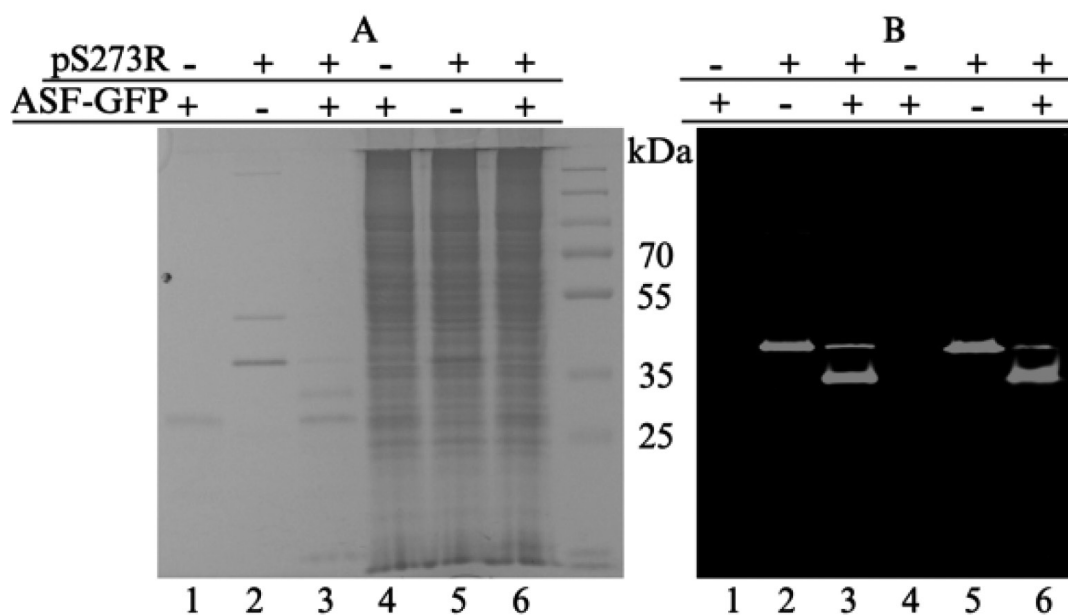


Рис. 3. Анализ специфичности протеазы pS273R. Субстрат ASF-GFP был обработан протеазой pS273R в отсутствии (дорожки 1–3) или в присутствии лизатов клеток VERO (дорожки 4–6).

После обработки протеазой к образцам добавляли буфер для нанесения на гель, не содержащий ДДС-Na, и разделяли электрофорезом в ПААГ. А – гель окрашен кумасси G-250; В – флуорограмма геля А до окрашивания G-250. Дорожки: 1, 4 – pS273R; 2, 5 – ASF-GFP; 3, 6 – ASF-GFP, обработанный протеазой pS273R

Аналогичным образом были исследованы лизаты клеток VERO Im9 1.4 и VERO Im9 WT (Рис. 4). Специфическое расщепление Im9 1.4 (39 кДа) протеазой pS273R будет приводить к образованию двух протеолитических фрагментов с молекулярным весом 32 и 7 кДа, которые могут быть разделены электрофоретически и детектированы методом вестерн-блоттинга с антителами к tagYFP (Рис. 4 А) или методом анализа флуоресценции в геле (Рис. 4 В1). По изменению подвижности в геле можно заключить, что протеаза pS273R специфически расщепляет модифицированный белок иммунитета, но не белок иммунитета дикого типа.

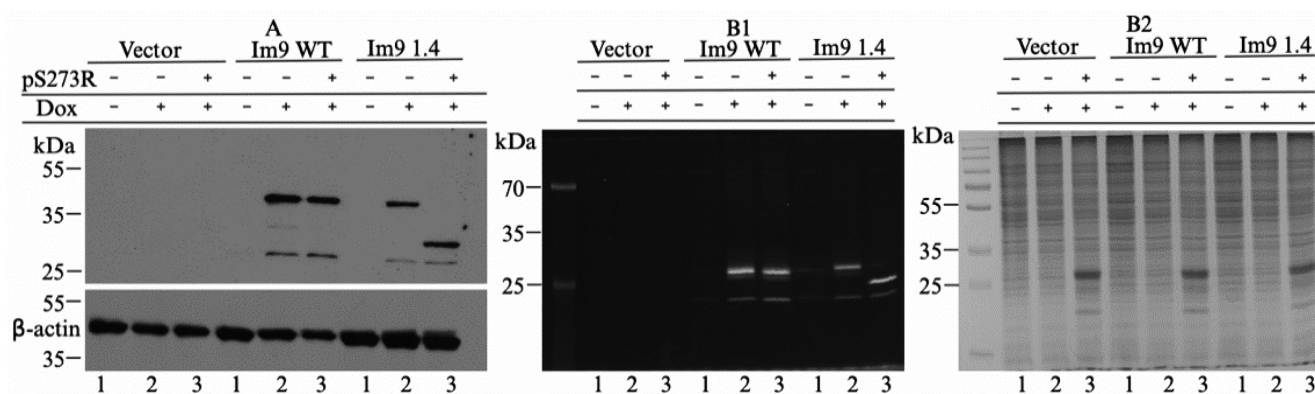


Рис. 4. Экспрессия Im9 WT и Im9 1.4 в клетках VERO, анализ специфического расщепления белка иммунитета Im9 1.4 протеазой pS273R. Клетки VERO, трансформированные вектором (Vector) или кодирующие белки иммунитета (Im9 WT и Im9 1.4) растили в присутствии или отсутствии доксициклина (Dox). Из этих клеток были получены лизаты, обработанные вирусной протеазой (pS273R), и белки разделены в ПААГ. (A) – вестерн-блот анализ с антителами к tagYFP, (B1) – флуорограмма ПААГ (образцы не денатурировали), (B2) – гель B1 окрашен кумасси G-250

Основные выводы:

Получены стабильные линии клеток млекопитающих HEK293T и VERO, которые кодируют колицин E9 с сигналами локализации в люмене или мембране ЭПР, и подтверждена их локализация в соответствующих компартментах клетки. Показано, что колицин E9 замедляет рост экспрессирующих клеток. Получены стабильные клеточные линии VERO, кодирующие белок иммунитета дикого типа, и модифицированный, с сайтом узнавания протеазы pS273R вируса АЧС, и показана их ядерная локализация. Модифицированный белок иммунитета способен специфически расщепляется вирусной протеазой в клеточных лизатах *in vitro*.

Kalinin Danil Sergeevich
RESEARCH CENTER OF BIOTECHNOLOGY RAS

CONSTRUCTION OF STABLE MAMMALIAN CELL LINES PRODUCING DIFFERENT VARIANTS OF COLICIN E9 AND IMMUNITY PROTEIN Im9

Abstract. *The work is aimed at studying the possibility of using the non-specific nuclease colicin E9 to inhibit the reproduction of African swine fever virus in mammalian cell culture. Stable cell lines HEK293T and VERO, which encode for colicin E9 with localization signals in the lumen or in the membrane of ER, were constructed. Expression analysis confirmed the appropriate localization of colicin in the cells. Moderate colicin toxicity was observed in the obtained cell lines, which was manifested by a decrease in culture growth rate. In case of cytoplasmic localization, colicin E9 was lethal to cells. To protect cells from the deleterious effects of DNase, stable VERO cell lines were generated that encode an immunity protein Im9 fused to the nuclear localization signal, either wild-type or its modified version, with the site of the ASFV pS273R protease. Their expression was performed and their nuclear localization was confirmed. Efficient cleavage of the modified immunity protein by pS273R protease in lysates of expressing cells was demonstrated in vitro.*

Keywords: ASF virus, protease pS273R, colicin E9, immunity protein Im9.

Кузнецов Александр Сергеевич

аспирант ФИЦ Биотехнологии РАН 3 года обучения

профиль 1.5.11 Микробиология

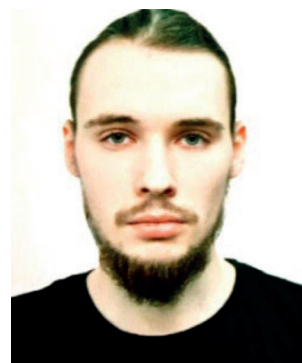
e-mail: alexbluesking@gmail.com

Научный руководитель

Летаров Андрей Викторович

доктор биологических наук,

зав. лабораторией вирусов микроорганизмов



ПОТЕНЦИАЛЬНАЯ ФУНКЦИЯ БЕЛКОВ GR84 И GR47 БАКТЕРИОФАГА Ф24В

Аннотация. *Stx-конвертирующие колифаги, обуславливающие токсигенность патогенных изолятов *Escherichia coli*, нередко кодируют белки с эстеразной активностью. Функция таких эстераз у данной группы вирусов до конца неясна. Ранее считалось, что гены этих ферментов участвуют в конверсии зараженных клеток, расширяя спектр используемых ими субстратов. В рамках данной работы показано, что белок семейства *panS-p*, *gr84* *Stx*-фага ф24В присутствует в составе частиц этого вируса, при этом он может быть представлен как полноразмерной (в свежем препарате фага), так и укороченной формой (в образцах более длительного хранения). Также показано, что инкубация свежеполученного препарата фага ф24В с муцином приводила к увеличению биологического титра фага примерно на порядок, однако подобное не наблюдалось для образцов препарата более длительного хранения. Помимо этого, в работе выдвинуты предположения касательно роли белка *gr47* в инфекционном процессе этого бактериофага.*

Ключевые слова: *Stx-фаги, структурные белки вирусов, протеомный анализ, эстераза, нейраминидаза, внутреннее тело, муцин, процессинг белков.*

Умеренные *Stx-конвертирующие* бактериофаги обуславливают наиболее опасный вариант токсигенности у бактерий *Escherichia coli*. Известно, что многие *Stx-фаги* кодируют белки семейства *panS-p* и *panS-ps*, обладающие ацетилэстеразной (нейраминидазной) активностью [1]. Эти ферменты катализируют реакции гидролиза гликозидной связи между остатками 5-N-ацетил-9-O-нейраминовой кислоты (Neu5,9Ac2) и серина/треонина в составе муцина кишечника. Таким образом, продукты генов *panS-p* осуществляют отщепление остатков сиаловой кислоты от полипептидного каркаса муцина.

Один из наиболее распространенных *Stx-конвертирующих* колифагов фаг ф24В имеет ген *panS-p*-ацетилэстеразы *g84*. Некоторые авторы [2] предполагают, что синтез белка *gr84* является частью лизогенной или литической конверсии, так как продукция этого белка позволяет зараженной клетке гидролизовать гликозидную связь в протеогликанах мукоидного слоя стенки кишечника, что улучшает подвижность клеток в вязкой среде и позволяет им использовать отщепленные моносахаридные остатки в качестве дополнительного источника углерода. Однако тот факт, что ген *g84* располагается в геноме фага ф24В в кластере поздних генов (GenBank: NC_027984.1), ответственных за литическую инфекцию, позволяет предположить, что продукт этого гена – белок *gr84* – может быть вовлечен в процессы морфогенеза вирусных частиц или лизиса клетки-хозяина.

Появление шигатоксигенных *E. coli* (Shiga toxigenic *E. coli*, STEC) подразумевает первоначальную адсорбцию Stx-фага на поверхности чувствительной бактериальной клетки и последующее проникновение геномной ДНК вируса в цитоплазму. Известно, что в качестве конечного рецептора Stx-конвертирующий фаг ф24В на поверхности клетки распознает жизненно необходимый белок VatA, аминокислотная последовательность которого является высоко консервативной для всех вариантов *E. coli*. Тем не менее, не выяснено, каким образом в процессе инфицирования клетки фагом ф24В ДНК вируса преодолевает внешнюю мембрану, периплазму, а также внутреннюю мембрану. Поскольку ф24В является подовирусом, т. е. фагом с коротким несократимым хвостом, процесс эжекции его ДНК может быть связан с формированием транспериплазматического канала белками т. н. «внутреннего тела» («inner core») [3], хотя оптическая плотность, которая соответствовала бы такой структуре внутри капсидов не была обнаружена [4]. Поскольку белки транспорта вирионной ДНК через клеточную стенку грамотрицательных бактерий должны формировать длинный канал, который бы проходил сквозь всю периплазму, они, как правило, обладают большой молекулярной массой. При этом gr47, самый крупный белок фага ф24В, представленный 2807 аминокислотными остатками и массой около 309,5 кДа, обладает пока не выясненными функциями и может принимать непосредственное участие в эжекции ДНК этого бактериофага.

В ходе данной работы путем модифицированной методики приготовления фаговых препаратов [4] мы получили очищенную и диализованную суспензию частиц фага ф24В. Затем провели анализ данного препарата при помощи просвечивающей электронной микроскопии (ПЭМ) с негативным контрастированием (рис. 1А) и криоэлектронной микроскопии (крио-ЭМ) (рис. 1Б). Интересно, что некоторые образцы, которые могли подвергнуться дополнительным аperiодическим вибрациям (тряске) в процессе транспортировки, содержали палочковидные выросты, отходящие от хвоста (рис. 1В). Мы полагаем, что это транспериплазматические трубки, сформированные белком gr47 преждевременно в ответ на механические воздействия.

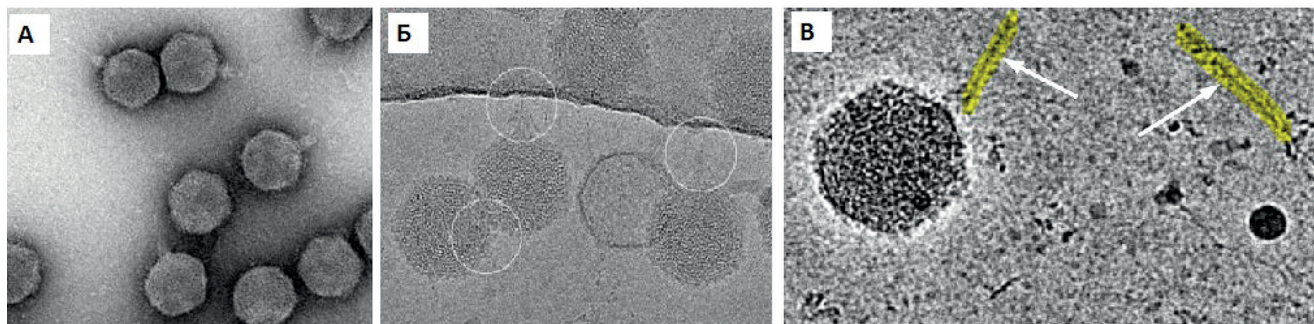


Рисунок 1. Электронные микрофотографии препаратов ф24В:

- А) ПЭМ, негативное контрастирование уранил ацетатом; Б) крио-ЭМ, хвосты обведены белыми окружностями;
В) крио-ЭМ, белыми стрелками отмечены палочковидные структуры, предположительно каналы для транспорта ДНК фага в цитоплазму

Далее на основе диализованного препарата фага ф24В совместно с коллегами из Института системной биологии и медицины был проведен протеомный анализ с использованием методов вертикального электрофореза белков в ПААГ (рис. 2) (предварительная стадия в случае анализа белков отдельных полос в геле) и трипсинолиза с ВЭЖХ-масс-спектрометрией (табл. 1). Таким образом, мы получили данные о структурном протеоме этого фага, т. е. о белках, входящих в состав вирусных частиц. Среди структурных белков вируса ф24В были обнаружены ожидаемые мажорные белки фага (например, главный белок капсида gr69), а также белок gr47, что говорит

о включении его в состав вириона. Помимо этого, в образцах был идентифицирован белок gp84, который ранее не рассматривался в качестве структурного белка фага ф24В.

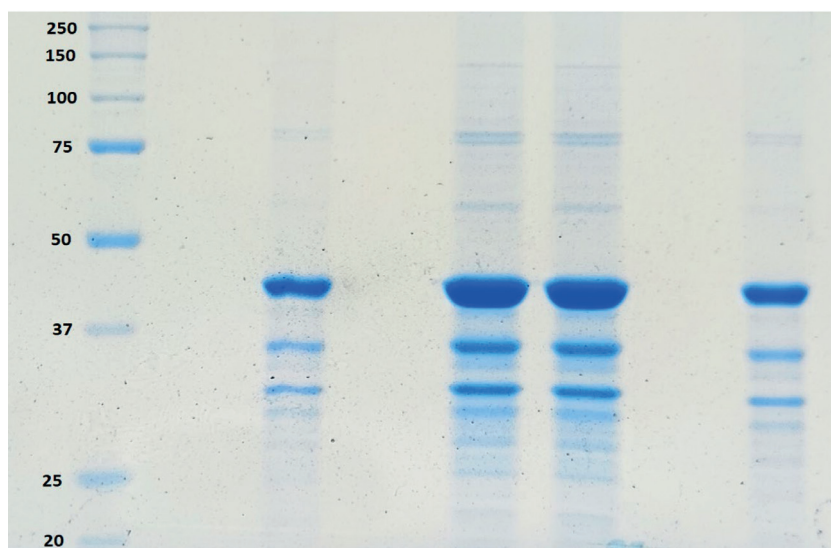


Рисунок 2. Электрофореграмма тотального белка очищенного и диализованного препарата фага ф24В, слева – белковый маркер, числа отражают значения молекулярной массы полипротеинов в кДа

Таблица 1.

Данные, полученные на основе трипсинолиза и ВЭЖХ-масс-спектрометрии полос, вырезанных из геля (см. рис. 2). Жирным выделены строки, соответствующие белкам gp47 и gp84.

Номер полосы в геле	Предположительная молекулярная масса, кДа	Название и предположительная функция белка
1 (EA1805)	309,5	gp47
2 (EA1810)	81,1	gp72 (белок портала)
3 (EA1811)	63,9 / 73,8	gp61 (белок хвостовых шипов)
4 (EA1813)	61,6	gp57 (белок «сопла» хвоста)
5 (EA1815)	47,0	gp48 (транскрипционный фактор)
6 (EA1816)	44,9	gp69 (главный белок капсида)
	45,5	gp56 (белок осевой фибриллы хвоста)
7 (EA1817)	36,7	gp70
8 (EA1819)	~35	gp84 (эстераза), процессированная форма
9 (EA1826)	25,5	gp64 (адаптор хвостовой трубки 1)
	23,6	gp62 (адаптор хвостовой трубки 2)
	22,6	gp51

Белок gp84 присутствовал в пробах в двух формах — полноразмерной (68,6 кДа) и кроткой (~35 кДа) (рис. 3), при этом в свежеприготовленном диализованном препарате он сохранялся практически в интактном виде, а в образце более длительного хранения почти весь пул gp84, вероятно, был процессирован.

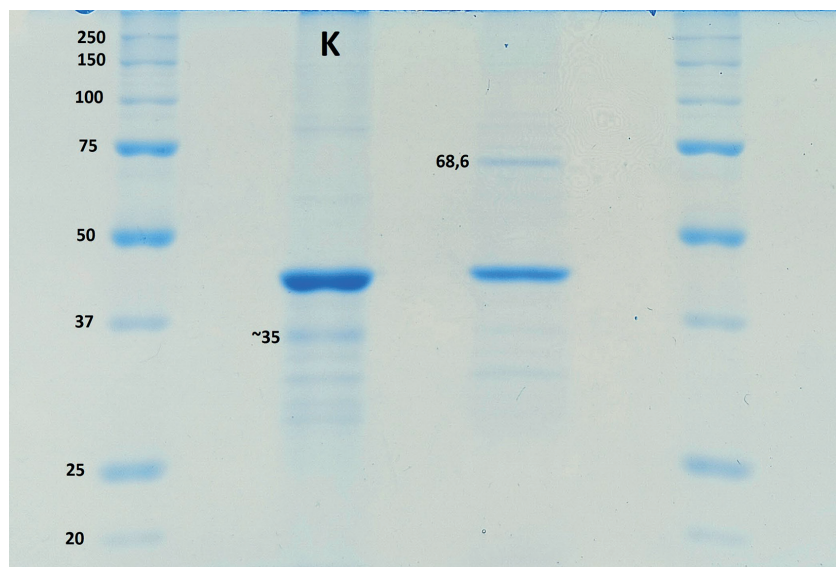


Рисунок 3. Электрофореграмма тотального белка свежеприготовленного (дорожка справа) очищенного и диализованного препарата фага ф24В, в качестве контроля нанесен тотальный белок препарата долгого хранения (К, дорожка слева), крайние дорожки справа и слева – белковый маркер, числа отражают значения молекулярной массы полипротеинов в кДа

Для оценки влияния наличия полноразмерного gr84 на взаимодействия бактериофага ф24В с муцином мы инкубировали свежеприготовленные препараты фага и препараты длительного хранения с раствором муцина в PBS (конечная концентрация муцина в инкубационной смеси — 4,5 мг/мл) в течение 2 часов, после чего определяли биологический титр фага в данных образцах на чувствительном штамме *E. coli* MG1655 путём раскапывания серии десятикратных разведений на бактериальный «газон» методом двойного агара по Грациа. В рамках данного эксперимента мы также произвели контрольную инкубацию этих же фаговых препаратов с раствором PBS. Результаты эксперимента показали, что титр фага ф24В в свежеприготовленном препарате после инкубации с муцином повышается примерно на один порядок, в то время как в препарате с большей продолжительностью хранения такого эффекта не наблюдается (рис. 4)

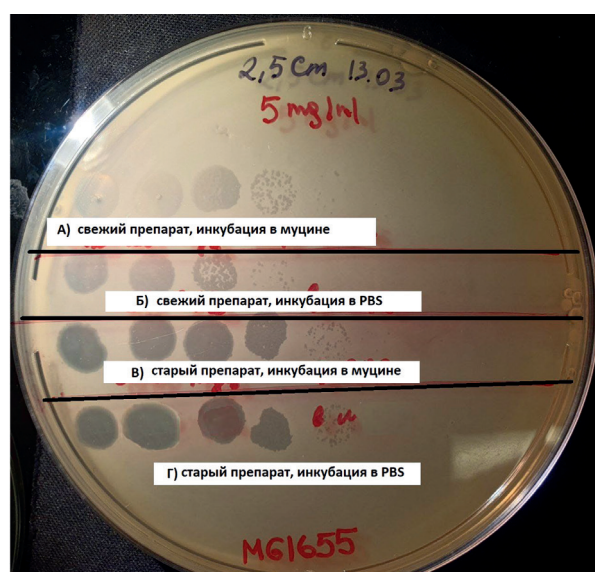


Рисунок 4. Результаты титрования фага ф24В на штамме *E. coli* MG1655 после двухчасовой инкубации с добавлением муцина (опыт) или PBS (контроль). Значения биологического титра фага, БОЕ/мл:
А) $1,2 \times 10^9$; Б) $1,24 \times 10^8$; В) $5,2 \times 10^9$; Г) $7,2 \times 10^9$

Полученные в данной работе результаты говорят о том, что белки gp47 и gp84 включаются в состав частиц фага ϕ 24B. При этом gp47, вероятно, является необходимым для размножения этого вируса, так как предположительно формирует канал для эжекции ДНК в цитоплазму. Белок gp84 также является структурным, однако со временем претерпевает процессинг, возможно, автопротеолиз. Мы предполагаем, что непротессированная форма gp84 в составе фаговой частицы взаимодействует с муцином, что приводит к повышению эффективности адсорбции на поверхности клетки-мишени. Таким образом, белок gp84, предположительно, может играть неочевидную роль в регуляции степени «инфекционности» частиц фага ϕ 24B, которая зависит от их микроокружения.

Основные выводы:

Впервые для Stx-конвертирующего бактериофага ϕ 24B был исследован протеом вирусных частиц. Среди идентифицированных структурных белков наиболее интересными представляются белки gp47 и gp84. Белок gp47 с молекулярной массой 309,5 кДа является самым крупным белком данного вируса и обладает неизвестной функцией. На основании анализа протеомных данных и крио-ЭМ изображений частиц фага ϕ 24B мы предполагаем, что gp47 в процессе фаговой инфекции формирует канал через переплазму, необходимый для эжекции вирусной ДНК. Белок gp84, обладающий нейраминидазной активностью, входит в состав вириона и со временем подвергается протеолизу. Исходя из эксперимента по инкубации препаратов бактериофага с муцином, мы предполагаем, что вирионы, несущие полноразмерный белок gp84, взаимодействуют с муцином, что приводит к повышению биологического титра фага в препарате.

ЛИТЕРАТУРА

1. Rodríguez-Rubio L. *et al.* Bacteriophages of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* and their contribution to pathogenicity //Pathogens. – 2021. – Т. 10. – №. 4. – С. 404.
2. Franke B. *et al.* Structural annotation of the conserved carbohydrate esterase vb_24B_21 from Shiga toxin-encoding bacteriophage Φ 24B //Journal of Structural Biology. – 2020. – Т. 212. – №. 1. – С. 107596.
3. Pérez-Ruiz M. *et al.* Assisted assembly of bacteriophage T7 core components for genome translocation across the bacterial envelope //Proceedings of the National Academy of Sciences. – 2021. – Т. 118. – №. 34. – С. e2026719118.
4. Кузнецов А.С., Моисеенко А.В., Куликов Е.Е., Летаров А.В. Изучение трехмерной структуры вириона Stx-конвертирующего бактериофага ϕ 24B методами кроэлектронной микроскопии // Микробиология – 2024. – Т. 93. – №. 3.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ РАБОТЫ

Статьи в рецензируемых журналах:

1. Кузнецов А.С., Моисеенко А.В., Куликов Е.Е., Летаров А.В. Изучение трехмерной структуры вириона Stx-конвертирующего бактериофага ϕ 24B методами кроэлектронной микроскопии // Микробиология – 2024. – Т. 93. – №. 3.
2. Golomidova A. K., Efimov A. D., Kulikov E. E., Kuznetsov A. S., Belalov I. S., Letarov A. V. O antigen restricts lysogenization of non-O157 *Escherichia coli* strains by Stx-converting bacteriophage ϕ 24B //Scientific reports. – 2021. – Т. 11. – №. 1. – С. 1-9.

Тезисы докладов:

1. Кузнецов А., Куликов Е.Е., Моисеенко А.В., Голомидова А.К., Ефимов А.Д., Москаленко О.Д., Датская С.А., Летаров А.В. Подходы к изучению системы «фаг-бактерия» на при-

- мере инфекции штаммов *Escherichia coli* Stx-конвертирующим бактериофагом Ф24В // Биосистемы: организация, поведение, управление: Тезисы докладов 77-й Международной школы-конференции молодых ученых – Н. Новгород, Университет Лобачевского – 2024. – С. 192. (постерный доклад, диплом I степени за лучший стендовый доклад в секции «Микробиология»)
2. Kuznetsov A., Moiseenko A., Golomidova A., Kulikov E., Sokolova O., Letarov A. Stx-phage ф24В interactions with *Escherichia coli* cell surface //Viruses of Microbes Program and Abstract book – Tbilisi – 2023. – С. 254 (PS4&5-VHI-C3-155) (постерный доклад)
 3. Кузнецов А.С., Голомидова А.К., Моисеенко А.В., Куликов Е.Е., Летаров А.В. Взаимодействие Stx-фага Ф24В с поверхностью клеток *Escherichia coli* //4-й Российский микробиологический конгресс – 2023. – С. 34-35. (постерный доклад)
 4. Кузнецов А.С., Голомидова А.К., Моисеенко А.В., Летаров А.В. Биологические и структурные особенности Stx-конвертирующего бактериофага Ф24В //Материалы всероссийской конференции «От микробиологии к генетическим технологиям». – Новосибирск, 2023 – С. 48 [ISBN 978-5-85957-207-6] (устный доклад, диплом победителя конкурса молодых ученых)
 5. Кузнецов А.С., Куликов Е.Е., Голомидова А.К., Летаров А.В. Потенциальная роль белка gp56 в адсорбции Stx-конвертирующего бактериофага Ф24В //Актуальные аспекты современной микробиологии: XIII молодежная школа-конференция с международным участием. Институт микробиологии им. С.Н. Виноградского, ФИЦ Биотехнологии РАН. Москва, 16-18 ноября 2022 г. – Москва – 2022 - С. 130-132 [ISBN 978-5-00147-435-7] (постерный доклад)
 6. Кузнецов А.С., Ефимов А.Д., Бойко К.М., Голомидова А.К., Куликов Е.Е., Летаров А.В. Распознавание клетки-хозяина бактериофагом ф24В //3-й Российский микробиологический конгресс [ISBN 978-5-6046553-7-5] — Псков, 2021. - С. 211-212. (постерный доклад, диплом победителя в конкурсе молодых ученых).
 7. Куликов Е.Е., Голомидова А.К., Ефимов А.Д., Кузнецов А.С., Летаров А.В. Лизогенизация штаммов *Escherichia coli*, не относящихся к серотипу O157, Stx-конвертирующим бактериофагом phi24В связана с потерей О-антигена и снижением приспособленности //3-й Российский микробиологический конгресс [ISBN 978-5-6046553-7-5] – Псков, 2021. – С. 212. (постерный доклад)
 8. Кузнецов А.С., Куликов Е.Е., Летаров А.В. Особенности роста бактериофага λ_2В8 //Труды 64-й Всероссийской научной конференции МФТИ. Биологическая и медицинская физика [ISBN 978-5-7417-0789-0] – 2021. – С. 145-146. (устный доклад, диплом за лучший устный доклад в секции биотехнологии, физико-химической и молекулярной биологии).

Alexander Sergeevich Kuznetsov
RESEARCH CENTER OF BIOTECHNOLOGY RAS

POTENTIAL FUNCTION OF PROTEINS GP84 AND GP47 OF BACTERIOPHAGE Ф24В

Abstract. *Stx-converting coliphages, which determine the toxigenicity of pathogenic *Escherichia coli* isolates, often encode proteins with esterase activity. The function of such esterases in this group of viruses is not completely clear. Previously, it was believed that they are involved in the conversion of infected cells, expanding their range of substrates. In this work, it was shown that the Stx phage ф24В gp84 protein from nanS-p family is present in the virion, and it can be detected in a full-length*

(in a fresh phage preparation) or in a shortened form (in longer-term storage samples). It was also shown that incubation of a freshly obtained phage ϕ 24B preparation with mucin led to an increase in the biological titer of the phage by approximately an order of magnitude, what was not observed in case of the preparation with longer storage. In addition, the work puts forward assumptions regarding the role of the gp47 protein in the infectious process of this bacteriophage.

Keywords: *Stx phages, coliphages, structural proteins of viruses, proteomic analysis, esterase, neuraminidase, inner core, mucin, protein processing.*

Кулакова Анастасия Владимировна
аспирант ФИЦ Биотехнологии РАН 3 года обучения
профиль 1.5.6 Биотехнология
e-mail: kulakova_97@mail.ru

Научный руководитель
Кочиева Елена Зауровна
доктор биологических наук, профессор
зав. лаборатории системной биологии растений



ВЛИЯНИЕ ВТОРИЧНЫХ МЕТАБОЛИТОВ НА УСТОЙЧИВОСТЬ К ХОЛОДОВОМУ СТРЕССУ У КАРТОФЕЛЯ

Аннотация. Каротиноиды – одни из важнейших вторичных метаболитов растений, которые являются ценными компонентами фотосинтеза и стрессовой адаптации растений. У картофеля (*Solanum tuberosum*) вопрос стрессоустойчивости занимает важное место. При низкой температуре клубни картофеля подвергаются явлению, известному как холодовое осахаривание, при котором скорость превращения крахмала в редуцирующие сахара увеличивается, что приводит к изменению товарного вида и ухудшению вкусовых качеств. В случае проростков картофеля значимым является устойчивость к весеннему кратковременному похолоданию. Для выявления возможных генов и генных путей, вовлеченных в устойчивость к холодовому стрессу, был получен транскриптом сорта картофеля Барин в нормальных условиях и в условиях долговременного (7-ми месячного) низкотемпературного стресса, проведен его анализ, по результатам которого выявлены DEGs, связанные со вторичными метаболитами, в том числе с генами биосинтеза каротиноидов. По результатам исследования был проведен биохимический анализ содержания каротиноидов в клубнях картофеля и проанализированы паттерны экспрессии 18 генов биосинтеза и накопления каротиноидов в динамике длительного (7 месяцев, сентябрь-апрель) холодового хранения клубней картофеля пяти сортов. Было показано, что длительное низкотемпературное хранение клубней характеризуется значительным снижением уровней транскриптов всех генов каротиногенеза в феврале по сравнению с сентябрем. Были идентифицированы и охарактеризованы гены *StPSY*, кодирующие ключевой фермент каротиногенеза – фитоинсинтазу. Был проведен анализ профиля экспрессии генов *StPSY1*, *StPSY2* и *StPSY3* в ответ на кратковременный холодовой стресс.

Выявлено, что все три гена *StPSY* активируются при снижении температуры, и наибольшая реакция наблюдается для *StPSY1*.

Ключевые слова: сорта картофеля, холодовый стресс, холодовое осахаривание, вторичные метаболиты, каротиноиды, экспрессия гена.

Картофель (*Solanum tuberosum* L.) является важным продуктом питания во всем мире благодаря своей универсальности и питательной ценности. Хранение клубней картофеля при низких температурах (4–8 °C) является неотъемлемой частью послеуборочной обработки культуры для продления срока хранения, уменьшения прорастания и гниения. Однако такое хранение при пониженных температурах вызывает накопление редуцирующих сахаров в клубнях картофеля, называемое холодовым осахариванием (CIS) [1]. CIS возникает из-за вызванного холодом дисбаланса между скоростью распада крахмала и его метаболизмом, что приводит к повышению со-

держания глюкозы и фруктозы в клубнях [2]. В процессе послеуборочного низкотемпературного хранения синтезируются также и вторичные метаболиты, такие как каротиноиды и антоцианы, которые играют важную роль в защите от оксидативного стресса.

Каротиноиды являются одними из наиболее важных вторичных метаболитов растений, которые являются важными компонентами механизмов фотосинтеза и фотозащиты [3]. Содержание каротиноидов в корнеплодах важно, прежде всего, для стрессовой адаптации растений. У картофеля вопрос стрессоустойчивости занимает важное место, при этом исследования каротиногенеза часто ограничены анализом клубней на содержание каротиноидов и отдельных генов. Анализируя литературные данные, растения картофеля недостаточно охарактеризованы по содержанию каротиноидов и экспрессии генов каротиногенеза в динамике низкотемпературного хранения клубней и кратковременного действия холодового стресса на проростки, что делает актуальным изучение данной тематики.

Задачей третьего года аспирантуры стало получение и анализ транскриптома, изучение путей биосинтезов каротиноидов и определение профилей их экспрессии в ответ на долговременный и кратковременный холодовый стресс у сортов *S. tuberosum*.

По результатам биохимического анализа были отобраны пять сортов картофеля, которые отличались по содержанию каротиноидов в клубнях. Основываясь на этих данных, был впервые определен профиль экспрессии (PB-ПЦР) 16 генов пути каротиногенеза, в том числе выявленные при анализе транскриптома (*PSY1*, *PSY2*, *PSY3*, *PDS*, *ZDS*, *Z-ISO*, *CRTISO*, *LCYB1*, *LCYB2*, *LCYE*, *VDE*, *ZEP*, *NSY*, *NCED1*, *NCED2*, *NCED6*), а также генов (*OR1*, *OR2*), участвующие в накоплении каротиноидов, в динамике длительного холодового хранения клубней пяти сортов (+3 °C, 7 месяцев). Также проведена оценка корреляции активности генов с суммарным содержанием каротиноидов в клубнях.

Для всех сортов был характерен высокий уровень транскриптов почти всех анализируемых генов биосинтеза каротиноидов перед закладкой на хранение в сентябре. Анализ полученных экспрессионных паттернов всех проанализированных генов каротиногенеза показал, что длительное низкотемпературное хранение клубней характеризуется значительным снижением уровней транскриптов в феврале по сравнению с сентябрем, за некоторыми исключениями. Это может свидетельствовать об активно протекающем биогенезе каротиноидов на момент сбора урожая и о состоянии физиологического покоя клубней при хранении. В то же время вариации экспрессии генов, относящихся к разным этапам каротиногенеза, могут быть связаны с изменениями в типах каротиноидов, которые синтезируются и накапливаются в процессе хранения клубней. В период с февраля по апрель уровень транскриптов генов изменяется незначительно. мРНК *OR1* и *OR2* присутствуют в клубнях всех сортов на всех этапах хранения. Биохимический анализ содержания каротиноидов в динамике холодильного хранения показывает, что во время хранения с сентября по апрель общее количество каротиноидов в клубне изменялось в зависимости от генотипа без какой-либо тенденции, характерной для всех сортов. Не было выявлено зависимости между уровнями транскриптов отдельных генов и суммарным содержанием пигмента, за исключением корреляции для гена *PDS*.

Ранее было показано, что ключевым ферментом каротиногенеза является фитоинсинтаза *PSY*, контролирующая первый этап синтеза каротиноидов. Проведенный экспрессионный анализ генов фитоинсинтаз (*PSY1*, *PSY2*, *PSY3*) показал, что при продолжительном низкотемпературном хранении клубней уровень транскриптов всех трех генов сначала снижается, а затем, к моменту выхода клубней из состояния физиологического покоя, начинает незначительно расти, что, вероятно, обусловлено необходимостью синтеза фитогормонов (АБК, стриголактоны) для прорастания глазков и дальнейшего развития побегов.

Представлялось интересным охарактеризовать ранее не описанную структуру и филогению генов *PSY1*, *PSY2* и *PSY3* картофеля, а также определить возможные изменения экспрессии этих генов в проростках картофеля в ответ на кратковременный холодовый стресс (имитация ночного похолодания/возвратных заморозков).

Последовательности генов *StPSY* были извлечены из генбанка NCBI и охарактеризованы. Все три последовательности содержали функциональный фитоинсинтазный домен (PLN02632). Сравнение последовательностей *StPSY1* и *StPSY2* выявило отсутствие на N-конце *StPSY1* мотивов FPSP и RQEWNFGFLNADLRYSCS, что является основным различием белков.

Проведенный филогенетический анализ свидетельствует в пользу наиболее древнего происхождения гена *StPSY3*. С учетом известного участия изофермента *StPSY1* в синтезе каротиноидов в тканях репродуктивных органов можно предположить, что ген *StPSY1* возник эволюционно позднее гена *StPSY2*, возможно, в результате дупликации последнего с изменением регуляторных областей и 5'-концевой последовательности гена и, как следствие, приобретением им новых функций. Таким образом, предполагается, что *StPSY1* и *StPSY2* возникли в результате дупликации гена-предшественника, *StPSY3*, с вероятным приобретением новых и сохранением старых функций.

Учитывая данные об участии генов *PSY* в стрессовых ответах растения, был проведен анализ профиля экспрессии генов *StPSY1*, *StPSY2* и *StPSY3* в ответ на холодовый стресс: двухнедельные проростки картофеля были подвергнуты воздействию кратковременного холодового стресса (3°C) в течение ночи (8 ч) для имитации ночного похолодания.

Выявлено, что все три гена *StPSY* активируются при снижении температуры, и наибольшая реакция наблюдается для *StPSY1*. Впервые показана реакция гена *StPSY3* на холодовый стресс. Проведен поиск *цис*-регуляторных элементов в области промотора и 5'-UTR генов *StPSY* и показано, что регуляция всех трех генов связана с реакцией на свет. Высокий уровень низкотемпературной активации гена *StPSY1* может быть связан с присутствием *цис*-элементов, ассоциированных с чувствительностью к холоду и абсцизовой кислоте.

Основные выводы:

Определен профиль экспрессии (РВ-ПЦР) 18 генов пути каротиногенеза в динамике длительного (7 месяцев, сентябрь-апрель) холодового хранения клубней картофеля пяти сортов. Было показано, что при длительном низкотемпературном хранении клубней картофеля наблюдается значительное снижение экспрессии генов каротиноидов в феврале по сравнению с сентябрем, за некоторыми исключениями.

Охарактеризована структура и филогения генов *PSY1*, *PSY2* и *PSY3* картофеля и выявлены возможные изменения экспрессии этих генов в проростках картофеля в ответ на кратковременный холодовый стресс (имитация ночного похолодания/возвратных заморозков).

ЛИТЕРАТУРА

1. Bhaskar P. B. et al. Suppression of the vacuolar invertase gene prevents cold-induced sweetening in potato //Plant physiology. – 2010. – Т. 154. – №. 2. – С. 939-948.
2. Jaiswal S. et al. Amelioration of cold-induced sweetening in potato by RNAi mediated silencing of StUGPase encoding UDP-glucose pyrophosphorylase //Frontiers in Plant Science. – 2023. – Т. 14. – С. 1133029.
3. Lopez A. B. et al. Effect of the cauliflower Or transgene on carotenoid accumulation and chromoplast formation in transgenic potato tubers //Journal of experimental botany. – 2008. – Т. 59. – №. 2. – С. 213-223.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ РАБОТЫ

Статьи в рецензируемых журналах:

1. Kulakova A. V., Shchennikova A. V., Kochieva E. Z. Expression of Carotenoid Biosynthesis Genes during the Long-Term Cold Storage of Potato Tubers // Russian Journal of Genetics. – 2023. – Т. 59. – №. 8. – С. 794-807.
2. Kulakova A. V., Shchennikova A. V., Kochieva E. Z. Potato *Solanum tuberosum* L. Phytoene Synthase Genes (Stpsy1, Stpsy2, and Stpsy3) Are Involved in the Plant Response to Cold Stress // Doklady Biological Sciences. – Pleiades Publishing, 2024. – С. 1-6.

Тезисы докладов:

1. Кулакова А. В. Экспрессия гена сахарозсинтазы SUS/SS16 у сортов картофеля в процессе длительного низкотемпературного хранения клубней // Сборник тезисов 26-ой Пущинской школы-конференции молодых ученых с международным участием «Биология-наука XXI века» – Пущино, 2023, С. 39-40 (устный доклад)
2. Кулакова А. В., Щенникова А. В., Кочиева Е. З. Анализ изменения экспрессии генов деградации крахмала при длительном низкотемпературном хранении клубней картофеля // Сборник тезисов докладов V Вавиловской международной конференции к 135-летию со дня рождения Н.И. Вавилова, – Санкт-Петербург, 2022, С. 138-139 (устный доклад)
3. Kulakova A. Dynamics of changes in the expression of carbohydrate metabolism genes and carbohydrate content in potato tubers during long-term low-temperature storage // The 7th International Scientific Conference Plant Genetics, Genomics, Bioinformatics, and Biotechnology – Kazan, 2023 (постерный доклад)

Kulakova Anastasia Vladimirovna

RESEARCH CENTRE OF BIOTECHNOLOGY RAS

INFLUENCE OF SECONDARY METABOLITES ON RESISTANCE TO COLD STRESS IN POTATO

Abstract. Carotenoids are one of the most important plant secondary metabolites, which are valuable components of photosynthesis and stress adaptation of plants. In potatoes (*Solanum tuberosum*), the issue of stress resistance occupies an important place. At low temperatures, potato tubers are subjected to a phenomenon known as cold sweetening, in which the rate of starch conversion into reducing sugars increases, which leads to a change in presentation and taste qualities. In the case of potato seedlings, resistance to short-term spring cooling is significant. To identify possible genes and gene pathways involved in resistance to cold stress, a transcript of the potato cv.Barin was obtained under normal conditions and under conditions of long-term (7-month) low-temperature stress, its analysis was carried out, according to the results of which DEGs associated with secondary metabolites, including carotenoid biosynthesis genes, were identified. According to the results of the study, a biochemical analysis of the carotenoid content in potato tubers was carried out and patterns of expression of 18 genes for biosynthesis and accumulation of carotenoids in the dynamics of long-term (7 months, September-April) cold storage of potato tubers of five varieties were analyzed. It has been shown that long-term low-temperature storage of tubers is characterized by a significant decrease in transcript levels of all carotenogenesis genes in February compared with September. The StPSY genes encoding the key enzyme

of carotenogenesis, phytoinsynthesis, have been identified and characterized. The expression profile of the StPSY1, StPSY2 and StPSY3 genes in response to short-term cold stress was analyzed. It was revealed that all three StPSY genes are activated when the temperature decreases, and the greatest reaction is observed for StPSY1.

Keywords: *varieties of potatoes, cold stress, cold sweetening, secondary metabolites, carotenoids, gene expression.*

Ламердонова Фатима Хасбияновна
аспирант ФИЦ Биотехнологии РАН 3 года обучения
профиль 1.5.6 Биотехнология
e-mail: Lamerdonova_fkh@pfur.ru

Научный руководитель
Колеснов Александр Юрьевич
доктор технических наук,
кандидат биологических наук,
руководитель лаборатории фундаментальных и прикладных
исследований качества и технологий пищевых продуктов (ПНИЛ)
Научно-образовательного ресурсного центра
(НОРЦ) «Фармация» Российского университета дружбы народов
имени Патриса Лумумбы



ИССЛЕДОВАНИЕ ИЗОТОПИИ УГЛЕРОДА И ВОДОРОДА В КОМПОНЕНТАХ ВЫСШИХ РАСТЕНИЙ НА ПРИМЕРЕ ВИНОГРАДА (VITIS VINIFERA L.), ПРОИЗРАСТАЮЩЕГО В РАЗНЫХ ГЕОГРАФИЧЕСКИХ ЗОНАХ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ, И ПРОДУКТОВ ЕГО ПЕРЕРАБОТКИ

Аннотация. С применением ЯМР-спектроскопии ядер дейтерия (2H(D))-qNMR исследованы образцы винограда (*Vitis vinifera* L.) из пяти географических районов Российской Федерации. В работе в рамках комплексного подхода, в котором кроме распределения дейтерия как основной переменной в изучаемой системе «Климат – Изотопия водорода в компонентах винограда», исследовались также изотопный состав углерода $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ (IRMS/SIRA-масс-спектрометрия), органические кислоты и углеводы (HPLC-высокоэффективная жидкостная хроматография).

По результатам исследования для дальнейшего изучения выдвинута гипотеза о наличии взаимосвязи изотопии водорода (дейтерия) в компонентах винограда и продуктов его переработки с рядом климатических факторов, основным из которых является температура, географических объектов произрастания растений.

Ключевые слова: изотопы водорода, дейтерий, внутриклеточная вода, изотопы углерода, органические кислоты, углеводы, виноградарство, виноделие.

Задачей данного этапа работы являлось проведение экспериментальных исследований с применением разработанного метода спектроскопии ядерного магнитного резонанса высокого разрешения 2H(D) -qNMR и IRMS/SIRA-масс-спектрометрии стабильных изотопов углерода $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ для накопления статистически значимых данных о фракционировании стабильных изотопов водорода и углерода в компонентах высших растений и продуктах их переработки на примере винограда (*Vitis vinifera* L.) в зависимости от природно-климатических условий произрастания.

Объекты исследования для изучения фракционирования изотопов водорода и углерода в компонентах винограда были отобраны в географических районах Крыма, городов Минеральные воды, Нальчик и Владикавказ, а также в Республике Дагестан.

В лабораторных образцах виноградного сока (сусла) методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (HPLC) был исследован химический состав, включая состав углеводов и органических кислот. Брожение исследованных сусел было проведено в лабораторных условиях с применением дрожжей штамма *Saccharomyces cerevisiae*. Данные по химическому составу основных компонентов винограда необходимы для обеспечения прослеживаемости изменений, происходящих в ходе биотехнологических процессов брожения. Сравнительный анализ экспериментальных данных, полученных до и после брожения, позволяет выявить ключевые изменения в составе сусла, вызванные активностью дрожжевых культур.

Изотопное фракционирование углерода в органических кислотах и углеводах образцов сусел и в образовавшемся в процессе контролируемого брожения этаноле, исследовано с применением метода IRMS/SIRA-масс-спектрометрии стабильных изотопов углерода $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$.

Изотопное распределение водорода (дейтерия) изучено методом спектроскопии ядерного магнитного резонанса высокого разрешения $^2\text{H}(\text{D})$ -qNMR во внутриклеточной воде винограда, а также в метильной и метиленовой группах этанола в соответствующем исходному суслу сброженном спиртосодержащем материале.

По результатам проведенных исследований была сформулирована гипотеза о наличии взаимосвязи изотопии водорода (дейтерия) в компонентах винограда и продуктов его переработки с рядом климатических факторов, основным из которых является температура географических объектов произрастания растений.

Для изучения влияния грунтовых и атмосферных вод на изотопное фракционирование водорода в плодовых частях растений, поставлен эксперимент с брожением искусственных многокомпонентных модельных «сусел» с разной степенью обогащения дейтерием. В дальнейшей работе методом спектроскопии ядерного магнитного резонанса будет проведено исследование распределения дейтерия в метильной и метиленовой группах этанола и соответствующий этому уровень дейтерия в воде модельной системы.

Математическая обработка массивов экспериментальных данных будет проведена с применением разработанной программы для статистического анализа, которая позволит выявить классифицируемые взаимосвязи между химическим составом, физическими характеристиками исследуемых объектов и рядом климатических факторов - переменных (напр., среднегодовыми минимальной, средней и максимальной температурами воздуха в географическом объекте произрастания винограда).

Основные выводы:

Результаты литературного поиска и проведенные экспериментальные исследования позволили сформулировать гипотезу о наличии непосредственной взаимосвязи между распределением дейтерия в компонентах растений и условиями их произрастания. Для подтверждения гипотезы будут проведены дальнейшие исследования, результаты которых в виде массивов данных будут изучены с применением математических моделей статистического анализа. По результатам эксперимента с брожением виноградного сусла впервые получены данные об обогащении внутриклеточной (биологической) воды дейтерием.

ЛИТЕРАТУРА

1. Стаматиди В.Ю. Вариации водного потенциала листьев винограда различного происхождения в условиях Крыма (2014-2017 гг.) // Магарач. Виноградарство и виноделие, 2019. – т. 21. – № 2(108). – С. 133-138.

2. Колеснов А. Масс-спектрометрия стабильных изотопов кислорода $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ в винограде и винодельческой продукции Крыма / Колеснов А., Агафонова Н., Зенина М. // Аналитика, 2016. – № 3(28). – С. 72-82.
3. Gaudillere J.-P., Van Leeuwen C., Ollat N. Carbon isotope composition of sugars in grapevine, an integrated indicator of vineyard water status // Journal of Experimental Botany, 2002. – Vol. 53 (369). – pp. 757-763.
4. Van Leeuwen C., Tregoat O., Choné X., Bois B., Pernet D., Gaudillère J.-P. Vine water status is a key factor in grape ripening and vintage quality for red Bordeaux wine. How can it be assessed for vineyard management purposes? // Journal International des Sciences de la Vigne et du Vin, 2009. – Vol. 43. No. 3. – pp. 121-134.
5. Зенина М.А. Изотопный состав легких элементов в компонентах винограда и винодельческой продукции: влияние природных и техногенных факторов / Зенина М.А., Колеснов А.Ю., Цимбалаев С.Р., Терещенко Г.С. // Сб. науч. тр. «Виноградарство и виноделие» ФГБУН «Всероссийский национальный научно-исследовательский институт виноградарства и виноделия «Магarach» РАН», 2020. – Т. XLIX. – С. 219-222.
6. Ramos I.C. Carbon Stable isotopes as Water Stress Proxy: Trends in Vineyards from Mendoza / Ramos I.C., Dauverne A., Nahuel G., Clavijo S., Cabeza M., Quiroga G. // Congreso Latinoamericano de Ingenieria y Ciencias Aplicadas CLICAP 2022-San Rafael, Mendoza-Argentina, 2022. – pp. 691-699.
7. Plantevin M. Using $\delta^{13}\text{C}$ and hydroscares for discriminating cultivar specific drought responses / Plantevin M., Gowdy M., Destrac-Irvine A., Marguerit E., Gambetta G.A., Van Leeuwen C. // Oeno One, 2022. – 56-2. – pp. 239-250.
8. Perini M. The effect of stopping alcoholic fermentation on the variability of H, C and O stable isotope ratios of ethanol / Perini M., Guzzon R., Simoni M., Malacarne M., Larcher R., Camin F. // Food Control, 2014. – 40. – pp. 368–373.
9. Christoph N. 25 Years authentication of wine with stable isotope analysis in the European Union – Review and outlook / Christoph N., Hermann A., Wachter H. // BIO Web of Conferences, 2015. – 5. – 02020. – 8 p.

Lamerdonova Fatima Hasbiyanovna
RESEARCH CENTER OF BIOTECHNOLOGY RAN

STUDY OF CARBON AND HYDROGEN ISOTOPES IN COMPONENTS OF HIGHER PLANTS USING THE EXAMPLE OF GRAPES (VITIS VINIFERA L.), GROWING IN DIFFERENT GEOGRAPHICAL ZONES OF THE RUSSIAN FEDERATION, AND ITS PROCESSED PRODUCTS

Abstract. *Using the NMR spectroscopy of deuterium nuclei ($^2\text{H}(\text{D})$ -qNMR), grape samples from five geographical zones of the Russian Federation were studied. The study adopted an integrated approach, in which, in addition to deuterium content as the main dependent variable in the climate - hydrogen isotope system, the carbon isotope content (measured by IRMS/SIRA-mass spectrometry) and the composition of organic acids and carbohydrates (analyzed by high-performance liquid chromatography) were also considered.*

A hypothesis has been proposed regarding the existence of a relationship between the deuterium fractionation, and the climate conditions of the geographical zone where plants grow.

Key words: *hydrogen isotopes, deuterium, intracellular water, carbon isotopes, organic acids, carbohydrates, viticulture, winemaking.*

Шабает Александр Викторович

аспирант ФИЦ Биотехнологии РАН 3 года обучения

профиль 1.5.4 Биохимия

e-mail: a.shabaeff2011@yandex.ru



Научный руководитель

Федорова Татьяна Васильевна

кандидат технических наук,

зав. лабораторией молекулярных основ биотрансформаций

МЕТАБОЛОМНЫЙ ПРОФАЙЛИНГ КУЛЬТУРАЛЬНЫХ ЖИДКОСТЕЙ БАЗИДИАЛЬНЫХ ГРИБОВ БЕЛОЙ ГНИЛИ РАЗЛИЧНЫХ ЭКОЛОГИЧЕСКИХ НИШ

Аннотация. Методом газовой хромато-масс-спектрометрии (ГХ-МС) проведено исследование метаболитного состава дихлорметановых (ДХМ) экстрактов культуральных жидкостей сапротрофных грибов белой гнили (первичного раневого ксилотрофа *Trametes hirsuta* LE-BIN 072, вторичного ксилотрофа *Steccherinum ochraceum* LE-BIN 3174 и гумусового сапротрофа *Crucibulum laeve* LE-BIN 1700) при их культивировании в стационарных условиях на питательных средах с добавлением различных типов древесных опилок (березы, ольхи и сосны). Сравнительный анализ метаболитных профилей показал существенные различия между культурами изучаемых грибов белой гнили. При этом количественный состав экстрактивных соединений в большей степени зависел от среды культивирования, нежели качественный.

Ключевые слова: сапротрофные базидиомицеты, грибы белой гнили древесины, биодеструкция, древесные опилки, дихлорметановые экстракты, метаболом.

Грибы белой гнили – экофизиологическая группа грибов, обладающая способностью эффективно разрушать основные компоненты древесины, такие как целлюлоза, гемицеллюлоза и лигнин. Биодеструкция растительных полисахаридов осуществляется грибами белой гнили посредством секреции ряда окислительных и гидролитических ферментов – так называемого лигноуглеводного ферментного комплекса [4], в результате работы которого образуются различные продукты деструкции лигноцеллюлозного субстрата [1].

Целью данного исследования стало сравнительное изучение метаболитных профилей различных культуральных сред дереворазрушающих ксилотрофных грибов белой гнили: первичного раневого ксилотрофа *Trametes hirsuta* LE-BIN 072, вторичного ксилотрофа *Steccherinum ochraceum* LE-BIN 3174 и гумусового сапротрофа *Crucibulum laeve* LE-BIN 1700.

Грибные изоляты *T. hirsuta*, *S. ochraceum* и *C. laeve* культивировались в стационарных условиях в течение 30 суток на глюкозопептонной контрольной среде (ГП) и на ГП среде с добавлением опилок трех видов древесины: берёзы (ГП-Б), ольхи (ГП-О) и сосны (ГП-С). По окончании культивирования грибную биомассу отделяли и из культуральной жидкости проводили троекратную экстракцию метаболитов равным объемом дихлорметана. Для разделения различных соединений в составе метаболомов с целью их идентификации использовали препаративную тонкослойную хроматографию (ТСХ). Идентификацию соединений в полученных фракциях проводили методом газовой хромато-масс-спектрометрии (ГХ-МС).

ДХМ экстракты грибов *T. hirsuta* и *C. laeve* содержали сопоставимое количество метаболитов (18-25 на ГП, ГП-Б и ГП-О средах; 6-9 на ГП-С среде), в то время как в экстрактах *S. ochraceum* было идентифицировано значительно меньше соединений (8-16 на ГП и ГП-Б средах; 2-4 на ГП-О и ГП-С средах). При этом в ГП-С экстрактах у всех трёх грибов было идентифицировано наименьшее количество соединений, по сравнению с остальными средами.

Основные идентифицированные экстраклеточные метаболиты культур грибов *T. hirsuta*, *S. ochraceum* и *C. laeve* на контрольной ГП среде представлены такими классами соединений как алканы, жирные спирты и различные эфиры жирных и бензойной кислот. Однако сравнительный анализ метаболитных профилей ДХМ экстрактов показал существенные различия между культурами изучаемых грибов белой гнили. Так только 2 соединения (гексиловый эфир бензойной кислоты и эфир фталевой кислоты ДиБФ) были обнаружены в ГП и ГП-Б экстрактах всех трёх грибов.

Добавление древесных опилок в ГП среду приводило преимущественно к количественному изменению метаболитных профилей ДХМ экстрактов культуральных жидкостей грибов, нежели чем к качественному. На рис. 1 представлена диаграмма Венна, иллюстрирующая наличие общих и уникальных метаболитов в экстрактах разных культуральных сред. Как видно, спектр метаболитов на разных средах был довольно схож и лишь некоторые соединения были специфичными. Наибольшее количество уникальных метаболитов было обнаружено в ГП-О экстрактах *T. hirsuta* и *C. laeve* – 4 и 6 соединений соответственно.

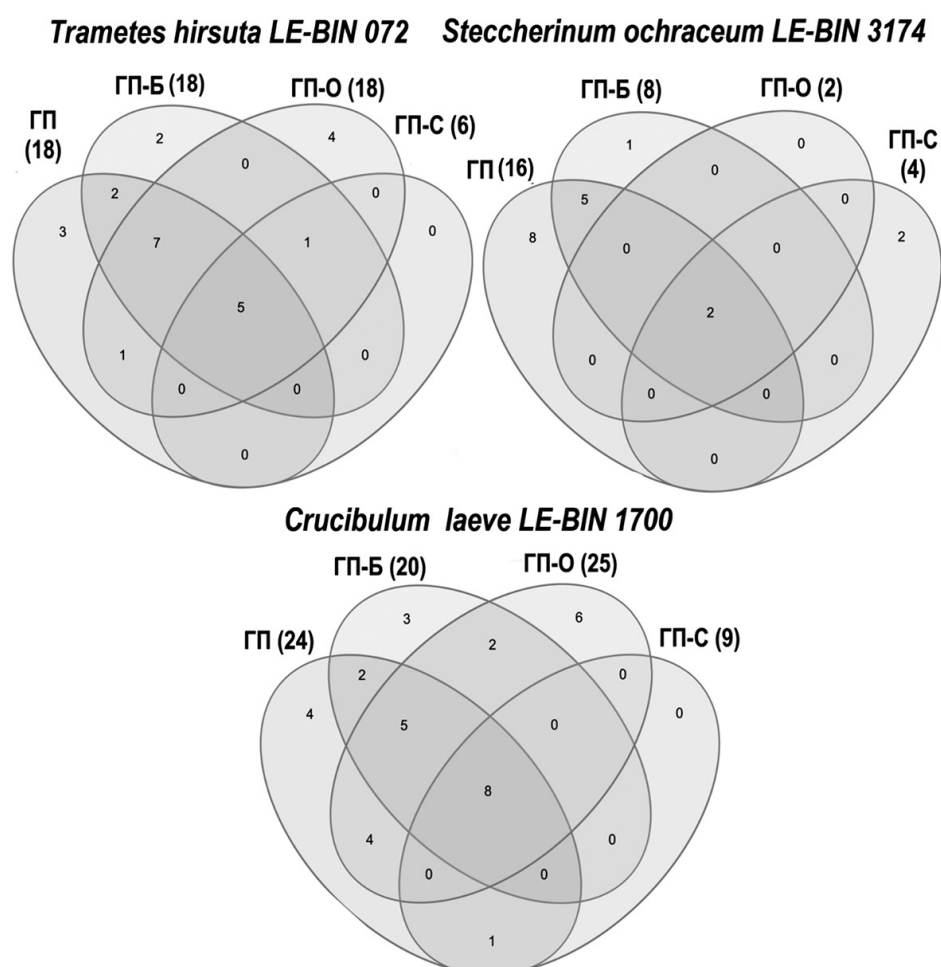


Рис. 1. Диаграммы Венна, визуализирующие общие и уникальные метаболиты, идентифицированные в ДХМ экстрактах культуральных жидкостей (ГП, ГП-Б, ГП-О, ГП-С) грибов белой гнили *T. hirsuta*, *S. ochraceum* и *C. laeve*

В экстрактах сред с опилками *T. hirsuta*, в отличие от контрольной ГП среды, был обнаружен тетрадекан-1-ол (миристиловый спирт); экстрактах ГП-Б дополнительно обнаружены тридециловый спирт (1-тридеканол) и сложный эфир бензойной кислоты – 2-октилбензоат; на среде ГП-О – терпеноид линалилацетат, а также C16 и C17 ациклические насыщенные углеводороды.

В экстрактах ГП-Б и ГП-С *S. ochraceum* уникальными соединениями были ди-tert-бутил-1-оксапиро-4,5-дека-6,9-диен-2,8-дион (ГП-Б), 4-метил-5,5-бис(2-метил-2-пропенил)-2(5H)-фуранон и 10-тетрадецен-1-ол ацетат (ГП-С).

В экстракте ГП-О *S. laeve* обнаружено самое большое количество уникальных соединений (6), среди которых идентифицированы эфиры жирных и карбоновых кислот, диэтилфталат (ДЭФ), 7a-изопропенил-4,5-диметилоктагидроинден-4-(ил)метанол и эфир этилен брассилат. В экстракте ГП-Б дополнительно обнаружены стрептовитагин А, метиловый эфир миристиновой кислоты и додецил акрилат.

Обнаруженные в составе экстрактов культуральных жидкостей грибов с древесными опилками фталаты, эфиры бензойной кислоты и алканы, по всей видимости, могут являться продуктами биодеструкции лигнина [2, 3]. Ряд идентифицированных соединений обладают биологической активностью, включая антиоксидантную, антимикробную, противовирусную и др.

Основные выводы:

Метаболитные профили ДХМ экстрактов культуральных жидкостей грибов белой гнили, принадлежащих к различным экологическим группам, существенно различаются. Среда культивирования влияла преимущественно на количественный состав соединений, в то время как качественный менялся незначительно. Добавление древесных опилок в среду культивирования приводило к увеличению содержания таких групп метаболитов как алканы, жирные спирты, сложные эфиры жирных, фталевой и бензойной кислот, среди которых много биологически активных соединений.

ЛИТЕРАТУРА

1. Atiweh G. et al. Lignin degradation by microorganisms: A review // Biotechnology Progress. 2022. Vol. 38. №. 2. P. e3226. doi.org/10.1002/btpr.3226
2. Cui L. et al. Lignin biodegradation and its valorization // Fermentation. 2022. Vol. 8. №. 8. P. 366. doi.org/10.3390/fermentation8080366
3. Del Cerro C. et al. Intracellular pathways for lignin catabolism in white-rot fungi // Proceedings of the National Academy of Sciences. 2021. Vol. 118. №. 9. P. e2017381118. doi.org/10.1073/pnas.201738111
4. Suryadi H. et al. Biodelignification of lignocellulose using ligninolytic enzymes from white-rot fungi // Heliyon. 2022. Vol. 8, №. 2. P. e8865. doi.org/10.1016/j.heliyon.2022.e08865

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ РАБОТЫ

Статьи в рецензируемых журналах:

1. Савинова О.С. и др. Биодеструкция эфиров фталевой кислоты грибами белой гнили // Прикладная биохимия и микробиология. 2022. Т. 58, № 5. С. 484–499.
2. Shabaev A.V. et al. Comparative Analysis of *Peniophora lycii* and *Trametes hirsuta* Exoproteomes Demonstrates “Shades of Gray” in the Concept of White-Rotting Fungi // International Journal of Molecular Sciences 2022. Vol. 23, № 18, e10322; doi:10.3390/ijms231810322.

3. Savinova O.S. et al. Benzyl Butyl Phthalate and Diisobutyl Phthalate Biodegradation by White-rot Fungus *Trametes hirsuta* // *Applied Biochemistry and Microbiology* 2022. Vol. 58. P. 113–125; doi:10.1134/S0003683822100118.
4. Савинова О.С. и др. Биодеструкция эфиров фталевой кислоты грибом белой гнили *Peniophora lycii* // *Микробиология*. 2023. Т. 92, № 3. С. 310–317; doi:10.31857/S0026365622600857

Shabaev Alexander Viktorovich
RESEARCH CENTER OF BIOTECHNOLOGY RAS

METABOLOMIC PROFILING OF CULTURE FLUIDS OF BASIDIAL FUNGI OF WHITE ROT OF VARIOUS ECOLOGICAL NICHES

Abstract. *The metabolite composition of dichloromethane (DCM) extracts of culture fluids of saprotrophic white rot fungi (primary wound xyлотroph *Trametes hirsuta* LE-BIN 072, secondary xyлотroph *Steccherinum ochraceum* LE-BIN 3174 and humus saprotroph *Crucibulum laeve* LE-BIN 1700) when cultured in stationary conditions on nutrient media supplemented with different types of wood sawdust (birch, alder and pine). Comparative analysis of metabolite profiles showed significant differences between cultures of the studied white rot fungi. The quantitative composition of extractive compounds was more dependent on the cultivation medium than the qualitative one.*

Keywords: *saprotrophic basidiomycetes, white rot fungi, biodegradation, sawdust, metabolome.*

Бруснова Наталья Андреевна

аспирант ФИЦ Биотехнологии РАН 2 года обучения

научная специальность 1.5.6 Биотехнология

e-mail: brusnova.natasha@yandex.ru

Научный руководитель

Виноградова Светлана Владимировна

кандидат биологических наук,

с.н.с. группы биоинженерии растений



ИДЕНТИФИКАЦИЯ БАКТЕРИЙ, АССОЦИИРОВАННЫХ С ПЯТНИСТОСТЯМИ НА ЛИСТЬЯХ ДРЕВЕСНЫХ ПОРОД

Аннотация. Во всем мире сельское хозяйство и лесная промышленность несут все большие убытков из-за гибели или уменьшения урожайности возделываемых растительных культур вследствие поражения фитопатогенными организмами. Особое положение занимают заболевания, вызываемые бактериями. Благодаря высокой степени вирулентности и большому спектру растений-хозяев бактерии выходят на первое место как экономически значимые фитопатогены. Отсутствие эффективных методов борьбы с ними на поздней стадии инфекции обосновывает необходимость ранней и точной диагностики возбудителя для предупреждения возникновений эпифитотий. В этой работе мы идентифицировали бактерии, ассоциированные с пятнистостями на листьях деревьев видов *Acer tataricum*, *Ulmus minor* и *Fraxinus excelsior*, с помощью биохимического анализа, секвенирования гена 16S rPHK и мультилокусного филогенетического типирования.

Ключевые слова: фитопатогены, *Pantoea*, *Pseudomonas*, идентификация бактерий, LOPAT, MLST.

Изучение генетического разнообразия фитопатогенных микроорганизмов является важным шагом, следующим за его обнаружением и идентификацией. Это дает более четкое представление о состоянии популяции патогена и существовании различных видов или штаммов, что зачастую невозможно сделать по результатам фенотипических исследований и биохимических тестов. Кроме того, на основе этих данных возможно составление прогнозов о развитии эпифитотий и мер их предотвращения, описание экологических характеристик и генетической изменчивости патогенов [Loper J. E. et al. 2012; Mansfield J. et al., 2012; Xie Y. et al., 2020].

Метод мультилокусного филогенетического типирования (MLST) используется для определения систематического положения бактерий, в том числе видовой принадлежности и выявления таксономических взаимосвязей между изолятами [Delétoile A. et al., 2009; Hall S. J. et al., 2019].

В нашем исследовании образцы были собраны в летне-осенний период в Теллермановском лесу Воронежской области и заповеднике Галичья гора Липецкой области с *Acer tataricum*, с *Ulmus minor* и *Fraxinus excelsior*, которые были обследованы на наличие симптомов предположительно бактериальной этиологии.

Симптоматичные образцы (листья, черешки и плоды) поверхностно стерилизовали, высевали суспензию на питательную среду LB и инкубировали при 27 °С. Всего было получено 52 изолята, для которых изучали морфологию, биохимические характеристики, патогенность и проводили мультилокусное типирование. Все тестируемые бактерии были отрицательными

по Граму. С помощью секвенирования и анализа гена *16S rRNA* 19 изолятов были отнесены к роду *Pantoea* и 34 – к роду *Pseudomonas*. Отмечены фенотипические различия бактериальных колоний на питательной среде LB: 20 колоний *Pseudomonas* и 18 колоний *Pantoea* соответствовали S-типу (круглая выпуклая форма, гладкая поверхность, влажная консистенция), а 14 колоний *Pseudomonas* и 1 колония *Pantoea* – R-типу (шероховатая поверхность, неправильные края, сухая консистенция).

Бактерии рода *Pseudomonas* флюоресцировали в УФ-свете на среде KingB, однако некоторые изоляты с течением времени теряли эту способность. На среде YDC 18 изолятов *Pantoea* образовывали характерный желтый пигмент. Большинство изолятов *Pseudomonas* были бежевого цвета, кроме двух с желтым пигментом. Вокруг колоний этих изолятов на питательной среде YDC образовывалась прозрачная зона вследствие растворения CaCO_3 из-за интенсивного образования кислоты при утилизации глюкозы. На питательной среде LB изоляты *Pseudomonas* и *Pantoea* росли при температуре +4 °C, а при температуре +37°C рост показывали только бактерии *Pantoea*. Все изоляты *Pseudomonas* и *Pantoea* показывали отрицательную реакцию в тесте на образование индола из триптофана и положительную – на каталазную активность.

Бактерии изучали по схеме тестов LOPAT (Schaad N. W. et al., 2001). Все бактерии рода *Pseudomonas* показали положительную РСЧ на табаке и отрицательные реакции на оксидазу, аргинин и пектолитическую активность на картофеле. Два изолята *Pseudomonas* не продуцировали леван на среде NA с сахарозой, а все остальные образовывали мукоидные колонии «леванского типа», различающиеся по фенотипу и размеру. Бактерии рода *Pantoea* были положительные по РСЧ и отрицательные в тестах на леван, оксидазу, аргинин и пектолитическую активность на картофеле.

Для более детальной характеристики проверяли способность изолятов утилизировать углерод из одиннадцати источников сахаров и многоатомных спиртов. Все *Pseudomonas* утилизировали глюкозу, маннит, инозит и аспаргиновую кислоты и различались по утилизации арабинозы, лактозы, рамнозы, сорбита, трегалозы и тартрата. Только два изолята, которые не продуцировали леван, также не утилизировали сахарозу. Изоляты *Pantoea* утилизировали сахарозу, глюкозу, рамнозу, инозит, трегалозу, маннит и различались по утилизации арабинозы, лактозы, сорбита и тартрата.

Для дальнейшего установления филогенетических взаимосвязей с помощью MLST внутри каждой группы изолятов *Pseudomonas* и *Pantoea* и уточнения их таксономического положения были секвенированы пять генов домашнего хозяйства. Для изолятов *Pseudomonas* секвенировали: *gapA* (кодирует глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназу); *gltA* (ген цитратсинтазы); *gyrB* (ген ДНК-гиразы B); *rpoD* (ген σ -субъединицы РНК-полимеразы) и *rpoB* (ген β -субъединицы РНК-полимеразы) [Gomila M. et al., 2017; Hall S. J. et al., 2016]. Для изолятов *Pantoea* секвенировали: *gyrB* (ген β -субъединицы ДНК-гиразы), *rpoB* (ген β -субъединицы РНК-полимеразы), *fusA* (ген фактора элонгации G), *leuS* (ген лейцил-тРНК-синтазы), *pyrG* (ген СТР-синтазы) [Delétoile A. et al., 2009; Suleimanova A. D. et al. 2021].

Все полученные последовательности выравнивали методом ClustalW в программе MEGA11. Объединенные последовательности 5 генов использовали для построения филогенетических деревьев методом Neighbor-Joining (NJ) в программе MEGA11. В качестве референсных использовали последовательности типовых штаммов видов *Pseudomonas* и *Pantoea* списка LPSN (<https://lpsn.dsmz.de/>), имеющиеся в Генбанке. Обнаруженные нами изоляты *Pantoea* кластеризовались вместе, ближайшими были референсные изоляты *Pantoea agglomerans*. Изоляты рода *Pseudomonas* кластеризовались в две отдельные клады с различными патоварами *Pseudomonas syringae*. Два изолята, отличавшиеся по биохимическим свойствам, образовали отдельную ветвь с видом *Pseudomonas graminis* (бутстреп-поддержка 100), а один – отдельную ветвь с видом

Pseudomonas congelans (бутстреп-поддержка 100). Анализ показал высокую гетерогенность изучаемой популяции *Pseudomonas*.

Основные выводы: таким образом, с использованием микробиологических, биохимических и молекулярных методов мы обнаружили бактерии *Pseudomonas* и *Pantoea* на древесных культурах с симптомами пятнистостей.

ЛИТЕРАТУРА

1. Berge O. et al. A user's guide to a data base of the diversity of *Pseudomonas syringae* and its application to classifying strains in this phylogenetic complex //PloS one. – 2014. – Т. 9. – №. 9. – С. e105547.
2. Chakraborty S. Migrate or evolve: options for plant pathogens under climate change //Global change biology. – 2013. – Т. 19. – №. 7. – С. 1985-2000.
3. Delétoile A. et al. Phylogeny and identification of *Pantoea* species and typing of *Pantoea agglomerans* strains by multilocus gene sequencing //Journal of clinical microbiology. – 2009. – Т. 47. – №. 2. – С. 300-310.
4. Gomila M. et al. Clarification of taxonomic status within the *Pseudomonas syringae* species group based on a phylogenomic analysis //Frontiers in microbiology. – 2017. – Т. 8. – С. 320397.
5. Gutiérrez-Barranquero J. A., Cazorla F. M., De Vicente A. *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* associated with mango trees, a particular pathogen within the “hodgepodge” of the *Pseudomonas syringae* complex //Frontiers in Plant Science. – 2019. – Т. 10. – С. 570.
6. Hall S. J. et al. *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* from cool climate Australian grapevine vineyards: new phylogroup PG 02f associated with bacterial inflorescence rot //Plant Pathology. – 2019. – Т. 68. – №. 2. – С. 312-322.
7. Holmes D. E., Nevin K. P., Lovley D. R. Comparison of 16S rRNA, *nifD*, *recA*, *gyrB*, *rpoB* and *fusA* genes within the family Geobacteraceae fam. nov //International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. – 2004. – Т. 54. – №. 5. – С. 1591-1599.
8. Loper J. E. et al. Comparative genomics of plant-associated *Pseudomonas* spp.: insights into diversity and inheritance of traits involved in multitrophic interactions //PLoS genetics. – 2012. – Т. 8. – №. 7. – С. e1002784.
9. Mansfield J. et al. Top 10 plant pathogenic bacteria in molecular plant pathology //Molecular plant pathology. – 2012. – Т. 13. – №. 6. – С. 614-629.
10. Schaad N. W. (ed.). Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria. – 1981. – С. 72 pp.
11. Suleimanova A. D. et al. Identification of *Pantoea* phytate-hydrolyzing rhizobacteria based on their phenotypic features and multilocus sequence analysis (MLSA) //Microbiology. – 2021. – Т. 90. – С. 87-95
12. Wei C. et al. Relationship of the Pine Growth Promoting *Pantoea eucalypti* FBS135 with Type Strains *P. eucalypti* LMG 24197T and *P. vagans* 24199T //Life. – 2021. – Т. 11. – №. 7. – С. 608.
13. Xie Y. et al. Signal transduction schemes in *Pseudomonas syringae* //Computational and Structural Biotechnology Journal. – 2020. – Т. 18. – С. 3415-3424.

IDENTIFICATION OF BACTERIA ASSOCIATED WITH SPOTTING ON THE LEAVES OF TREE SPECIES

Annotation. *All over the world, agriculture and the forestry industry are suffering increasing losses due to the failure or decrease in the yield of cultivated crops due to the damage caused by phytopathogenic organisms. Diseases caused by bacteria are of particular significance. Due to the high degree of virulence and a wide range of host plants, bacteria are of prime importance as economically significant phytopathogens. The lack of effective methods of combating them at a late stage of infection justifies the need for early and accurate pathogen diagnosis to prevent the occurrence of epiphytotics. In this study, we identified bacteria associated with leaf spotting of *Acer tataricum*, *Ulmus minor* and *Fraxinus excelsior* species, using biochemical analysis, 16S rRNA gene sequencing, and multilocus phylogenetic typing.*

Keywords: *phytopathogens, Pantoea, Pseudomonas, identification, LOPAT, MLST.*

*Исследование выполнено при поддержке гранта РФФИ 24-26-00284
на базе оборудования ЦКП «Биоинженерия» и ЭУИК (U-73547).*

Гололобова Александра Вадимовна
аспирант ФИЦ Биотехнологии РАН 2 года обучения
научная специальность 1.5.11 Микробиология
e-mail sasha.gololobova@yandex.ru



Научный руководитель
Фролов Евгений Николаевич
кандидат биологических наук,
зав. лабораторией метаболизма экстремофильных прокариот

ОСОБЕННОСТИ ЭНЕРГЕТИЧЕСКОГО МЕТАБОЛИЗМА НОВЫХ АЦЕТОГЕННЫХ ПРОКАРИОТ

Аннотация. *Ацетогенные прокариоты представляют особый интерес как для фундаментальной науки, так и для биотехнологической отрасли благодаря своей способности к хемолитоавтотрофному росту. Ранее нами были получены и охарактеризованы первые облигатно автотрофные ацетогенные микроорганизмы. За отчетный период было проведено детальное исследование физиологии и особенностей энергетического метаболизма этих изолятов при помощи методов культивирования, сравнительной геномики и протеомики.*

Ключевые слова: *ацетогенез, автотрофия, путь Вуда-Льюнгаля, восстановительный глициновый путь, термофилы, чистые культуры.*

Ацетогенные прокариоты – это специализированная группа микроорганизмов, осуществляющих восстановление 2 молекул CO_2 до 1 молекулы ацетата [3]. Уникальной особенностью ацетогенов является рост в хемолитоавтотрофных условиях в присутствии H_2/CO_2 , CO или формиата. Такой рост ацетогенов в природных условиях протекает за счёт одноступенчатых биохимических реакций, дающих выход энергии меньший, чем ранее установленный предел в -20 кДж/моль (так называемый, биологический квант энергии) [2]. Поэтому сложилось мнение о невозможности существования облигатно хемолитоавтотрофных ацетогенных прокариот. Однако на предыдущем этапе данного исследования из горячих источников кальдеры Узон полуострова Камчатка были получены и охарактеризованы чистые культуры первых облигатно автотрофных ацетогенных микроорганизмов: *Aceticella autotrophica* 3443-3Ac и '*Acetitalea autotrophica*' 3819-GS1. Оба микроорганизма являлись облигатными анаэробами, умеренными термофилами и нейтрофилами, способными к росту лишь в хемолитоавтотрофных условиях. Открытие этих микроорганизмов подразумевает наличие новых метаболических процессов и механизмов, позволяющих этим прокариотам жить за счет биохимических реакций, дающих малый выход энергии. Подробному изучению метаболизма выделенных штаммов и была посвящена работа на 2 году обучения в аспирантуре.

Была подробно изучена физиология *Ac. autotrophica* 3443-3Ac, особое внимание было уделено выявленной у данного организма способности к восстановлению серных соединений (элементарной серы, полисульфида, тиосульфата) до сульфида, причем процесс сульфидогенеза всегда шел параллельно с ацетогенезом. Анализ генома штамма 3443-3Ac не показал наличия генов, кодирующих какие-либо серо-, полисульфид- или тиосульфатредуктазы, единственным же обнаруженным в геноме энергетическим комплексом являлся Ech-ком-

плекс, участвующий в процессе ацетогенеза. Таким образом, был предложен механизм «облегченного ацетогенеза», при котором энергетическую функцию пути Вуда-Льюнгаля (ПВЛ), заключающуюся в реокислении восстановительных эквивалентов, частично берет на себя некая НАД(Ф)Н-зависимая редуктаза, восстанавливающая серные соединения. В такой ситуации активное образование НАД(Ф)⁺ позволяет бифуркационной гидрогеназе более эффективно генерировать низкопотенциальные ферредоксины, необходимые для функционирования карбонильной ветви ПВЛ. Для подтверждения этой гипотезы были проведены культуральные и протеомные исследования. Биомассу *Ac. autotrophica* 3443-3Ac для протеомного анализа выращивали в разных условиях: (1) в ацетогенных условиях с H₂/CO₂ без добавления каких-либо дополнительных акцепторов электронов; (2) в присутствии H₂/CO₂ с добавлением элементной серы; (3) в присутствии H₂/CO₂ с добавлением полисульфида; (4) в присутствии H₂/CO₂ с добавлением тиосульфата. Культивирование осуществлялось в оптимальных для микроорганизма условиях при 50 °С и pH 6.0. Каждый вариант был получен в четырех биологических повторностях. Добавление в среду серных соединений не оказывало значительного влияния на представленность в клетках белков, участвующих в процессе ацетогенеза, однако происходило изменение представленности других белков клетки. В присутствии элементной серы и полисульфида увеличивалась доля оксидоредуктазы неизвестной функции (ACETAC_00860). В вариантах с серой его относительное содержание увеличивалось в 7,4 раз по сравнению с контролем, а в вариантах с полисульфидом – в 6,2 раза. Аминокислотная последовательность данной предполагаемой оксидоредуктазы была на 45 % сходна с описанной не так давно НАД(Ф)Н:полисульфид оксидоредуктазой из *Thermotoga maritima* [1]. Мы предполагаем, что оксидоредуктаза ACETAC_00860 у *Ac. autotrophica* 3443-3Ac при наличии в среде серы или полисульфида осуществляет их восстановление, сопряженное с окислением НАД(Ф)Н, и участвует в процессе «облегченного» ацетогенеза. Участие данного белка в восстановлении тиосульфата не было показано в ходе протеомного анализа, поэтому, скорее всего, протекание данной реакции обеспечивается другими ферментами.

В течение отчетного периода также был изучен механизм ацетогенеза у '*At. autotrophica*' 3819-GS1. Анализ генома данного изолята выявил значительные отличия от известных на данный момент ацетогенов. Это позволило предложить для штамма 3819-GS1 новый тип ацетогенеза. Окислительный модуль ацетогенеза у данного микроорганизма представлен бифуркационной гидрогеназой. В геноме нами не было обнаружено генов, кодирующих ключевые ферменты ПВЛ, однако были найдены детерминанты восстановительного глицинового пути. Нами также были найдены все необходимые гены, кодирующие субъединицы F₁F₀ АТФ-синтазы, однако первичный генератор энергии у данной бактерии также, по-видимому, отличается от известных на данный момент для ацетогенов Ech- и Rnf-комплексов. Нами был обнаружен 11-тисубъединичный Nuo-подобный мембранный комплекс, который, как мы предполагаем, окисляет восстановленный ферредоксин в сопряжении с генерацией мембранного потенциала и восстановлением тиоредоксина, необходимого для функционирования глицинредуктазного комплекса глицинового пути.

Для подтверждения выдвинутой выше гипотезы о новом механизме ацетогенеза у '*At. autotrophica*' 3819-GS1 нами был проведен протеомный анализ. Биомассу получали в единственных условиях с H₂/CO₂ в газовой фазе, pH 7.0 и 65 °С в 4 биологических повторностях. Были обнаружены субъединицы бифуркационной гидрогеназы и все ключевые белки восстановительного глицинового пути. Однако были детектированы не все предсказанные в ходе геномного анализа мембранные белки (субъединицы Nuo-подобного комплекса и АТФ-синтазы), что может быть связано со сложностями экстракции мембранной фракции.

Основные выводы:

1. Для *Ac. autotrophica* 3443-3Ac предложен механизм «облегченного» ацетогенеза с участием серных соединений.
2. Предложен ген-кандидат ACETAC_00860, кодирующий фермент, ответственный за сброс электронов на серные соединения (элементную серу, полисульфид) и участвующий в процессе «облегченного» ацетогенеза у *Ac. autotrophica* 3443-3Ac.
3. Методами геномного и протеомного анализов предложено и доказано функционирование глицинового ацетогенеза у '*At. autotrophica*' 3819-GS1.

ЛИТЕРАТУРА

1. Liang J., Huang H., Wang Y., Li L., Yi J., Wang S. A cytoplasmic NAD(P)H-dependent polysulfide reductase with thiosulfate reductase activity from the hyperthermophilic bacterium *Thermotoga maritima* // *Microbiol. Spectr.* – 2022. – V. 10(4). – P. e0043622.
2. Schink B. Energetics of syntrophic cooperation in methanogenic degradation // *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* – 1997. – V. 61. – P. 262-280.
3. Schuchman K., Müller V. Autotrophy at the thermodynamic limit of life: a model for energy conservation in acetogenic bacteria // *Nat. Rev. Microbiol.* – 2014. – V. 12. – P. 809-821.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ РАБОТЫ

Статьи в рецензируемых журналах:

1. Frolov E.N., Elcheninov A.G., Gololobova A.V., Toshchakov S.V., Novikov A.A., Lebedinsky A.V., Kublanov I.V. Obligate autotrophy at the thermodynamic limit of life in a new acetogenic bacterium // *Frontiers in Microbiology.* – 2023. – V. 14. DOI: 10.3389/fmicb.2023.1185739.

Тезисы докладов:

1. Гололобова А.В., Лебединский А.В., Ельченинов А.Г., Кубланов И.В., Фролов Е.Н. Первая облигатно автотрофная ацетогенная бактерия *Aceticella autotrophica* // 3-й Российский микробиологический конгресс (г. Псков, 26 сентября – 1 октября 2021 г.): материалы конгресса. – Псков: ООО «Конкорд». – 2021. – С. 164.
2. Гололобова А.В., Ельченинов А.Г., Кубланов И.В., Фролов Е.Н. Новая термофильная облигатная автотрофная ацетогенная бактерия *Acetitalea autotrophica* // XIII молодежная школа-конференция с международным участием Актуальные аспекты современной микробиологии (г. Москва, 16-18 ноября 2022 г.): - Москва: ВАШ ФОРМАТ. - 2022. – С. 50. (стендовый доклад)
3. Гололобова А.В., Лебединский А.В., Ельченинов А.Г., Кубланов И.В., Фролов Е.Н. Первые облигатно автотрофные ацетогенные бактерии // 4й Российский микробиологический конгресс (г. Томск, 24 сентября – 29 сентября 2023 г.): материалы конгресса. – Томск: ООО «Конкорд». – 2023. – С. 187.
4. Фролов Е.Н., Гололобова А.В., Лебединский А.В., Ельченинов А.Г., Кубланов И.В. Новые механизмы запасания энергии у ацетогенных бактерий // 4-й Российский микробиологический конгресс (г. Томск, 24 сентября – 29 сентября 2023 г.): материалы конгресса. – Томск: ООО «Конкорд». – 2023. – С. 179.

**NEW ACETOGENIC PROKARYOTES:
TAXONOMY, METABOLISM, EVOLUTION**

Abstract. *Acetogenic prokaryotes are of particular interest to both science and biotechnology due to their ability to chemolithoautotrophic growth. Earlier, we obtained and characterized the first obligately autotrophic acetogenic microorganisms. During the period covered by the present report, a detailed study of the physiology and features of the energy metabolism of these isolates was carried out using cultivation methods, comparative genomics, and proteomics.*

Keywords: *acetogenesis, autotrophy, Wood-Ljungdahl pathway, reductive glycine pathway, thermophiles, pure cultures.*

*Работа выполнена при поддержке гранта РФФ 24-14-00177
«Ацетогенные прокариоты с новыми механизмами запасания энергии
как платформа для разработки штаммов-продуцентов
биотехнологически ценных соединений».*

Колосов Александр Владимирович

аспирант ФИЦ Биотехнологии РАН 2 года обучения

научная специальность 1.5.6 Биотехнология

e-mail: Alexander_TheChemist_Kolosoff@mail.ru

Научный руководитель

Булаев Александр Генрихович

кандидат биологических наук,

зав. лаборатории хемолитоавтотрофных микроорганизмов



ОПРЕДЕЛЕНИЕ ОПТИМАЛЬНЫХ ПАРАМЕТРОВ ОДНОСТАДИЙНОГО И ДВУХСТАДИЙНОГО ВЫЩЕЛАЧИВАНИЯ ОТХОДОВ ПЕРЕРАБОТКИ ЭЛЕКТРОНИКИ

Аннотация. *Электронные отходы – вторичный источник цветных и благородных металлов, значение которого быстро растет. Их переработка традиционными методами металлургии бывает затруднена из-за образования побочных отходов переработки. Разработка методов биогидрометаллургической обработки основного отхода переработки печатных плат – пылевой фракции – легла в основу данной работы. Проводили эксперименты для переработки пылевой фракции с помощью одностадийного и двухстадийного выщелачивания. Так как было установлено, что исследуемый отход подавляет активность микроорганизмов, то были проведены эксперименты, чтобы установить концентрацию твердой выщелачиваемой фазы, при которой сохраняется активность культуры ацидофильных микроорганизмов при различных условиях процесса. Кроме того, был исследован процесс химического выщелачивания пылевой фракции сернокислым раствором сульфата трехвалентного железа, который может быть получен как продукт жизнедеятельности ацидофильных микроорганизмов.*

Ключевые слова: *электронные отходы, биогидрометаллургия, химическое выщелачивание, биовыщелачивание, ацидофильные микроорганизмы.*

Значительный рост производства электроники приводит к двух основным проблемам: истощению природных запасов некоторых цветных и редкоземельных металлов, наиболее востребованных в электронике, и образованию электронных отходов, переработка которых традиционными методами утилизации, включая сжигание и захоронение, не применимы из соображений защиты окружающей среды, а также низкой эффективности данных процессов [8, 9]. Электронные платы, являются важным компонентом большинства электронных устройств, и могут выступать в роли ценного вторичного источника цветных и благородных металлов [7].

Традиционные металлургические технологии переработки вторичного сырья, такие как пирометаллургические процессы, с предшествующим обогащением металлосодержащего сырья путем сепарации, широко используются при переработке измельченных электронных отходов. Однако, данный подход имеет существенные ограничения, одним из которых, помимо значительных затрат электроэнергии, высоких капитальных затрат на оборудование и высокого уровня выбросов токсичных газообразных веществ, является образование вторичных отходов на каждой из стадий данного процесса – измельчении, сепарации и пирометаллургическом разделении металлов [2, 10], переработка которых, в свою очередь, экономически убыточна при данном под-

ходе [5]. Данная проблема открывает перспективы применения биогидрометаллургических технологий, которые позволяют перерабатывать как сами электронные отходы, так и отходы переработки электронного лома без значительных затрат [3, 4].

Основными биогидрометаллургическими методами, которые могут быть использованы для переработки электронных отходов, являются одностадийное и двухстадийное выщелачивание [11]. Оба подхода были применены в ходе экспериментов в рамках данной работы для переработки образца основного отхода, образующегося при обогащении концентрата измельченных плат перед пирометаллургической обработкой – пылевой фракции, составляющей 2-10% от массы исходного сырья, накапливаемой в системе воздушной очистки при измельчении плат. Переработка данного отхода методами магнитной сепарации и пирометаллургии затрудняются неоднородностью частиц по физическим свойствам, летучестью и низкой смачиваемостью [6]. Исследуемый образец имел следующий химический состав (Таблица 1):

Таблица 1

Состав образца пылевой фракции, определенный методом ICP-AES

Элемент	Содержание, %	Элемент	Содержание, %
Si	10	Sn	0.5
Fe	8.0	Cd	0.04
Cu	2.6	Ag	0.026
Al	2.0	Pd	<0.005
Pb	1.7	Rh	<0.002
Zn	1.0	Au	0.001
Ni	0.5	Pt	<0.001

Одностадийное выщелачивание электронного лома предполагает мобилизацию катионов металлов в выщелачивающий раствор посредством прямого и непрямого механизмов выщелачивания при непосредственном участии микроорганизмов, окисляющих железо, поэтому эффективность одностадийного процесса напрямую зависит от их активности, которая характеризуется двумя основными параметрами – скоростью роста микроорганизмов и окислением двухвалентного железа. В ходе экспериментов по определению активности микроорганизмов во время одностадийного выщелачивания была определена плотность пульпы (Т : Ж), при которой наблюдается рост численности клеток микроорганизмов и происходило биоокисление катионов Fe^{2+} , а также исследована зависимость активности микроорганизмов от температуры и наличия органического субстрата в питательной среде. Опыты проводили в колбах Эрленмейера, объемом 250 мл, с рабочим объемом пульпы 100 мл. Перемешивание осуществлялось с помощью роторного шейкера со частотой 200 об/мин. В качестве инокулянта использовали накопительную культуру ацидофильных микроорганизмов, поддерживаемую на среде 9 KS [1] с концентрацией двухвалентного железа 2 г/л и pH = 1,5 при комнатной температуре. В ходе экспериментов была установлена зависимость активности культуры микроорганизмов от плотности пульпы (рисунки 1 и 2) при культивировании на среде 9 KS:

В ходе эксперимента было установлено, что активность культуры микроорганизмов снижается при повышении плотности пульпы, а рост численности клеток наблюдали только при плотности пульпы 0,2% и контроле.

Далее исследовали активность микроорганизмов при плотностях пульпы 0,1 и 0,2% при температурах 30 и 42 °С, а также в качестве источника органического углерода в часть образцов вносили дрожжевой экстракт до концентрации 0,2%. Питательная среда из первой части эксперимента была изменена – была увеличена концентрация двухвалентного железа до 4 г/л. Активность культуры ацидофильных микроорганизмов при 30 градусах была следующей (рисунки 3-4)

Окисление железа с разной плотностью пульпы

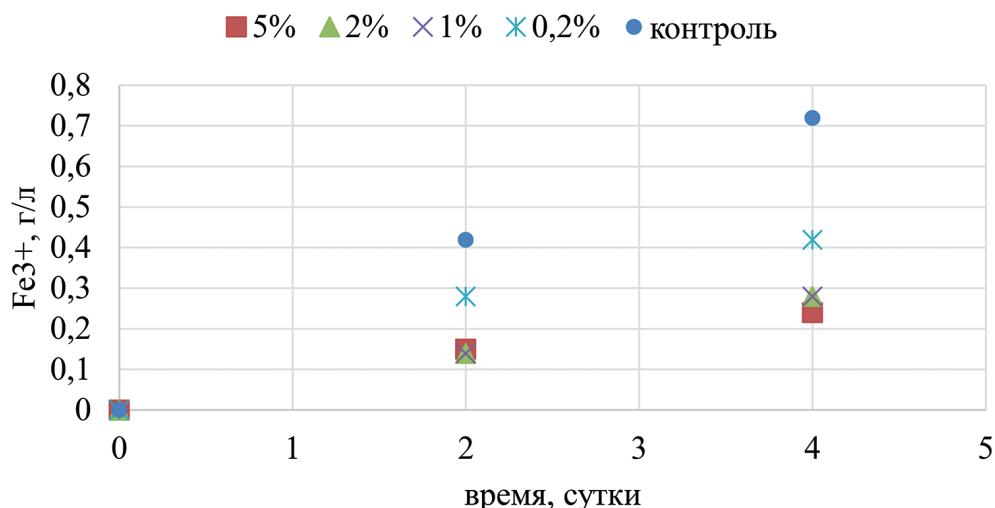


Рис. 1. Изменение концентрации трехвалентного железа при разной плотности пульпы при комнатной температуре на питательной среде 9 KS с 2 г/л Fe^{3+} и при начальном $\text{pH} = 1,5$

Изменение количества клеток микроорганизмов при разной плотности пульпы

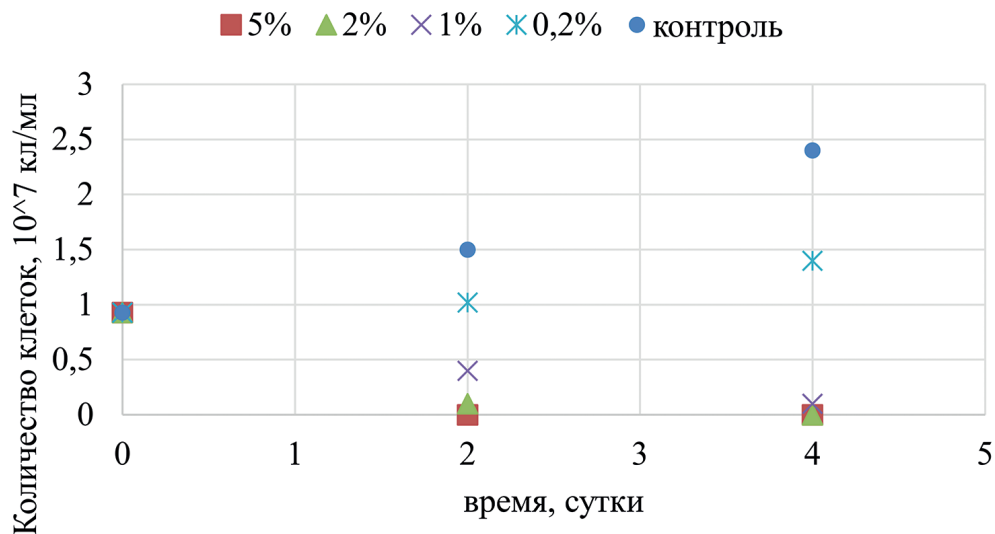


Рис. 2. Изменение численности клеток микроорганизмов в зависимости от плотности пульпы при комнатной температуре на питательной среде 9 KS с 2 г/л Fe^{3+} и при начальном $\text{pH} = 1,5$

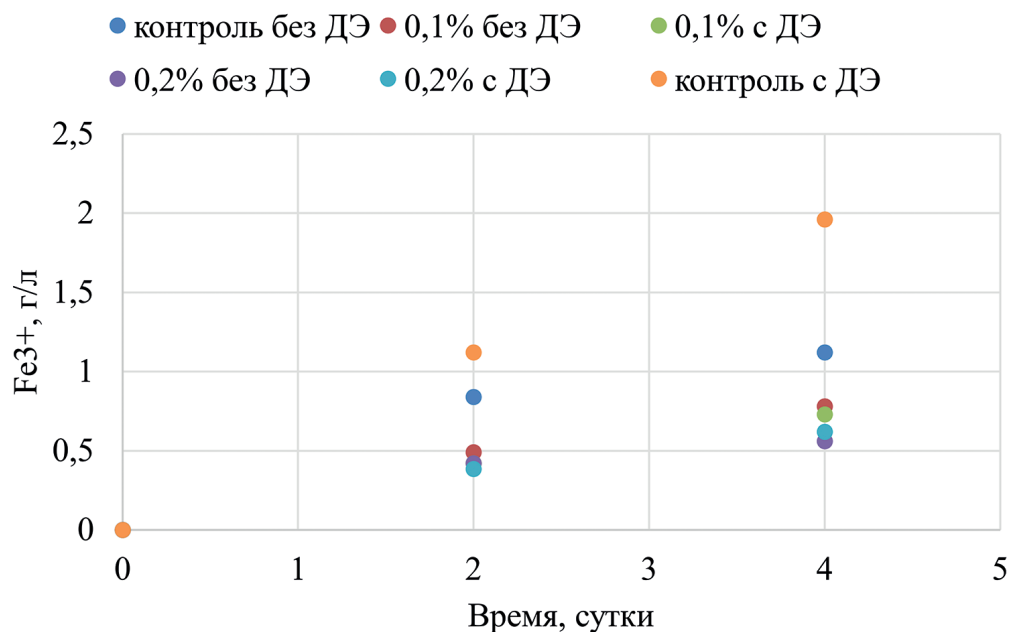


Рис. 3. Изменение концентрации трехвалентного железа в культуральной жидкости при 30 °С в зависимости от присутствия дополнительных источников органики в среде и плотности пульпы

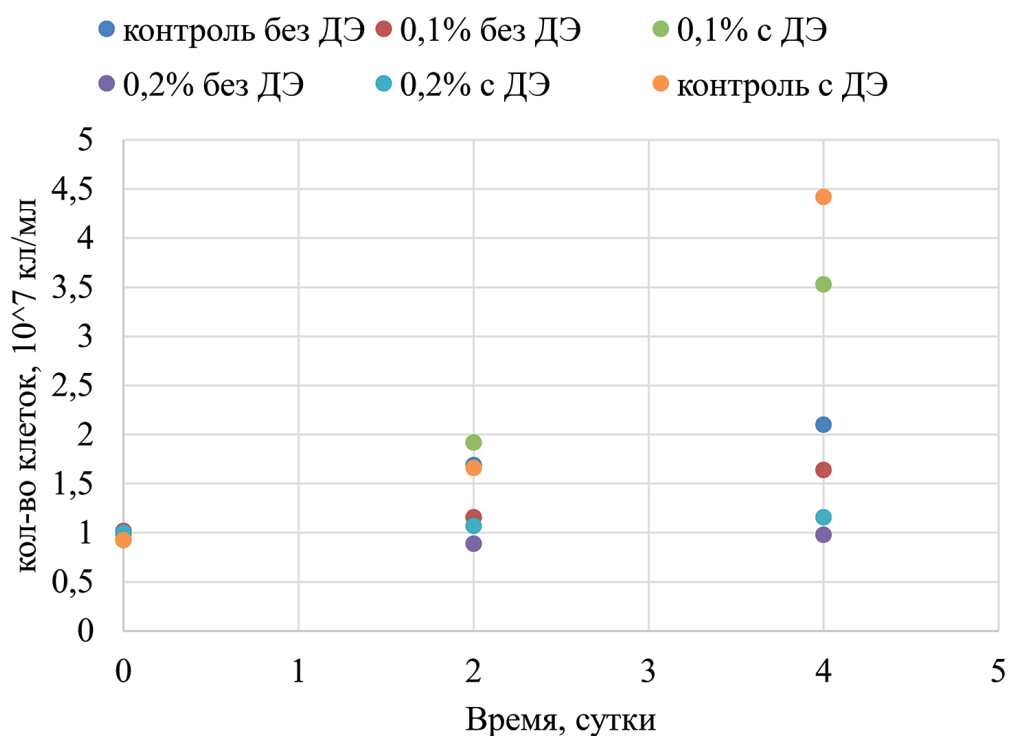


Рис. 4. Изменение численности клеток в зависимости от наличия органики в среде и плотности пульпы при 30 °С

Установлено, что внесение органического субстрата положительно сказывается на активности микроорганизмов при 30 °С, в то же время, ингибирующий эффект вносимой твердой фазы заметен даже при концентрации 0,1%.

Активность культуры в схожем опыте при 42 градусах Цельсия оказалась следующей (рисунки 5-6):

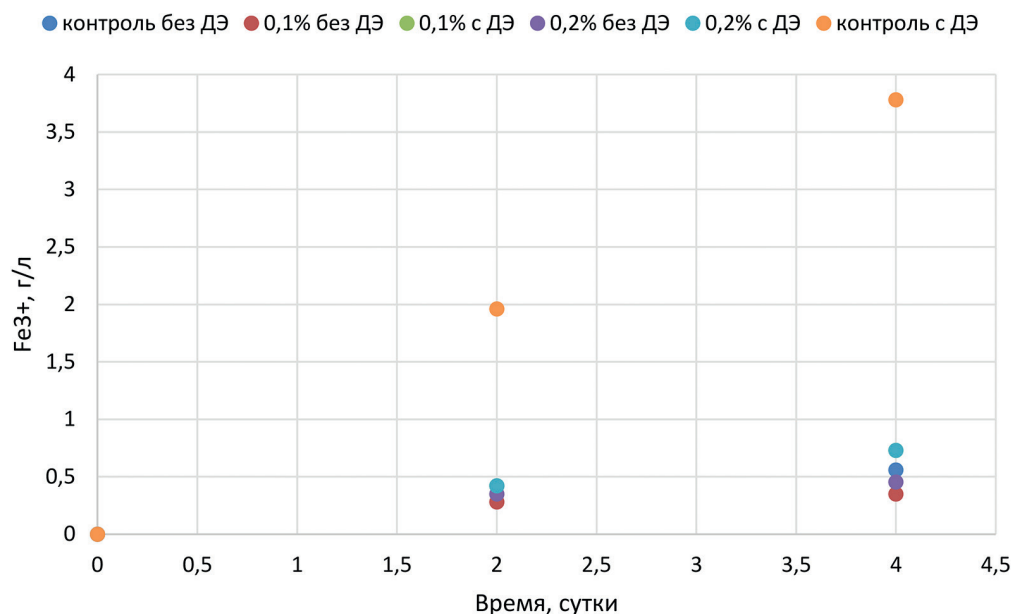


Рис. 5. Изменение концентрации трехвалентного железа в культуральной жидкости в зависимости от наличия дополнительной органики в питательной среде и плотности пульпы при 42 градусах

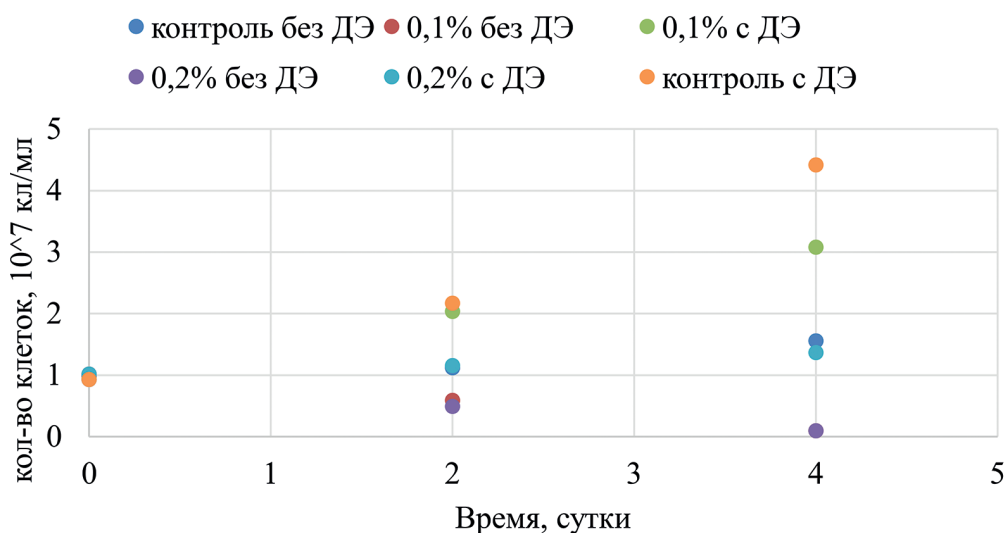


Рис. 6. Изменение количества клеток в ходе эксперимента при 42 градусах Цельсия

Внесение дрожжевого экстракта положительно сказалось на активности культуры в ходе экспериментов при 42 °С.

Эксперименты по одностадийному выщелачиванию образца пылевой фракции печатных плат показали значительное снижение ростовых характеристик и окислительной активности микроорганизмов в отношении двухвалентного железа даже при низкой плотности пульпы (0,1%), что не позволяет вести процесс одностадийного выщелачивания технологически целесообразно.

Двухстадийное выщелачивание предполагает разделение процесса окисления металлосо-державшего сырья и регенерацию выщелачивающего раствора (раствора сульфата железа Fe³⁺) с помощью микроорганизмов. В текущем году были проведены эксперименты для определения оптимальных параметров для стадии выщелачивания: плотность пульпы, температура, исходная концентрация трехвалентного железа в выщелачивающем растворе. Эксперименты проводили в стеклянной емкости, снабженной внешним перемешивающим устройством, с частотой враще-

ния 300 об/мин, рабочий объем составлял 200 мл пульпы. При проведении процесса анализировалось содержание меди и никеля в растворе. Результаты серии экспериментов по химическому выщелачиванию представлены в таблице 2:

Таблица 2.

Результаты химического выщелачивания спустя 180 минут от загрузки сырья в реактор

Извл. Ni, %	Извл. Cu, %	Температура	[Fe ³⁺] стартовая, г/л	Плотность пульпы, %
6,6	0,0	50	0	10
9,2	0,5	75	0	10
21,9	6,2	50	10	10
16,0	17,3	25	10	10
21,6	24,2	75	10	10
18,3	35,2	50	15	10
14,2	48,8	50	15	5
17,4	51,9	50	10	5

Химическое выщелачивание показало высокую скорость мобилизации меди и никеля в раствор, однако, остается ряд технических трудностей (нелинейность динамики извлечения меди в раствор, говорящая о протекании сторонних процессов, сложность поддержания температуры и pH в ходе выщелачивания, неоднородность перемешивания твердой фазы и тд), определение природы которых и устранение предстоит в ходе дальнейшей работы.

Основные выводы: Одностадийное выщелачивание пылевой фракции измельчения печатных плат затрудняется ингибирующим эффектом на смешанную культуру ацидофильных микроорганизмов при плотности пульпы 0,1 % и выше, что не представляется эффективным подходом для переработки данного сырья. Химическое выщелачивание раствором сульфата Fe³⁺, являющееся стадией двухстадийного процесса, показывает удовлетворительные результаты и может быть использовано при извлечении меди и никеля в раствор. Однако, процесс химического выщелачивания требует дальнейшей оптимизации, прежде всего стадии регенерации окислителя.

ЛИТЕРАТУРА

1. Bulaev, A. G. «Effect of organic carbon source on pyrite biooxidation by moderately thermophilic acidophilic microorganisms.» Microbiology 89.3 (2020): 301-308.
2. Harvey J. P., Khalil M., Chaouki J. Pyrometallurgical processes for recycling waste electrical and electronic equipment //Electronic Waste: Recycling and Reprocessing for a Sustainable Future. – 2022. – С. 135-164.
3. Jadhao P. R. et al. Biohydrometallurgy: A sustainable approach for urban mining of metals and metal refining //Catalysis for Clean Energy and Environmental Sustainability: Biomass Conversion and Green Chemistry-Volume 1. – 2021. – С. 865-892.
4. Magoda K., Mekuto L. Biohydrometallurgical recovery of metals from waste electronic equipment: current status and proposed process //Recycling. – 2022. – Т. 7. – №. 5. – С. 67.
5. Nithya R., Sivasankari C., Thirunavukkarasu A. Electronic waste generation, regulation and metal recovery: a review //Environmental Chemistry Letters. – 2021. – Т. 19. – С. 1347-1368.
6. Oluokun O. O., Otunniyi I. O. Chemical conditioning for wet magnetic separation of printed circuit board dust using octyl phenol ethoxylate //Separation and Purification Technology. – 2020. – Т. 240. – С. 116586.

7. Shahabuddin M. et al. A review of the recent development, challenges, and opportunities of electronic waste (e-waste) //International Journal of Environmental Science and Technology. – 2023. – Т. 20. – №. 4. – С. 4513-4520.
8. Shi J. et al. The health concern of polychlorinated biphenyls (PCBs) in a notorious e-waste recycling site //Ecotoxicology and Environmental Safety. – 2019. – Т. 186. – С. 109817.
9. Xiang Y. et al. Bioleaching of copper from waste printed circuit boards by bacterial consortium enriched from acid mine drainage //Journal of hazardous materials. – 2010. – Т. 184. – №. 1-3. – С. 812-818.
10. Zhu X. et al. Recovery of high-grade copper from waste printed circuit boards by mechanical-grinding assisted flotation //Journal of cleaner production. – 2019. – Т. 232. – С. 1251-1256.
11. Булаев А. Г. и др. Бיוвыщелачивание смеси никель-медной руды с медно-никелевым шлаком и медно-цинкового концентрата с медно-цинковым шлаком //Научные основы и практика переработки руд и техногенного сырья. – 2022. – С. 75-80.

Kolosoff Alexander Vladimirovich
RESEARCH CENTER OF BIOTECHNOLOGY RAS

PROCESSING OF ELECTRONIC SCRAP (PRINTED BOARDS) BY BIOTECHNOLOGICAL METHODS

Abstract. *Electronic waste is a secondary source of non-ferrous and precious metals, the importance of which is rapidly growing. E-waste treatment by traditional metallurgical methods can be difficult due to the formation of by-products from processing. The development of methods for biohydrometallurgical processing of the main waste from the processing of printed circuit boards - the dust fraction - formed the basis of this work. Experiments of processing the dust fraction using one-stage and two-stage leaching were carried out. Since it was found that the by-product suppresses the activity of microorganisms, the concentration of the solid leachable phase was experimentally determined under various conditions at which the activity of the culture of acidophilic microorganisms remains detectable. In addition, the process of chemical leaching of the dust fraction with a sulfuric acid solution of ferric sulfate, which can be obtained as a product of the vital activity of acidophilic microorganisms, was investigated.*

Keywords: *electronic waste, biohydrometallurgy, chemical leaching, bioleaching, acidophilic microorganisms.*

Лобанова Ярослава Владимировна

аспирант ФИЦ Биотехнологии РАН 2 года обучения
научная специальность 1.5.3 Молекулярная биология
e-mail: yaraloban@yandex.ru

Научный руководитель

Женило Светлана Валерьевна

кандидат физико-математических наук,
с.н.с. лаборатории геномики и эпигеномики позвоночных



СТРУКТУРНЫЕ ОСОБЕННОСТИ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ МЕТИЛ-ДНК СВЯЗЫВАЮЩЕГО БЕЛКА KAISO И TRIM28

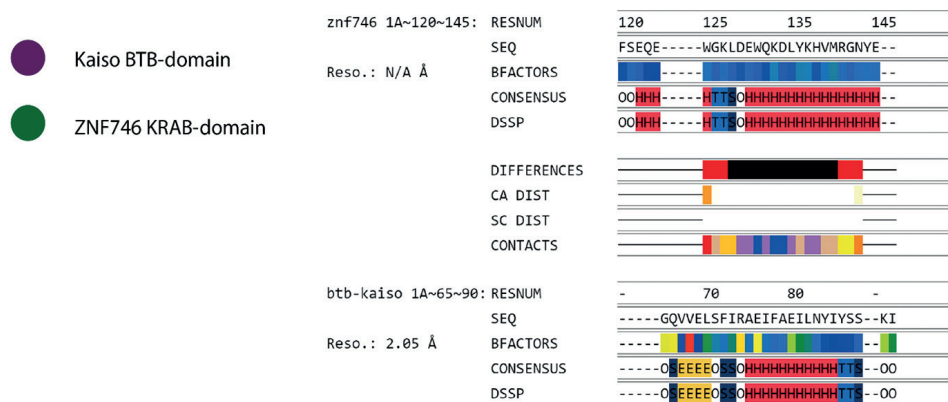
Аннотация. Активность транскрипционных факторов может значительно изменяться вследствие посттрансляционных модификаций, влияя на конформацию этих белков, их клеточную локализацию, взаимодействие с кофакторами и ДНК. Одной из таких модификаций является сумоилирование. TRIM28 является транскрипционным корепрессором, обеспечивающим поддержание стабильности генома и установление импринтинга, а также белком активно подвергающимся сумоилированию в различных условиях. Ранее было показано, что TRIM28 напрямую взаимодействует с транскрипционным фактором Kaiso. Более того, наблюдалось значительное усиление сумоилирования TRIM28 в присутствии Kaiso. В данной работе были определены домены Kaiso и TRIM28 важные для сумоилирования последнего. Также были охарактеризованы участки Kaiso, позволяющие взаимодействовать с SUMO, и определена их роль в регуляции сумоилирования TRIM28.

Ключевые слова: посттрансляционные модификации, сумоилирование, эпигенетика, транскрипционный фактор, метил-ДНК связывающий белок.

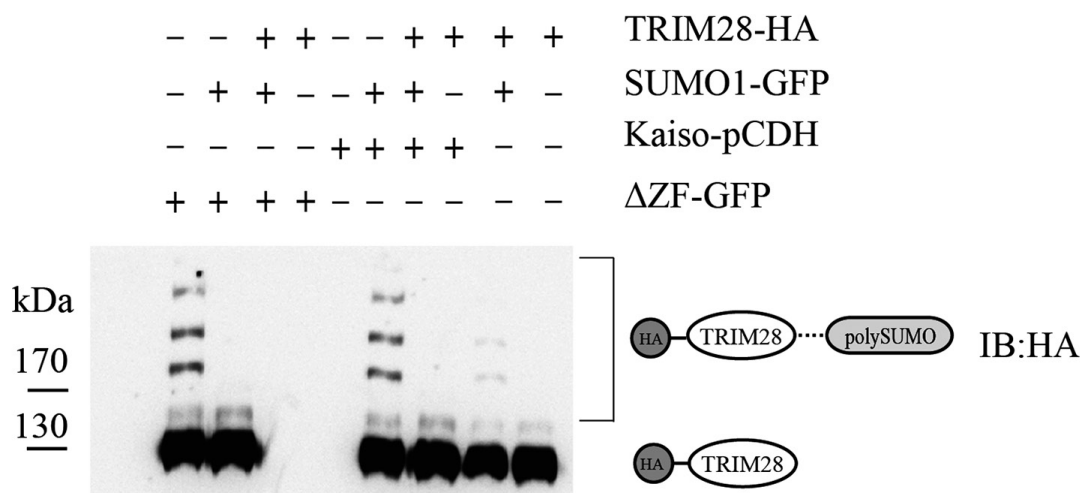
Посттрансляционные модификации могут значительно изменять активность транскрипционных факторов, влияя на их конформацию, клеточную локализацию, взаимодействие с кофакторами и ДНК. Одной из таких модификаций является сумоилирование белков, которое аналогично убиквитинированию за исключением того, что оно обычно не приводит к деградации белков [Perry, Tainer and Boddy, 2008].

TRIM28 является транскрипционным корепрессором, обеспечивающим поддержание стабильности генома и установление импринтинга. TRIM28 подвергается полисумоилированию в присутствии E3 SUMO лигаз [Masclé *et al.*, 2007], при связывании с ДНК для регуляции экспрессии соответствующих генов [(Lee *et al.*, 2018)], а также для замалчивания поврежденных участков ДНК [Bunch and Calderwood, 2015]. Также было показано усиление сумоилирования TRIM28 в присутствии KRAB-домена белка ZNF746 [Masclé *et al.*, 2007]. KRAB является репрессионным доменом семейства KRAB-белков с цинковыми пальцами, которые известны как основные факторы, привлекающие TRIM28 к хроматину [Randolph, Hyder and D'Orso, 2022)].

Основываясь на ранее полученных данных о сумоилировании TRIM28 в присутствии метил-ДНК-связывающего белка Kaiso и снижения количества TRIM28 на хроматине в условиях нокаута по гену Kaiso, в этой работе мы решили проверить, какие домены Kaiso и TRIM28 нужны для сумоилирования последнего.



В ходе котрансфекции усеченной формы Kaiso без цинковых пальцев (Δ ZF-GFP) и TRIM28 в присутствии SUMO1 была показана достаточность ВТВ-домена Kaiso для гиперсумоилирования TRIM28 (Рис.2).



Котрансфекция усеченных форм TRIM28 и Kaiso в присутствии SUMO1 показала важность целостности структуры TRIM28 для его гиперсумоилирования в присутствии Kaiso (Рис.3).

109

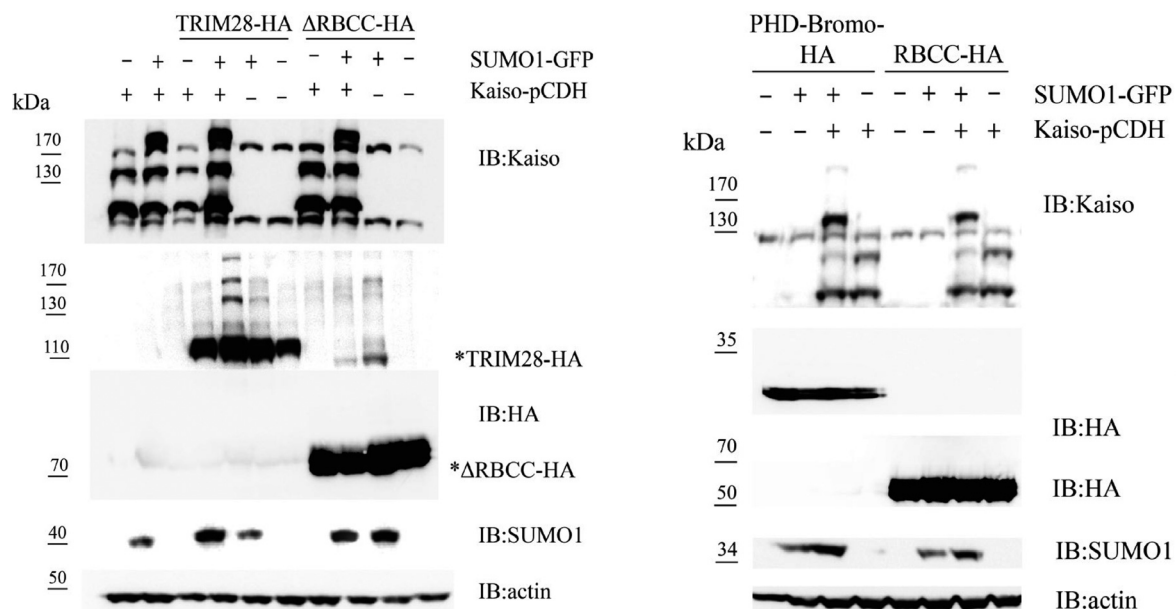


Рис. 3. Котрансфекция усеченных форм TRIM28 и Kaiso в присутствии SUMO1 с дальнейшим анализом полученных клеточных лизатов с помощью вестерн-блоттинга

С помощью сайт-направленного мутагенеза были получены одиночные и сочетанные мутации в SIMs Kaiso. Учитывая то, что связывание с SUMO белков с помощью SIM может значительно изменять их клеточную локализацию [Lascorz et al., 2021], была произведена визуализация распределения трансфицированных мутантных форм Kaiso, конъюгированных с флуоресцентным белком GFP (рис.4).

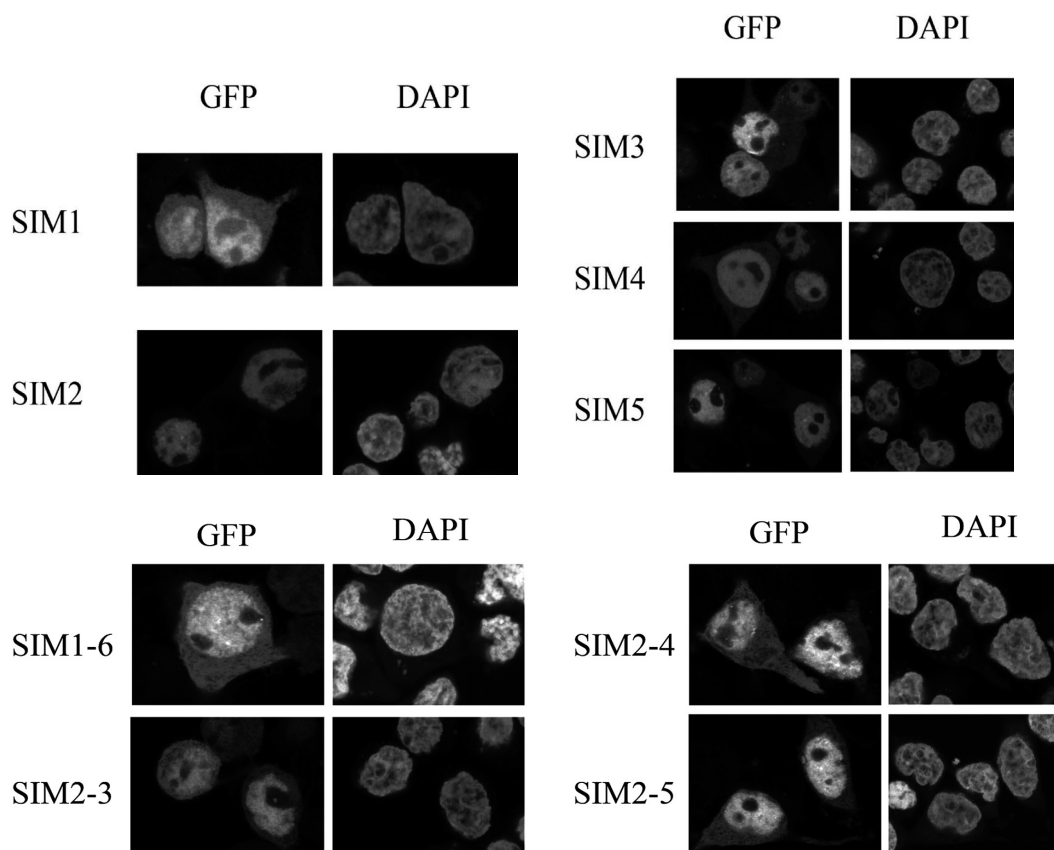


Рис. 4. Визуализация распределения трансфицированных мутантных по SIMs форм Kaiso, конъюгированных с флуоресцентным белком GFP

Преимущественно ядерная локализация Kaiso частично перераспределялась в сторону цитоплазматической в случае SIM1* и SIM2-5*.

Котрансфекция Kaiso с мутацией во всех его SIMs показала неважность SIMs для гиперсумоилирования TRIM28 в присутствии Kaiso (рис. 5).

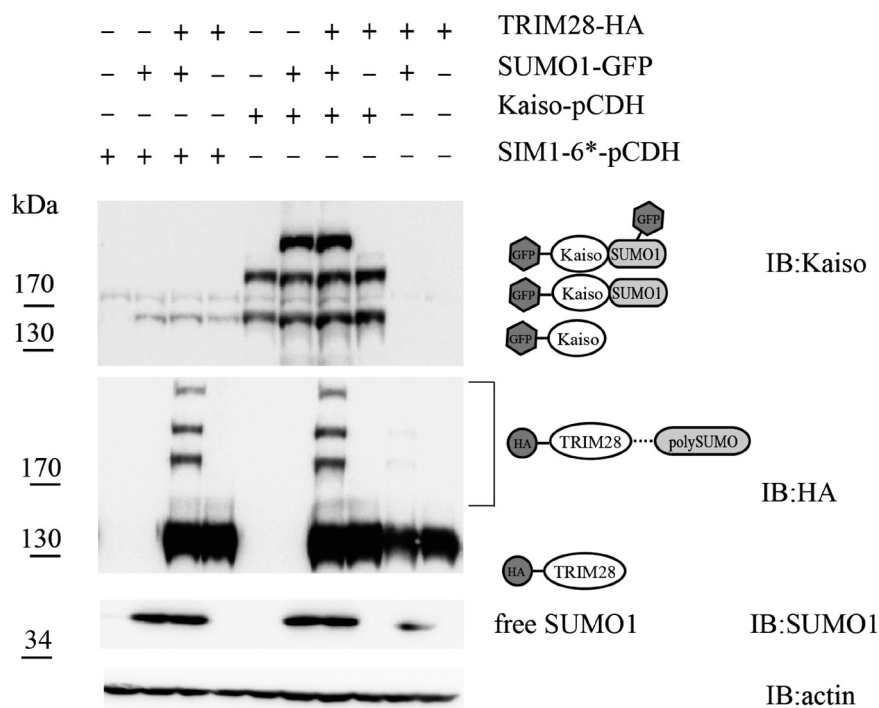


Рис. 5. Котрансфекция мутантной по всем его SIMs формы Kaiso и TRIM28 в присутствии SUMO1 с дальнейшим анализом полученных клеточных лизатов с помощью вестерн-блоттинга

Таким образом, мы показали, что для гиперсумоилирования TRIM28 в присутствии Kaiso необходим ВТВ-домен Kaiso, а также структурная целостность TRIM28. Более того, SIMs Kaiso оказались неважны для гиперсумоилирования TRIM28, что позволяет рассматривать Kaiso скорее в качестве фактора, тем или иным образом усиливающего аффинность субстрата к ферментам сумоилирования.

Основные выводы: ВТВ-домен Kaiso важен для сумоилирования TRIM28, SIMs Kaiso не важны для сумоилирования TRIM28.

ЛИТЕРАТУРА

1. Bunch, H. and Calderwood, S.K. (2015) 'TRIM28 as a novel transcriptional elongation factor', *BMC molecular biology*, 16, p. 14.
2. Lascorz, J. et al. (2021) 'SUMO-SIM interactions: From structure to biological functions', *Seminars in cell & developmental biology* [Preprint]. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2021.11.007>.
3. Lee, A. et al. (2018) 'Characterization of interaction between Trim28 and YY1 in silencing proviral DNA of Moloney murine leukemia virus', *Virology*, 516, pp. 165–175.
4. Mascle, X.H. et al. (2007) 'Sumoylation of the transcriptional intermediary factor 1beta (TIF1beta), the Co-repressor of the KRAB Multifinger proteins, is required for its transcriptional activity and is modulated by the KRAB domain', *The Journal of biological chemistry*, 282(14), pp. 10190–10202.

5. Perry, J.J.P., Tainer, J.A. and Boddy, M.N. (2008) 'A SIM-ultaneous role for SUMO and ubiquitin', *Trends in biochemical sciences*, 33(5), pp. 201–208.
6. Pichler, A. *et al.* (2017) 'SUMO conjugation – a mechanistic view', *Biomolecular concepts*, 8(1), pp. 13–36.
7. Randolph, K., Hyder, U. and D'Orso, I. (2022) 'KAP1/TRIM28: Transcriptional Activator and/or Repressor of Viral and Cellular Programs?', *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 12, p. 834636.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ РАБОТЫ

Статьи в рецензируемых журналах:

1. Lobanova, Y., Filonova, G., Kaplun, D., Zhigalova, N., Prokhortchouk, E., & Zhenilo, S. (2023). TRIM28 regulates transcriptional activity of methyl-DNA binding protein Kaiso by SUMOylation. *Biochimie* (Vol. 206, pp. 73–80).
2. Lobanova, Y. V., & Zhenilo, S. V. (2024). Genomic Imprinting and Random Monoallelic Expression. In *Biochemistry (Moscow)* (Vol. 89, Issue 1, pp. 84–96). Pleiades Publishing Ltd.

Тезисы докладов:

1. Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии. Сборник тезисов. XXXIII ЗИМНЯЯ МЕЖДУНАРОДНАЯ МОЛОДЁЖНАЯ НАУЧНАЯ ШКОЛА. Москва, 2021. Издательство: Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН. Лобанова Я.В., Женило С.В., Картирование доменов, вовлеченных во взаимодействие белков TRIM28 и KAISO, eLIBRARY ID: 45751894 (устный доклад, диплом второй степени в конкурсе молодых ученых).
2. Сборник тезисов 26-ой Пущинской школы-конференции молодых ученых с международным участием «БИОЛОГИЯ – НАУКА XXI ВЕКА». Пущино: ФИЦ ПНЦБИ РАН, 2023. – 358 с. Лобанова Я.В., Женило С.В., Взаимная регуляция сумоилирования метил-ДНК связывающего белка Kaiso и транскрипционного корепрессора TRIM28 (постерный доклад).
3. Сборник научных трудов Международной конференции «Геномный анализ и генетическая модификация клеток», 10-11 октября 2023 г., ИБР РАН., Москвасборник, 2023, Лобанова Я.В., Мазур А.М., Прохорчук Е.Б., Абрамов П.М., Женило С.В., Kaiso — новый регулятор случайной моноаллельной экспрессии (устный доклад).
4. XXIII Зимняя молодежная школа по биофизике и молекулярной биологии: тезисы докладов Молодежной конференции, Санкт-Петербург, 26 февраля – 2 марта 2024 г. – Гатчина: Изд-во НИЦ «Курчатовский институт» – ПИЯФ, 2024. – 208 с. (постерный доклад)

Lobanova Yaroslava Vladimirovna
RESEARCH CENTER OF BIOTECHNOLOGY RAS

STRUCTURAL FEATURES OF INTERACTION OF METHYL-DNA BINDING PROTEIN KAISO AND TRIM28

Abstract. *The activity of transcription factors can change significantly due to post-translational modifications, affecting the conformation of these proteins, cellular localization, and interaction with cofactors and DNA. One such modification is sumoylation. TRIM28 is a transcriptional corepressor that ensures the maintenance of genome stability and the establishment of imprinting,*

as well as a protein that is actively subject to sumoylation under various conditions. TRIM28 was previously shown to directly interact with the transcription factor Kaiso. Moreover, a significant increase in TRIM28 sumoylation was observed in the presence of Kaiso. In this work, the Kaiso and TRIM28 domains were studied to find out their importance for sumoylation of the latter. The regions of Kaiso that allow interaction with SUMO were also characterized and their role in regulating TRIM28 sumoylation was determined.

Keywords: *post-translational modifications, sumoylation, epigenetics, transcription factor, methyl-DNA binding protein.*

Пахомова Мария Дмитриевна
аспирант ФИЦ Биотехнологии РАН 2 года обучения
научная специальность 1.5.3 Молекулярная биология
e-mail: mari.pakhomova.99@mail.ru

Научный руководитель
Агафонов Михаил Олегович
доктор биологических наук,
руководитель группы геномного редактирования
промышленных микроорганизмов



ВЛИЯНИЕ НАРУШЕНИЯ ГЛИКОЗИЛИРОВАНИЯ БЕЛКОВ В СЕКРЕТОРНОМ ПУТИ *OGATAEA PARAPOLYMORPHA* НА ГОМЕОСТАЗ КАЛЬЦИЯ И АКТИВАЦИЮ ПРОТЕИНКИНАЗЫ HOG1

Аннотация. Функция кальция в эукариотической клетке как вторичного мессенджера требует поддержания его концентрации в цитозоле ($[Ca^{2+}]_{cyt}$) на низком уровне. У дрожжей это обеспечивается преимущественно АТФазой *Pmc1*. Инактивация *Pmc1* у дрожжей рода *Ogataea* приводит к повышению чувствительности к додецилсульфату натрия (SDS), что обычно связывают с нарушениями клеточной стенки, в частности, при нарушениях гликозилирования белков в секреторном пути. Однако у мутанта *pmc1* таких нарушений выявлено не было. Более того, анализ мутаций супрессирующих это проявление показал, что оно связано с регуляцией клеточного цикла. Одним из генов, влияющих на чувствительность к SDS, вызванной нарушением *PMc1*, был ген *HOG1*, который кодирует MAP-киназу, участвующую в осморегуляции. Кроме того, протеинкиназа *Hog1* участвует в регуляции клеточного цикла. Было предположено, что и у мутантов по гликозилированию белков в секреторном пути гиперчувствительность к SDS связана с входом кальция в цитозоль и активацией *Hog1* и неспособностью клеток справиться с повышением $[Ca^{2+}]_{cyt}$.

Ключевые слова: протеин-О-маннозилтрансферазы, α-маннозилтрансфераза, GEM-GECO, *Ogataea parapolyomorpha*, гликозилирование, гомеостаз кальция, MAP-киназа *Hog1*.

Дрожжи часто используют в качестве организма-хозяина для получения рекомбинантных белков, поскольку они обладают преимуществами одноклеточного микроорганизма и могут обеспечивать посттрансляционный процессинг белков по характерному для эукариот пути. Одной из основных проблем, которые возникают при использовании дрожжей для продукции чужеродных белков, является наличие нежелательных посттрансляционных модификаций, в частности N- и O-гликозилирования [1]. Для предотвращения нежелательного гликозилирования в геном реципиентных штаммов вводят мутации, которые зачастую приводят к изменению физиологии дрожжевых клеток, например, к повышению чувствительности к детергентам [2]. В нашей лаборатории было установлено, что у дрожжей *Ogataea parapolyomorpha* при добавлении в среду додецилсульфата натрия (SDS) резко повышается концентрация кальция в цитозоле (неопубликованные данные), а инактивация гена вакуолярной Ca^{2+} -АТФазы *Pmc1*, участвующей в поддержании концентрации цитозольного катиона Ca^{2+} , ведет к увеличению чувствительности к SDS, не связанной с изменениями в клеточной стенке [3]. Было показано, что чувствительность к SDS мутанта *pmc1*-Δ супрессируется инактивацией гена *HOG1*, кодирующего митоген-активируемую протеинкиназу, регулирую-

ющую адаптацию клетки к гиперосмотическим условиям и клеточный цикл. Данные, полученные при изучении мутанта *pmt1-Δ* дрожжей *O. parapolymorpha*, позволяли предполагать, что токсичность SDS связана с Ca^{2+} -зависимой регуляцией активности протеинкиназы Hog1.

На предыдущем этапе работы нами были получены штаммы *O. parapolymorpha*, продуцирующие индикатор кальция GEM-GECO, в которых были инактивированы гены *PMT1*, *PMT2*, *PMT4*, кодирующие протеин-О-маннозилтрансферазы эндоплазматического ретикулума, а также *MNN2* и *OCH1*, кодирующие α -1,2- и α -1,6-маннозилтрансферазы аппарата Гольджи [4]. Индикатор GEM-GECO позволяет отслеживать изменения $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{цит}}$ в клетках дрожжей [5]. Для измерения флуоресценции GEM-GECO в индивидуальных клетках был использован метод проточной цитометрии. В качестве характеристики $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{цит}}$ использовали соотношение значений интенсивностей флуоресценции GEM-GECO при длине волны 450 нм и 525 нм.

При нормальных условиях выращивания $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{цит}}$ у мутантов *O. parapolymorpha pmt1-Δ*, *pmt2-Δ*, *pmt4-Δ*, *mnn2-Δ* и *och1-Δ* оказалась выше, чем у дикого типа. Добавление SDS в культуральную среду вызывало резкий скачок $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{цит}}$ в клетках как дикого типа, так и у мутантов по гликозилированию. Однако динамика изменения концентрации кальция при воздействии SDS у мутантов *pmt1-Δ*, *pmt2-Δ*, *pmt4-Δ*, *mnn2-Δ* *O. parapolymorpha* отличалась от дикого типа. В клетках с нарушением *MNN2* $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{цит}}$ со временем почти не менялась, в то время как в клетках мутантов *pmt1-Δ*, *pmt2-Δ*, *pmt4-Δ* сохранялась адаптация к действию SDS, однако она была хуже, чем у дикого типа. Инактивация *OCH1* не оказывала влияние на характер изменения $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{цит}}$, что по всей видимости указывает на иной механизм ингибирования роста клеток под действием SDS.

Нами было установлено, что инактивация гена MAP-киназы HOG1, супрессирующей гиперчувствительность к SDS у мутантов *pmt1-Δ*, подавляет чувствительность к SDS как у мутантов *O. parapolymorpha* с нарушенным гликозилированием *pmt1-Δ*, *pmt4-Δ*, *mnn2-Δ*, так и у штамма без таких нарушений. У мутантов с нарушенным О-гликозилированием делеция гена *HOG1* подавляла чувствительность к SDS практически до такого же уровня, как и у штамма с ненарушенным гликозилированием. Это означало, что гиперчувствительность к SDS у этих мутантов опосредована действием протеинкиназы Hog1. Однако у мутантов *mnn2-Δ*, инактивация гена HOG1 только частично подавляет чувствительность к детергенту и в данном случае этот фенотип должен определяться другим механизмом.

Для того чтобы определить степень активации сигнального пути HOG в клетках различных штаммов, проводили анализ общего количества Hog1 и количества его дифосфорилированной активной формы Hog1-PP в клеточных лизатах методом иммуноблоттинга. В первом случае использовали поликлональные антитела против Hog1 *O. parapolymorpha*, а во втором – моноклональные антитела против дифосфорилированного пептида активаторной петли человеческого p38.

Добавление SDS в культуральную среду приводило к резкому увеличению количества дифосфорилированной формы Hog1 у дикого типа в первые 3 минуты, которое заметно уменьшается в течение 20 минут. Данный эффект коррелирует с динамикой изменения $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{цит}}$ при действии SDS. Нарушения О-маннозилтрансфераз *Pmt1*, *Pmt2*, и *Pmt4*, а также α -1,2- маннозилтрансферазы *Mnn2* и α -1,6-маннозилтрансферазы *Och1* приводило к повышению базального уровня фосфорилирования Hog1, что указывает на активацию пути HOG в ответ на нарушение гликозилирования. Также наличие SDS в среде приводит к еще большему увеличению количества Hog1-PP у всех мутантов с дефектным N- и О-гликозилированием. Наиболее сильное повышение фосфорилирования в ответ на SDS наблюдалось у мутанта *mnn2-Δ*.

Основные выводы:

Ингибирующее действие низких концентраций SDS на клетки дрожжей *O. parapolymorpha* связано с входом Ca^{2+} в цитозоль из внешней среды и активацией Hog1.

ЛИТЕРАТУРА

1. Delic M., Göngrich R., Mattanovich D., Gasser B. Engineering of Protein Folding and Secretion—Strategies to Overcome Bottlenecks for Efficient Production of Recombinant Proteins // *Antioxid. Redox Signal.* – 2014. – Vol. 21. – P. 414–437.
2. Kanik-Ennulat C., Montalvo E., Neff N. Sodium orthovanadate-resistant mutants of *Saccharomyces cerevisiae* show defects in Golgi-mediated protein glycosylation, sporulation and detergent resistance // *Genetics.* – 1995. – Vol. 140. – P. 933–943.
3. Fokina A., Socolov S., Hyun Ah Kang, Ter-Avanesyan M., Agaphonov M. Inactivation of Pmc1 vacuolar Ca^{2+} ATPase causes G2 cell cycle delay in *Hansenula polymorpha* // *Cell Cycle.* – 2012. – Vol. 11 (4). – P. 778 – 784.
4. Пахомова М.Д. ИНВАКТИВАЦИЯ ГЕНОВ, ОТВЕТСТВЕННЫХ ЗА РАЗНЫЕ ТИПЫ ГЛИКОЗИЛИРОВАНИЯ, В ШТАММЕ *OGATAEA PARAPOLYMORPHA*, ПРОДУЦИРУЮЩЕМ ГЕНЕТИЧЕСКИ КОДИРУЕМЫЙ ИНДИКАТОР КАЛЬЦИЯ GEM-GECO // Сборник тезисов отчетной конференции аспирантов ФИЦ Биотехнологии РАН: направление подготовки 06.06.01 Биологические науки (19-21 июня 2023 г.) / под ред. В.О. Попова, А.Н. Фёдорова; сост. Ю.В.Рагузова, М.В. Костоломова. – М.: ВАШ ФОРМАТ. – 2023. – С. 134-136. (тезисы и устный доклад)
5. Kulakova M.V., Karginov, A.V., Alexandrov A.I., Agaphonov M.O. The GEM-GECO Calcium Indicator Is Useable in *Ogataea parapolymorpha* Yeast, but Aggravates Effects of Increased Cytosolic Calcium Levels // *Int. J. Mol. Sci.* – 2022. – Vol. 23. – P. 10004.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ РАБОТЫ

Статьи в рецензируемых журналах:

1. Karginov A.V., Tarutina M.G., Lapteva A.R., Pakhomova M.D., Galliamov A.A., Filkin S.Y., Fedorov A.N., Agaphonov M.O. A Split-Marker System for CRISPR-Cas9 Genome Editing in Methylophilic Yeasts // *Int. J. Mol. Sci.* – 2023. – Vol. 24. – No.9. – P. 8173.

Тезисы докладов:

1. Пахомова М.Д., Кулакова М.В., Каргинов А.В., Красовитов К.В., Агафонов М.О. Взаимосвязь проявлений нарушений гликозилирования белков в секреторном пути с Ca^{2+} -зависимой регуляцией активности протеинкиназы Hog1 // 4-й Российский микробиологический конгресс (г. Томск, 24 сентября – 29 сентября 2023 г.) – Томск. – 2023. – С. 181-182.

Pakhomova Maria Dmitrievna

RESEARCH CENTER OF BIOTECHNOLOGY RAS

THE EFFECT OF DISRUPTED GLYCOSYLATION OF PROTEINS IN THE SECRETORY PATHWAY OF OGATAEA PARAPOLYMORPHA ON CALCIUM HOMEOSTASIS AND ACTIVATION OF PROTEIN KINASE HOG1

Abstract. *The function of calcium in the eukaryotic cell as a secondary messenger requires maintaining its concentration in the cytosol ($[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$) at a low level. In yeast, this is provided mainly by Pmc1 ATPase. Inactivation of Pmc1 in yeast of the genus *Ogataea* leads to increased sensitivity*

to sodium dodecyl sulfate (SDS), which is usually associated with cell wall disorders, in particular, with impaired glycosylation of proteins in the secretory pathway. However, no such abnormalities were found in the pmc1 mutant. Moreover, the analysis of mutations suppressing this manifestation showed that it is associated with the regulation of the cell cycle. One of the genes influencing sensitivity to SDS caused by PMC1 impairment was the HOG1 gene, which encodes a MAP kinase involved in osmoregulation. In addition, the protein kinase Hog1 is involved in the regulation of the cell cycle. It has been suggested that in mutants for glycosylation of proteins in the secretory pathway, hypersensitivity to SDS is associated with the entry of calcium into the cytosol and activation of Hog1 and the inability of cells to cope with an increase in $[Ca^{2+}]_{\text{cyt}}$.

Keywords: *protein-O-mannosyltransferases, α -mannosyltransferase, GEM-GECO, Ogataea parapolymorpha, glycosylation, calcium homeostasis, MAP-kinase Hog1.*

Работа выполнена при поддержке РФФИ (грант № 24-14-00090).

Салтыкова Виктория Алексеевна

аспирант ФИЦ Биотехнологии РАН 2 года обучения

научная специальность 1.5.11 Микробиология

e.mail: saltykova.v.a@yandex.ru

Научный руководитель

Дедыш Светлана Николаевна

доктор биологических наук,

зав. лабораторией молекулярной экологии

и филогеномики бактерий



НОВАЯ ФАКУЛЬТАТИВНАЯ МЕТИЛОТРОФНАЯ БАКТЕРИЯ СЕМЕЙСТВА ANCALOMICROBIACEAE, РАЗВИВАЮЩАЯСЯ В АССОЦИИ С METHYLOCOCCUS CAPSULATUS

Аннотация: *Метанотрофные бактерии, способные использовать метан в качестве единственного источника углерода и энергии, являются перспективными продуцентами биопротеина. Исследования в рамках кандидатской диссертации ставят целью направленное формирование состава микробной ассоциации для штамма-продуцента белка Methylococcus capsulatus, которая будет обеспечивать стабильность процесса ферментации, высокие продукционные характеристики и биобезопасность получаемого продукта. Работа второго года была направлена на изучение инвазивного вида бактерий, которые появлялись в составе сообщества в процессе незащищённого непрерывного культивирования, прикреплялись к клеткам продуцента и ухудшали процесс ферментации.*

Ключевые слова: *метанотрофная ассоциация, бактерии-спутники, незащищенное культивирование, метилотрофия.*

Метанотрофные бактерии – метаболически уникальная группа прокариот способная использовать метан в качестве единственного источника углерода – являются перспективным источником биопротеина. При непрерывном культивировании метанотрофных бактерий в условиях незащищенной ферментации спонтанно формируются микробные ассоциации, состоящие из метанотрофа-продуцента и бактерий-спутников [1, 8, 16,]. Так как состав метанотрофной ассоциации напрямую влияет на метаболический потенциал продуцента и определяет продукционные характеристики и биобезопасность конечного продукта, контроль качественного и количественного состава бактерий-спутников является одной из приоритетных задач.

В ходе культивирования ранее сформированной ассоциации *Methylococcus capsulatus* KN2 при различных температурах был обнаружен инвазивный морфотип палочковидных бактерий, которые прикреплялись к клеткам продуцента (рис. 1а). Последующий рост этих бактерий в тесной связи с *M. capsulatus* KN2 приводил к ухудшению ферментации и торможению процесса.

Исследования второго года были направлены на решение следующих задач: 1) выделение и идентификация инвазивных бактерий, ингибирующих рост штамма-продуцента; 2) получение и анализ последовательности генома данных бактерий и установление их таксономического положения; 3) исследование спектра утилизируемых субстратов инвазивных бактерий и возможного механизма их взаимодействия с метанотрофом-продуцентом *Methylococcus capsulatus* KN2.

Объект исследования – штамм S20 – был выделен из метанооксиляющего сообщества ферментёра, культивируемого в проточном режиме, методом посева предельных разведений на чашки с питательной средой R2A (Fluka). Новый штамм идентифицировали путем анализа последовательности гена 16S рРНК. ПЦР-амплификацию гена 16S рРНК проводили с использованием праймеров 9F (5'-GAGTTT-GATCMTGGCTCAG-3') и 1492R (5'-ACGGYTACCTTGT-TACGACTT-3') с условиями реакции по Weisburg et al. 1991 [12]. Морфологические наблюдения выполняли с помощью микроскопа Zeiss Axioplan 2 и программного обеспечения Axiovision 4.2 (Zeiss). Температурный оптимум и оптимум pH определяли при росте в жидкой среде R2. Спектр используемых источников углерода определяли на минеральной среде AMS [13] с добавлением потенциальных ростовых субстратов в концентрации 0,05% (мас./об.). Возможность потребления метанола в качестве ростового субстрата тестировали в концентрации до 10% (об./об.). Во всех экспериментах в качестве фактора роста добавляли дрожжевой экстракт в концентрации 0,005% (мас./об.).

Экстракцию геномной ДНК проводили по стандартному протоколу с использованием цетилтриметиламмония бромида (СТАВ) и фенола-хлороформа [15]. Библиотеку для секвенирования на платформе Nanopore получали с применением набора 1D ligation sequencing kit (SQKLSK108, Oxford Nanopore, UK). Секвенирование проводили на проточной ячейке R9.4 (FLO-MIN106) с использованием устройства MinION. Гибридную сборку коротких и длинных прочтений проводили с помощью Unicycler v.0.4.8 [14] и Pilon v1.24 [11]. Сборку оценивали с помощью Quast 5.0. [2] и Busco 5.1.2 [7]. Аннотацию генома выполняли с помощью Prokka [6] и BlastKOALA [3].

Геномное дерево было реконструировано с использованием базы данных GTDB (<https://github.com/Ecogenomics/GtdbTk>), версия 04-RS89. Филогенетическое дерево максимального правдоподобия было построено с использованием программного обеспечения MegaX [4]. Значения виртуальной ДНК-ДНК гибридизации оценивали при помощи Genome-to-Genome-Distance-Calculator (GGDC) [5]. Для оценки средней идентичности нуклеотидных (ANI) и аминокислотных последовательностей (AAI) использовали инструменты Kostas lab [9].

Согласно микроскопическим наблюдениям клетки штамма S20 были представлены тонкими палочками длиной до 8-10 мкм, способными образовывать розетки (рис 1б). Бактерии размножались неравномерным делением, молодые клетки были подвижны.

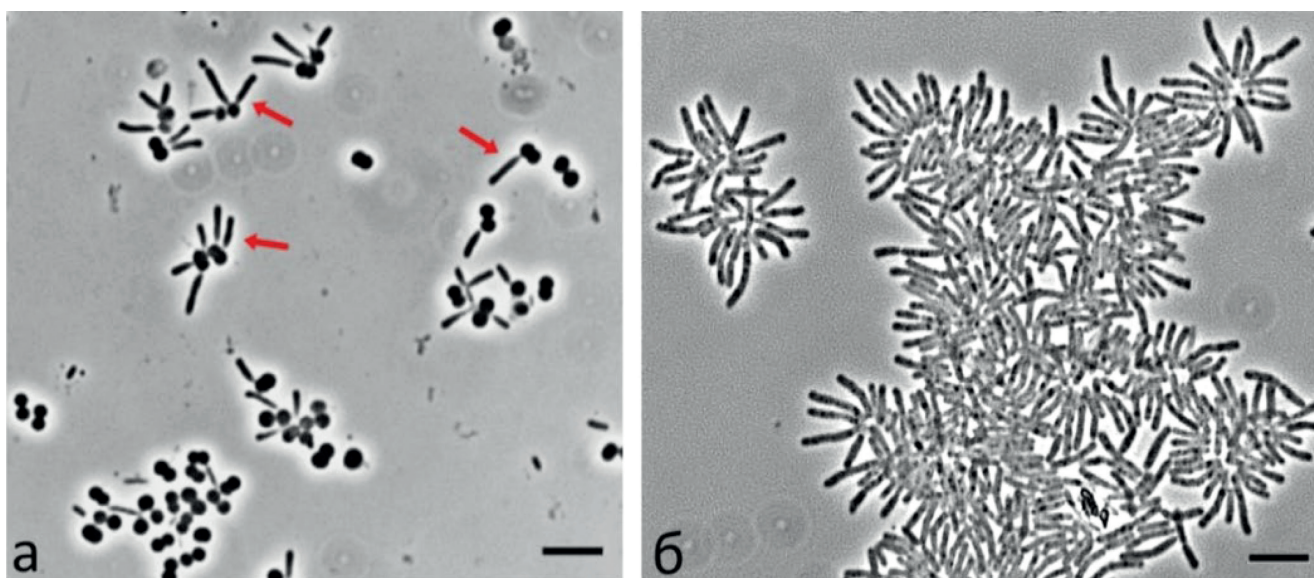


Рис.1. а – колонизация культуры *Methylococcus capsulatus* KN2 клетками штамма S20;
б – морфология штамма S20 (маркер – 5 мкм)

Штамм S20 был способен к росту в диапазоне температур 22-45°C (оптимум – 30-35 °C) при pH среды 4,5-8,5 (оптимум – pH 6,0). При проверке способности использовать C1-соединения рост на метане у данных бактерий не был обнаружен, но наблюдался на метаноле в широком диапазоне концентраций до 3% (оптимум – 0,1%). Другими источниками углерода для штамма S20 являлись ацетат, малат, сукцинат, пируват, лактат, глюкоза, фруктоза, галактоза, рибоза, манноза, арабиноза, ксилоза, этанол, казеин, пептон. Штамм не был способен к росту на сорбозе, меле-зито-зе, мальтозе, мелибиозе, трегалозе, рамнозе, целлобиозе, лактозе, метиламин гидрохлориде.

Итоговая сборка генома штамма S20 состояла из 2 контигов, общей длиной 4,3 млн пар оснований. Содержание ГЦ-пар в ДНК составило 62%. В геноме содержалось 3938 белок-кодирующих последовательностей, рРНК оперон представлен 3 копиями. В числе аннотированных генов были обнаружены 3 генных кластера, кодирующие метанолдегидрогеназы: ХохF-подобные лан-тан-зависимые и МхаF-подобные кальций-зависимые, обнаруживающие 80,48%, 68,28%, 50,08% идентичности аминокислотных последовательностей ХохF-метанолдегидрогеназе и 81,64%, 51,26%, 47,80% идентичности МхаF-метанолдегидрогеназе *Methylobacterium extorquens*, что подтверждает способность штамма S20 к метилотрофии. Также согласно геномным данным штамм S20 способен к фиксации атмосферного азота.

Филогеномный анализ на основе GTDB показал, что штамм S20 принадлежит к семейству *Ancalomicrobiaceae* (порядок *Rhizobiales*). Наибольшее сходство последовательности гена 16S рРНК штамма S20 наблюдалось с бактериями рода “*Prosthecodimorpha*” (“*Prosthecodimorpha hirschii*” 16^T и “*Prosthecodimorpha staley*” 22^T), которые недавно были реклассифицированы из рода *Prosthecomicrobium* семейства *Hyphomicrobiaceae* (95,02% идентичности последовательности гена 16S рРНК) [10]. Другими ближайшими родственниками являлись бактерии *Sicilibacillus lacustris* SA-279, *Pinisolibacter ravus* и *Ancalomicrobium adetum* NBRC 102456E9 (95,14%, 93,97% и 93,93% сходства последовательностей генов 16S рРНК, соответственно). Средняя идентичность нуклеотидных (ANI) и аминокислотных (AAI) последовательностей штамма S20 и *Prosthecodimorpha hirschii* составляла 79,74% и 65,67% соответственно, а ДНК-ДНК-гибридизация (по методу GGDC) – 21,90%, что указывает на принадлежность штамма S20 к новому роду семейства *Ancalomicrobiaceae*.

Наиболее вероятным механизмом, лежащим в основе взаимодействия штамма S20 с *Methylococcus capsulatus* KN2, является использование первым метанола – первого продукта окисления метана метанотрофными бактериями. Ухудшение роста метанотрофа в ферментёре

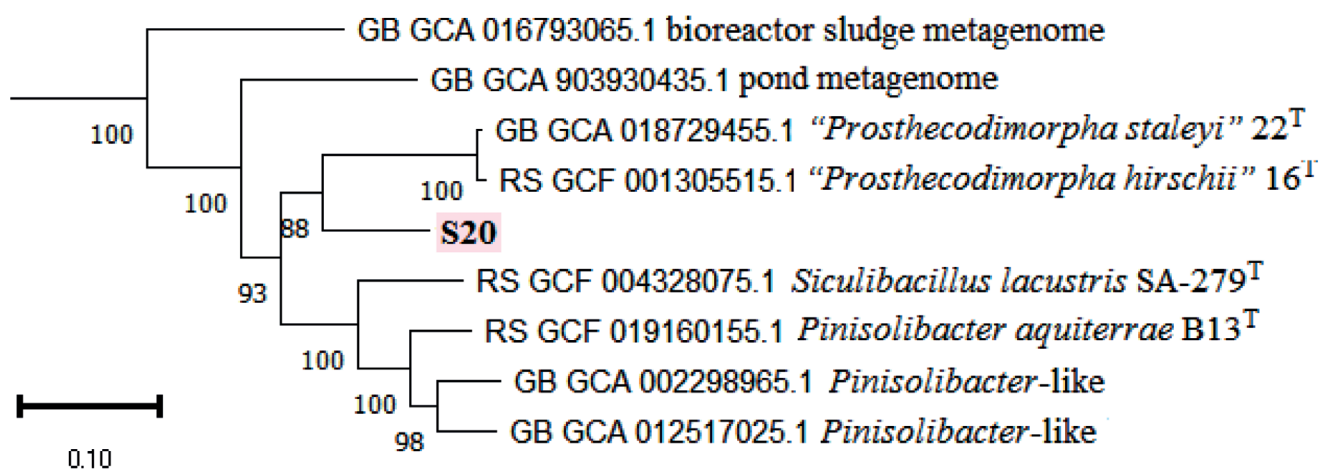


Рис. 2. Геномная филогения, показывающая положение штамма S20 по отношению к другим эволюционно родственным организмам семейства *Ancalomicrobiaceae*. Корень (не показан) состоит из всех доступных в GTDB геномов представителей *Methylococcaceae*. Маркер – 0,1 замена на аминокислотную позицию

может быть связано с массовой колонизацией клеток продуцента штаммом S20, что приводит к уменьшению доступности кислорода и метана. Более детальное изучение взаимоотношений штамма S20 с клетками метанотрофа требует дальнейших исследований.

Основные выводы:

1. Полученный изолят инвазивных бактерий - штамм S20 – представлен аэробными факультативными метилотрофами палочковидной морфологии, способными образовывать розетки, растущими в диапазоне температур 22-45 °C (оптимум – 30-35 °C) при pH среды 4,5-8,5 (оптимум – pH 6,0).
2. Штамм S20 принадлежит к семейству *Ancalomicrobiaceae* и наиболее близок филогенетически к представителям рода “*Prosthecodimorpha*” (95,02% сходства последовательностей генов 16S рРНК). Итоговая сборка генома штамма S20 состояла из 2 контигов (4,3 млн пар оснований). Средняя идентичность нуклеотидной (ANI) и аминокислотной (AAI) последовательностей, ДНК-ДНК-гибридизация (по методу GGDC) между штаммом S20 и *Prosthecodimorpha hirschii* составила 79,74%, 65,67% и 21.90% соответственно, что указывает на принадлежность штамма S20 к новому роду.
3. Геном штамма S20 кодирует метанолдегидрогеназы ХохF-и МхаF-типов. Способность этой бактерии использовать метанол может являться причиной образования тесных ассоциаций с клетками метанотрофных бактерий. Массовая колонизация последних клетками штамма S20 может снижать доступность кислорода и метана для метанотрофа, что ухудшает процесс ферментации.

ЛИТЕРАТУРА

1. Bothe H., Møller Jensen K., Mergel A., Larsen J., Jørgensen C., et al. Heterotrophic bacteria growing in association with *Methylococcus capsulatus* (Bath) in a single cell protein production process // Applied Microbiology and Biotechnology. – 2002. – V. 59. – P. 33–39.
2. Gurevich, A., Saveliev, V., Vyahhi, N., Tesler, G. QUAST: quality assessment tool for genome assemblies // Bioinformatics. – 2013. – V. 29. – № 8. – P. 1072–1075.
3. Kanehisa, M., Sato, Y., Morishima, K. BlastKOALA and GhostKOALA: KEGG tools for functional characterization of genome and metagenome sequences // J. Mol. Biol. – 2016. – V. 428. – № 4. – P. 726–731.
4. Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C., Tamura, K. MEGA X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms // Mol. Biol. Evol. – 2018. – V. 35. – № 6. – P. 1547–1549.
5. Meier-Kolthoff, J.P., Auch, A.F., Klenk, H.P., Göker, M. Genome sequence-based species delimitation with confidence intervals and improved distance functions // BMC Bioinformatics. – 2013. – V. 14. – № 1. – P. 60.
6. Seemann, T. Prokka: rapid prokaryotic genome annotation // Bioinformatics. – 2014. – V. 30 – № 14. – P. 2068–2069.
7. Simão, F.A., Waterhouse, R.M., Ioannidis, P., Kriventseva, E.V., Zdobnov, E.M. BUSCO: assessing genome assembly and annotation completeness with single-copy orthologs // Bioinformatics. – 2015. – V. 31. – № 19. – P. 3210–3212.
8. Stock M., Hoefman S., Kerckhof F.M., Boon N., De Vos P., De Baets B., et al. Exploration and prediction of interactions between methanotrophs and heterotrophs // Res. Microbiol. – 2013. – V. 164. – P. 1045–1054.
9. Rodriguez-R L. M., Konstantinidis K. T. The enveomics collection: a toolbox for specialized analyses of microbial genomes and metagenomes. – PeerJ Preprints. – 2016. – №. e1900v1.

10. Vasilyeva L., Grouzdev D., Koziaeva V., Berestovskaya Y., Novikov A., Pimenov N. Prosthecodimorpha staleyi gen. nov., sp. nov., novel prosthecate bacteria within the family Ancalomicrobiaceae and reclassification of the polyphyletic genus Prosthecomicrobium // Microbiology. – 2022. – V. 91. – № 5. – P. 479–488.
11. Walker, B.J., Abeel, T., Shea, T., Priest, M., Abouelliel, A., Sakthikumar, S., Cuomo, C.A., Zeng, Q., Wortman, J., Young, S.K., Earl, A.M. Pilon: an integrated tool for comprehensive microbial variant detection and genome assembly improvement // PLoS One. – 2014. – V. 9. – № 11. – P. e112963.
12. Weisburg, W.G., Barns, S.M., Pelletier, D.A. Lane, D.J. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study // J. Bacteriol. – 1991. – V. 173. – № 2. – P. 697–703.
13. Whittenbury, R., Phillips, K.C. Wilkinson, J.F. Enrichment, isolation and some properties of methane-utilizing bacteria // J. Gen. Microbial. – 1970. – V. 61. – P. 205–218.
14. Wick, R.R., Judd, L.M., Gorrie, C.L., Holt, K. Unicycler: resolving bacterial genome assemblies from short and long sequencing reads // PLoS Comput. Biol. – 2017. – V. 13. – № 6. – P. e1005595.
15. Wilson, K. Preparation of genomic DNA from bacteria // Curr. Protoc. Mol. Biol. . – 2001. – V. 56. – P. 2–4.
16. Ошкин И.Ю., Белова С.Э., Хохлачев Н.С., Семенова В.А., Червякова О.П., Чернушкин Д.В., Тихонова Е.Н., Марданов А.В., Равин Н.В., Попов В.О., Пименов Н.В., Дедыш С.Н. Молекулярный анализ состава микробного сообщества, формирующегося при непрерывном культивировании *Methylococcus* sp. Concept-8 на природном газе // Микробиология. – 2020 – Т. 89. – № 5. – С. 556–565.

Saltykova Viktoria Alekseevna
FEDERAL RESEARCH CENTRE OF BIOTECHNOLOGY

THE NEW FACULTATIVE METHYLOTROPHIC BACTERIA OF THE FAMILY ANCALOMICROBIACEAE DEVELOPING IN ASSOCIATION WITH METHYLOCOCCUS CAPSULATUS

Abstract. *Methanotrophic bacteria that use methane as the sole source of carbon and energy are promising bioprotein producers. The purpose of this PhD work is the targeted construction of the microbial consortium of Methylococcus capsulatus and satellite bacteria, which will provide the stability of the fermentation process, high production characteristics and biosafety of the resulting product. The work of the second year was aimed at studying an invasive bacterial species that appeared in the bioreactor during unprotected continuous cultivation, attached to the cells of strain-producer and inhibited the fermentation process.*

Keywords: *methanotrophic consortia, satellite bacteria, unprotected cultivation, methylotrophy.*

Степанова Наталия Вячеславовна

аспирант ФИЦ Биотехнологии РАН 2 года обучения

научная специальность 1.5.6 Биотехнология

e-mail: stepanovanataliia.v@yandex.ru

Научный руководитель:

Смоликова Галина Николаевна

кандидат биологических наук, доцент

НОЦ по биоинженерии



ВЛИЯНИЕ СПЕКТРАЛЬНОГО СОСТАВА СВЕТА НА ЭФФЕКТИВНОСТЬ ФОТО-ЗАВИСМЫХ ПРОЦЕССОВ В ФОРМИРУЮЩИХСЯ СЕМЕНАХ ГОРОХА (*PISUM SATIVUM* L.)

Аннотация. Научная проблема, решению которой посвящена работа, связана с изучением влияния спектрального состава света на фотохимическую активность и эффективность протекания фото-зависимых синтетических процессов формирующихся семян гороха (*Pisum sativum* L.). Показано, что фотохимически активная радиация, проходящая сквозь перикарпий и кожуру плодов и достигающая семядолей, характеризуется высокой долей зеленого и дальнего красного света, при этом синий свет отсутствует, а количество красного света составляет около 2%. Выдвинута гипотеза, что зеленый свет может частично компенсировать отсутствие синего и красного света и, тем самым, повышать количество световой энергии, используемой семядолями для фотохимических реакций. Растения выращивали при освещении красным, синим (модуль КС) и красным, зеленым и синим светодиодами (модуль КЗС). Методом РАМ-флуориметрии установлено, что семядоли формирующиеся в модуле КЗС, характеризуются более высокими показателями фотохимической активности. При этом зрелые семена содержали на 3% больше белка и включали больше орнитина, триптофана, аргинина и аспарагиновой кислоты, что указывает на влияние зеленого света на цикл орнитин-мочевина и биосинтез полиаминов. Полученные результаты позволяют понять механизмы, лежащие в основе фотохимических процессов в зародышах развивающихся семян при низкой интенсивности освещения.

Ключевые слова: *Pisum sativum* L., формирование семян, фотосинтез, интенсивность освещения, зеленый свет, РАМ-флуориметрия, метаболомный анализ.

В последнее десятилетие активно развивается направление, связанное с изучением механизмов «нелистового» фотосинтеза, происходящего в черешках листьев, стеблях, внутренней коре, плодах растений и т.д. Ранее нами было показано, что семядоли формирующихся семян гороха осуществляют фотохимические реакции при спектральных диапазонах освещения, нехарактерных для фотосинтеза листа. Фотохимически активная радиация (ФАР), проходящая сквозь перикарпий и кожуру плодов и достигающая семядолей, характеризовалась высокой долей зеленого и дальнего красного света, при этом синий свет отсутствовал, а количество красного света составляло около 2%. Была выдвинута гипотеза, что зеленый свет может частично компенсировать отсутствие синего света и низкое количество красного света и, тем самым, повышать количество световой энергии, используемой семядолями для фотохимических реакций.

Объектом исследования являлись растения *Pisum sativum* L. сорта Глория. Растения выращивали в модульной установке при двух вариантах освещения: 1-й модуль освещался синими

(400–500 нм) и красными (600–700 нм) светодиодами (КС); 2-й модуль освещался синими, зелеными (500–600 нм) и красными светодиодами (КЗС).

Эффективность фотохимических реакций изучали в семядолях на средней стадии созревания семян, когда активно синтезируются запасные питательные вещества. Оценку проводили методом РАМ-флуориметрии с помощью PAR-FluorPen FP 110 (PSI, Чехия) с использованием ОЖР протокола. У семядолей, формирующихся в модуле КЗС в присутствии зеленого света, повышался фотосинтетический потенциал реакционных центров (Phi_Po), потенциал переноса электронов реакционных центров (РЦ) фотосистем (ФС) (Phi_Eo), поток электронов, приводящий к восстановлению пула пластохинонов (ETo/RC), и индекс производительности РЦ ФС II (Pi_Abs). При этом показатель, характеризующий размер световых антенн (ABS/RC) был ниже.

Зрелые семена, сформированные в присутствии зеленого света (модуль КЗС), демонстрировали более высокую скорость прорастания, всхожесть и содержали, в среднем, на 3% белка больше, чем семена, сформированные в модуле КС. Метаболомный анализ, основанный на газовой хромато-масс-спектрометрии и обращено-фазовой ультравысокоэффективной жидкостной хромато-масс-спектрометрии, свидетельствует о статистически значимых биохимических различиях между зрелыми семенами, сформированными при разных условиях освещения. Семядоли, сформированные в модуле КЗС, имели более низкое содержание органических кислот из цикла трикарбоновых кислот, углеводов, нуклеотидмонофосфатов и азотистых веществ, таких как мочевая кислота и спермидин. При этом уровень орнитина, триптофана, аргинина и аспарагиновой кислоты был значительно выше, что указывает на связь между эмбриональным фотосинтезом и путями цикла орнитин-мочевина и биосинтеза полиаминов.

Дальнейшая работа будет включать сравнительный анализ ключевых генов фотосинтеза в разных тканях растений (листья, перикарпий, кожуры, семядоли). В отчетный период были отобраны целевые гены, ответственные за синтез белков и ферментов, участвующих в световых и темновых реакциях фотосинтеза: *psbD* (photosystem II protein D2); *psbA* (photosystem II protein D1); *petA* (cytochrome f); *psaA* (photosystem I P700 chlorophyll *a* apoprotein A1); *psaB* (photosystem I P700 chlorophyll *a* apoprotein A2); *rbcS* (Ribulose biphosphate carboxylase small subunit); *rbcL* (RuBisCO large subunit-binding protein subunit β); *rbcL* (RuBisCO large subunit-binding protein subunit α); *Rca* (Rubisco activase, carboxylase/oxygenase activase); *PRK* (phosphoribulokinase); *PEPC* (phosphoenolpyruvate carboxylase). Были отобраны два референсных гена – *RPS11* (ribosomal protein S11) и *PP2A* (phosphoprotein phosphatase 2A). Были подобраны праймеры, а также условия проведения ПЦР в реальном времени.

Основные выводы:

1. Фотохимическая активность семядолей гороха реализуется при отсутствии синего света, низком уровне красного света и высоком уровне зеленого света. Выдвинута гипотеза, что зеленый свет может частично компенсировать отсутствие синего света и низкое количество красного света и, тем самым, повышать количество световой энергии, используемой семядолями для фотохимических реакций.
2. При добавлении к красным и синим светодиодам источника зеленого света в семядолях формирующихся семян на средней стадии созревания увеличивался фотосинтетический потенциал реакционных центров фотосистем (Phi_Po) и потенциал переноса электронов РЦ ФС (Phi_Eo), скорость потока электронов, приводящего к восстановлению пула пластохинонов (ETo/RC), и индекс производительности реакционных центров ФС II (Pi_Abs). Одновременно у них снижался показатель ABS/RC, который характеризует размер световых антенн.
3. Семена, сформированные в присутствии зеленого света, демонстрировали более высокую скорость прорастания, всхожесть и содержали, в среднем, на 3% белка больше, чем семена, сформированные при освещении только красными и синими светодиодами.

4. Семядоли, сформированные в присутствии зеленого света, имели более высокий уровень орнитина, триптофана, аргинина и аспарагиновой кислоты, что указывает на связь между эмбриональным фотосинтезом и путями цикла орнитин-мочевина и биосинтеза полиаминов.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ

Статьи в рецензируемых журналах:

1. Смоликова Г.Н., Степанова Н.В., Камионская А.М., Медведев С.С. Фотохимическая активность формирующихся семядолей гороха (*Pisum sativum* L.) зависит от светопропускания покровных тканей и спектрального состава света [Photochemical activity in developing pea (*Pisum sativum* L.) cotyledons depends on the light transmittance of covering tissues and the spectral composition of light]. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2023. 27: 980–987. doi:10.18699/VJGB-23-113.

Тезисы докладов:

1. Степанова Н.В., Смоленская А.Е., Камионская А.М., Медведев С.С., Смоликова Г.Н. Влияние зеленого света на формирование семян гороха (*Pisum Sativum* L.) // Тезисы докладов 77-й Международной школы-конференции молодых ученых «Биосистемы: организация, поведение, управление». Н. Новгород, 15–19 апреля 2024 г., С. 346.
2. Степанова Н.В., Камионская А.М., Медведев С.С., Смоликова Г.Н. Фотохимическая активность формирующихся плодов гороха (*Pisum sativum* L.) в зависимости от спектрального состава света // Тезисы докладов X Съезда общества физиологов растений России «Биология растений в эпоху глобальных изменений климата». Уфа, 18-23 сентября 2023 г.
3. Смоликова Г.Н., Степанова Н.В., Медведев С.С. Функции хлорофллов в семенах растений // Тезисы докладов X Съезда общества физиологов растений России «Биология растений в эпоху глобальных изменений климата». Уфа, 18-23 сентября 2023 г.
4. Smolikova G.N., Stepanova N.V., Medvedev S.S. “Green seed photosynthesis: What do we know about?” // Тезисы докладов VII Международной научной конференции «Генетика, Геномика, Биоинформатика и Биотехнология растений». PlantGen 2023, Казань, 11-15 июля 2023 г.
5. Степанова Н.В., Камионская А.М., Медведев С.С., Смоликова Г.Н. Сравнительный анализ фотосинтетических реакций в листьях и формирующихся зародышах *Pisum sativum* L. // Тезисы докладов научной конференции «В генетику – через разные отрасли науки и практики» Научного центра генетики и наук о жизни, Научно-технологический университет «Сириус». Сочи, 11–13 апреля 2023 г.
6. Смоликова Г.Н., Закурин А.О., Степанова Н.В., Камионская А.М., Медведев С.С. Функциональная роль покровов семени в обеспечении фотохимической активности формирующихся зародышей *Pisum sativum* L. // Тезисы докладов всероссийской научной конференции с международным участием «Физиология растений и феномика как основа современных фитобиотехнологий». Нижний Новгород, 27–30 сентября 2022 г., С. 211.

Основные достижения, патенты

1. Патент на полезную модель № 220784 U1 Российская Федерация, МПК A01G 9/00, A01G 9/20. устройство для выращивания растений: № 2023118466: заявл. 12.07.2023: опубл. 03.10.2023 / Н.В. Степанова, В.С. Водолазский, Т.А. Тимофеева [и др.]; заявитель Федеральное государственное учреждение «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук». – EDN CSRUXD.

DYNAMICS OF EXPRESSION OF PHOTOSYNTHETIC GENES DURING PISUM SATIVUM L. EMBRYOGENESIS

Abstract. *The objective of this study is to investigate the impact of light spectral composition on the photochemical activity and efficiency of the photo-dependent synthetic processes of developing pea seeds (Pisum sativum L.). Our findings indicate that photochemically active radiation that passes through the pericarp and coat of pods and reaches the cotyledons is characterized by a high proportion of green and far-red light, while blue light is absent, and the amount of red light is approximately 2%. It was postulated that green light can partially compensate for blue and red light, thereby increasing the amount of light energy used by cotyledons for photochemical reactions. The plants were cultivated under illumination with red, blue (RB) and red, green and blue (RGB) LEDs. The method of PAM-fluorometry demonstrated that cotyledons developing under RGB light exhibited higher photochemical activity. Furthermore, mature seeds exhibited a 3% increase in protein content and a higher content of ornithine, tryptophan, arginine, and aspartic acid. These findings suggest that green light influences the ornithine-urea cycle and polyamine biosynthesis. The outcomes of this study provide insights into the underlying mechanisms of photochemical processes in the embryos of developing seeds under low light intensity.*

Keywords: *Pisum sativum L., seed development, embryonic photosynthesis, light intensity, green light, PAM-fluorometry, metabolomics.*

Шевцов Андрей Вадимович

аспирант ФИЦ Биотехнологии РАН 2 года обучения
научная специальность 1.5.8 Математическая биология,
биоинформатика
e-mail: andreader@yandex.ru



Научный руководитель

Медведева Юлия Анатольевна

кандидат биологических наук,
руководитель группы регуляторной транскриптомики и эпигеномики

ОПРЕДЕЛЕНИЕ РЕГУЛЯТОРНЫХ ВАРИАНТОВ НА ОСНОВЕ АЛЛЕЛЬ СПЕЦИФИЧНЫХ СОБЫТИЙ

Аннотация. Понимание генетических основ фенотипических различий является важным этапом поиска причин этих различий. Однонуклеотидные замены, распространенные в геноме человека, могут влиять на фенотип в норме и патологии, при этом большинство полиморфизмов не меняют последовательность белка, а предположительно выполняют регуляторные функции. Одним из перспективных подходов для выявления регуляторных вариантов является анализ аллель-специфичной регуляции активности генов по данным высокопроизводительного секвенирования. В этом исследовании мы определили ОНВ (однонуклеотидные варианты) отличающие группу людей больных диабетом 2 типа от контрольной на основании данных секвенирования транскриптома единичных клеток. Среди полученных (участков или вариантов) присутствуют варианты с подтвержденной связью с диабетом, что говорит о работоспособности подхода.

Ключевые слова: секвенирование, транскриптомика, однонуклеотидные замены, аллель-специфичные события.

Поиск генетических вариантов, ассоциированных с заболеванием часто производится методом полногеномного поиска полногеномных ассоциаций (Genome-Wide Association Studies, GWAS). Этот метод позволяет с высокой точностью определять варианты, связанные с различными заболеваниями. Среди вариантов, найденных таким способом, большая часть не влияет на структуру белка и, предположительно, задействована в регуляторных процессах и поэтому представляет ценность для понимания механизмов регуляции транскрипции.

Омиксные технологии могут быть использованы для определения мест в геноме с неравномерным покрытием аллелей, на основании полиморфизмов, определенных в этих аллелях. Такой аллельный дисбаланс может быть связан с регуляторными изменениями, происходящими вследствие замены в этом участке генома. В качестве аллель-специфичного события (Allele-Specific Event, ASE) предполагается геномное или транскриптомное изменение в молекулярном процессе, которое зависит от аллеля в каком-то локусе. В данной работе мы определяли аллель-специфичную экспрессию по данным секвенирования РНК, но возможно использование и других методов.

Каждый тип клетки имеет свои отчетливые фенотипические свойства, свой характерный транскрипционный паттерн и эпигенетический профиль. Это особенности можно определить при помощи секвенирования единичных клеток.

На данном этапе мы адаптировали и применили протокол для идентификации участков аллель-специфичной экспрессии генов на данных секвенирования транскриптома единичных мо-

нуклеарных клеток периферической крови (МКПК) 30 доноров, из которых у 15 пациентов присутствует диабет 2 типа. Исходные данные в формате fasta выравнивали на референсный геном версии GRCh38. Полная схема обработки данных показана на рисунке 1.

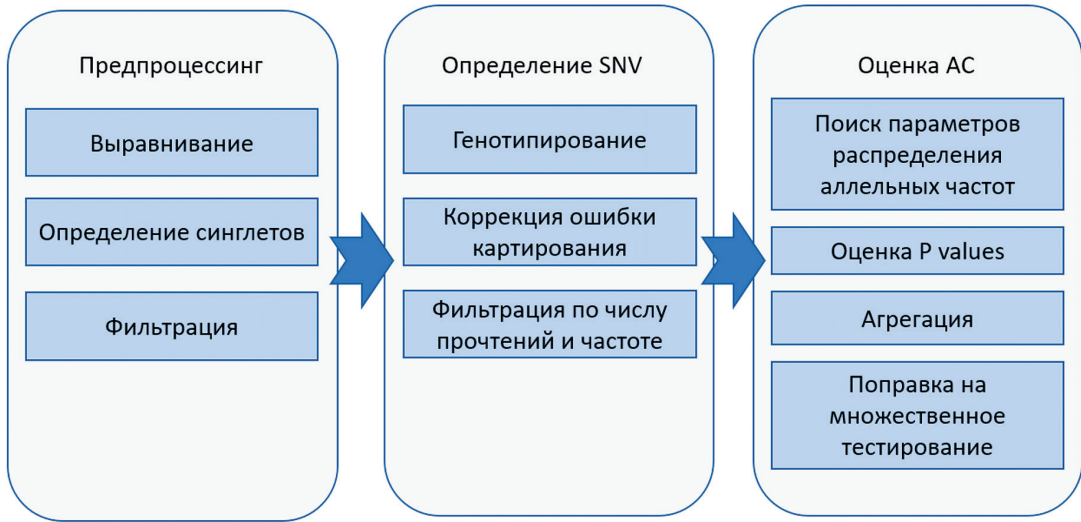


Рис. 1. Схема обработки данных

Определение аллель- специфичной экспрессии производили при помощи инструмента MIXALIME (MIXture models for ALlelic IMbalance Estimation in high-throughput sequencing data) [1]. В основе работы этого инструмента лежит предположение, что количества прочтений выровненных на референсный и альтернативный аллели – это случайные величины из распределения с неизвестными параметрами. Для анализа наших данных мы использовали маригнализованное составное отрицательное биномиальное распределение.

На основании аллель-специфичных событий определили значимые варианты для диабета и контроля (рис 2). После фильтрации, в которой из 12828 общих вариантов были отобраны такие, у которых определен референсный нуклеотид в группе здоровых доноров, а альтернативная у пациентов с СД2, или наоборот. Таких случаев оказалось 2881. 1428 из этих вариантов, согласно базе GTEx eQTL аннотируются, в том числе, как встречающиеся в клетках крови.

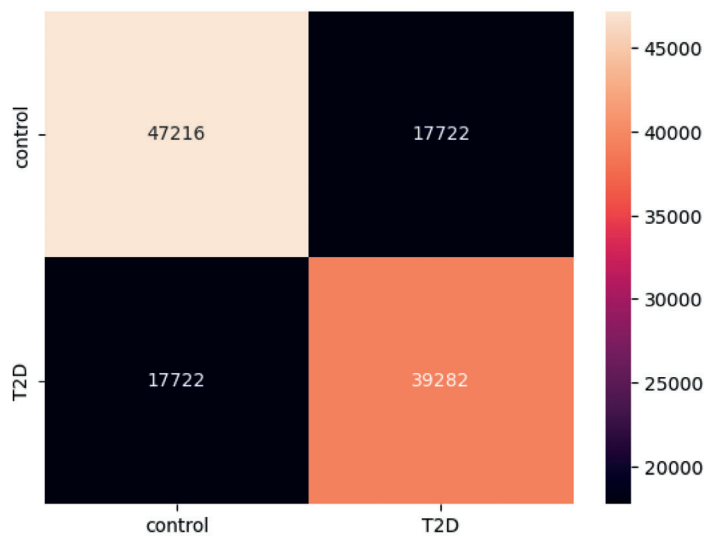


Рис. 2. Пересечение вариантов диабет\ контроль

Среди более значимых вариантов повышается доля известных локусов, влияющих на экспрессию генов (eQTL [2]) и сайтов аллель-специфического связывания, представленных в базе ADAstra [3], косвенно подтверждая функциональность выявленных полиморфизмов (рисунок 3).

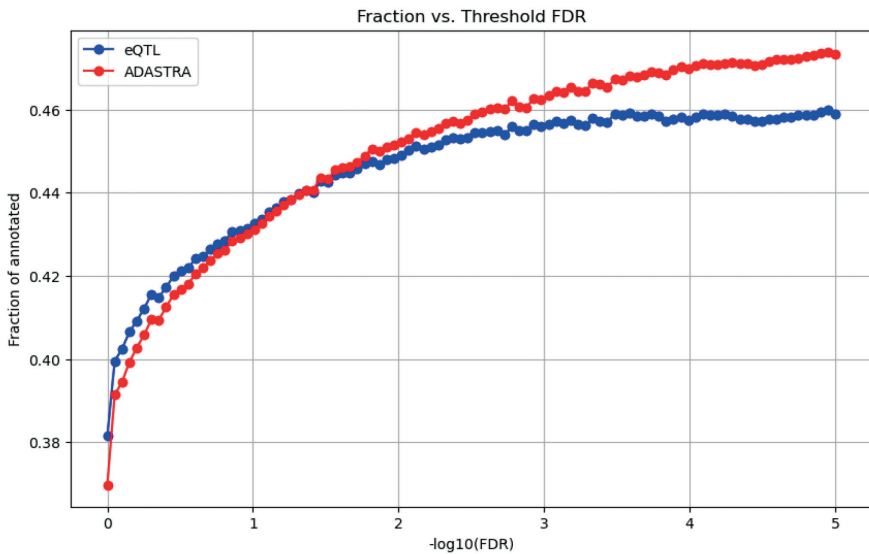


Рис. 3. Доля полученных полиморфизмов, пересекающихся с базами аннотированных вариантов при снижении порога на статистическую значимость

При этом, воспроизводимость значимых вариантов между репликами значительная, а пересечение вариантов между донорами внутри когорты достаточно низкое (рисунок 4). Так же было найдено 8 вариантов, напрямую ассоциировано с диабетом 2 типа.



Рис. 4. Попарные пересекающиеся значимые варианты между донорами когорты СД2

Основные выводы:

Показана работоспособность метода MIXALIME для поиска генетических отличий, определяющих фенотипические изменения на основании данных секвенирования единичных клеток. Определены интересные для изучения регуляторные однонуклеотидные замены, ассоциированные с СД2. В дальнейшем будут выявлены аллель-специфические события для отдельных типов клеток, для более детального определения механизмов заболевания.

ЛИТЕРАТУРА

1. Meshcheryakov G, Abramov S, Boytsov A, Buyan AI, Makeev VJ, Kulakovskiy IV. MIXALIME: MIXture models for ALlelic IMbalance Estimation in high-throughput sequencing data. 2023. Available: <http://arxiv.org/abs/2306.08287>
2. Lonsdale J, Thomas J, Salvatore M, Phillips R, Lo E, Shad S, et al. The Genotype-Tissue Expression (GTEx) project. Nat Genet. 2013;45: 580–585.
3. Abramov S, Boytsov A, Bykova D, Penzar DD, Yevshin I, Kolmykov SK, et al. Landscape of allele-specific transcription factor binding in the human genome. Nat Commun. 2021;12: 2751.

Shevtsov Andrey Vadimovich

RESEARCH CENTER OF BIOTECHNOLOGY RAS

REGULATORY VARIANTS EXPLORATION BY ALLELIC IMBALANCE CASES

Abstract. *Understanding the genetic basis of phenotypic differences is an important step in finding the causes of these differences. Single-nucleotide substitutions common in the human genome can affect the phenotype in norm and pathology, while most polymorphisms do not change the protein sequence, but presumably perform regulatory functions. One of the promising approaches to identify regulatory variants is the analysis of allele-specific regulation of gene activity based on high-performance sequencing data. In this study, we identified SNV (single nucleotide variants) that distinguish a group of people with type 2 diabetes from a control group based on single cell transcriptome sequencing data. Among the obtained (sites or variants) there are variants with a confirmed association with diabetes, which indicates the effectiveness of the approach.*

Keywords: *Sequencing, transcriptomics, SNV, allelic- disbalance.*

Багаева Дарья Игорьевна

аспирант ФИЦ Биотехнологии РАН 1 года обучения

научная специальность 1.5.4 Биохимия

e-mail: багаева115@mail.ru



Научный руководитель

Шлеева Маргарита Олеговна

доктор биологических наук,

зав. лабораторией биохимии стрессов микроорганизмов

МЕТИЛИРОВАНИЕ ПОРФИРИНОВ КАК ЗАЩИТНЫЙ МЕХАНИЗМ ВЫЖИВАНИЯ МИКОБАКТЕРИЙ

Аннотация. Переход *Mycobacterium smegmatis* (Msm) в состояние покоя *in vitro* сопровождается накоплением тетраметилкопропорфирина (ТМК). При этом покоящиеся формы (ПФ) микобактерий характеризуются увеличенной микровязкостью мембран, отсутствием дыхательной активности и устойчивостью к ряду повреждающих факторов. В течение первых 8 ч реактивации ПФ Msm содержание ТМК и микровязкость мембран возвращаются к уровню вегетативных бактерий, после этого происходит активация дыхания и биосинтетических процессов. Штамм Msm с повышенной экспрессией метилтрансферазы MSMEG_0614, способной метилировать копропорфирин III с образованием ТМК, становится в 7 раз устойчивее к действию 40 мМ пероксида водорода и в 90 раз устойчивее к нагреванию до 80 °С. В то же время в этих клетках на 35% снижается дыхательная активность. В присутствии 5-аминолевулиновой кислоты в активно-растущих микобактериях увеличивается количество ТМК, при этом увеличивается вязкость мембран и снижается активность дыхательной цепи. Таким образом, накопление метилированного копропорфирина, возможно, является одним из механизмов выживания микобактерий в период покоя.

Ключевые слова: микобактерии, тетраметиловый эфир копропорфирина III, переход в покоящееся состояние, метилтрансферазы.

Микобактерии способны переходить в покоящееся состояние, характеризующееся резким снижением метаболической активности, устойчивостью к повреждающим воздействиям и отсутствием деления. Такой переход *Mycobacterium tuberculosis* связывают с развитием латентного туберкулеза, который трудно поддается диагностике и лечению. Также, известно, что микобактерии при переходе в состояние покоя накапливают значительные количества порфиринов, основным из которых является тетраметиловый эфир копропорфирина III (ТМК) [1]. Принимая во внимание, что микобактерии, попадая в организм хозяина, подвергаются множеству различных стрессов, в том числе воздействию сниженных значений pH внутри макрофагов и активных форм кислорода [2], а также, что порфирины благодаря своей структуре могут выступать в роли антиоксидантов, нейтрализуя свободные радикалы, и поддерживать баланс антиоксидантной защиты в организме, можно предположить, что накопление порфиринов микобактериями способствует устойчивости их покоящихся клеток к неблагоприятным условиям окружающей среды (в частности, за счет стабилизации компонентов мембран). До настоящего времени фермент, участвующий в метилировании копропорфирина и образовании его тетра-метиловых эфиров был неизвестен.

Целью данной работы было изучение влияния накопления ТМК на вязкость мембран, дыхательную активность и устойчивость клеток *M. smegmatis* к неблагоприятным факторам и выявление фермента, метилирующего копропорфирин.

Для реализации поставленной цели были разработаны условия, при которых возможно накопление ТМК в активно-растущих микобактериях, а также были получены и изучены штаммы *M. smegmatis* и *M. tuberculosis* с гиперэкспрессией ранее обнаруженной нами метилтрансферазы MSMEG_0614, которая способна переносить метильные остатки на карбоксильные группы копропорфирина III с образованием ТМК [3].

В результате работы были обнаружены различия в микровязкости мембран покоящихся и вегетативных клеток *Msm*. На основании совместного с Лабораторией физической биохимии исследования анизотропии флуоресценции зонда BODIPY FL C16 на уровне отдельных клеток с помощью конфокального микроскопа, выявившего значительные изменения этого параметра от 0,05 до 0,22 для вегетативных и покоящихся клеток *Msm* соответственно, было показано, что перешедшие в покой клетки обладали увеличенной микровязкостью. Аналогично, увеличение концентрации ТМК в вегетативных клетках *Msm* путем добавления 5-аминолевулиновой кислоты – АЛК (известного индуктора синтеза порфиринов) в питательную среду, приводило к увеличению анизотропии BODIPY FL C16.

Логично было ожидать обратимости указанных выше структурных изменений, обнаруженных в состоянии покоя, при реактивации ПФ в полностью репликативные клетки. Действительно, было выявлено, что, в то время как количество клеток, состав жирных кислот, активность дыхания и уровень транскрипции не изменялись в течение 20 часов реактивации ПФ *Msm*, микровязкость мембран уменьшалась между 4 и 8 ч от начала процедуры реактивации. В этот же период (8-12 ч) наблюдалось заметное снижение концентрации ТМК в клетках, оцененной при помощи ВЭЖХ.

Также было изучено функционирование ферментов дыхательной цепи в зависимости от накопления метилированных порфиринов в мембранах микобактерий. Функционирование дыхательной цепи оценивали по скорости потребления кислорода (активность всей цепи) и по восстановлению 2,6-дихлорфенолиндофенола (ДФИ) (активность начального звена дыхательной цепи, включая дегидрогеназы и пул менахинонов). В каждом случае было установлено снижение дыхательной активности для мембран, полученных из бактерий, выращенных в присутствии АЛК и содержащих повышенную концентрацию ТМК.

Поскольку нами был найден фермент *Msm* – MSMEG_0614, участвующий в метилировании копропорфирина III с образованием ТМК, мы получили и изучили штамм *Msm* с гиперэкспрессией этого фермента. Было выявлено большее накопление ТМК в штамме с гиперэкспрессией MSMEG_0614 по сравнению с контрольным штаммом как в активных, так и в покоящихся клетках. Также была оценена устойчивость штамма *Msm* с гиперэкспрессией MSMEG_0614 к тепловому шоку и окислительному стрессу.

В результате было показано, что *Msm* с гиперэкспрессией MSMEG_0614 становится в 7 раз устойчивее к действию 40 мМ пероксида водорода и в 90 раз устойчивее к нагреванию до 80 °С. В то же время в этих клетках на 35% снижалась дыхательная активность. Причем снижение дыхательной активности в штамме с гиперэкспрессией метилтрансферазы коррелировало с дыхательной активностью дикого штамма *Msm* при выращивании в присутствии АЛК.

Основные выводы:

1. При увеличении внутриклеточной концентрации ТМК в клетках микобактерий, выращенных в присутствии АЛК, и при образовании ПФ происходит увеличение микровязкости мембран и снижение активности дыхания. При реактивации покоящихся микобактерий через 8 ч сни-

жается уровень ТМК синхронно с уменьшением микровязкости мембран и затем (после 12 ч реактивации) запускаются дыхание и биосинтетические процессы.

2. При гиперэкспрессии метилтрансферазы MSMEG_0614 в клетках микобактерий происходит более интенсивное накопление ТМК как при переходе микобактерий в состояние покоя, так и при росте в оптимальных условиях по сравнению с контрольным штаммом. Штаммы микобактерий с гиперэкспрессией метилтрансферазы и с увеличенным содержанием ТМК демонстрировали повышенную микровязкость мембран и сниженную активность дыхания в отличие от контрольного штамма.
3. Штамм *M. smegmatis* с повышенной экспрессией метилтрансферазы MSMEG_0614 становится в 7 раз устойчивее к действию 40 мМ пероксида водорода и в 90 раз устойчивее к нагреванию до 80 °С.

ЛИТЕРАТУРА

1. Nikitushkin V.D., Shleeve M.O., Zinin A.I. et al. The main pigment of the dormant *Mycobacterium smegmatis* is porphyrin // FEMS Microbiology Letters. – 2016. – v. 363. fnw206.
2. Ehrt S., Schnappinger D. Mycobacterial survival strategies in the phagosome: defence against host stresses // Cell Microbiol. – 2009. – v. 11 (8). – p. 1170-1178.
3. Багаева Д.И., Демина Г.Р., Никитушкин В.Д. и др. Поиск метилтрансферазы микобактерий, участвующей в образовании тетраметиловых эфиров копропорфирина // IX Международная конференция молодых ученых: вирусологов, биотехнологов, биофизиков, молекулярных биологов и биоинформатиков. — 2022: Сб. тез. / АНО «Иннов. центр Кольцово». — Новосибирск: ИПЦ НГУ, 2022. — 764 с.
4. Kudykina Y.K., Shleeve M.O., Artsabanov V.Y. et al. Generation of dormant forms by *Mycobacterium smegmatis* in the poststationary phase during gradual acidification of the medium // Mikrobiologiya. – 2011. – v. 80 (5). – p. 625-636.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ РАБОТЫ

Статьи в рецензируемых журналах:

1. Gligonov I.A., Bagaeva D.I., Demina G.R. et al. The accumulation of methylated porphyrins in dormant cells of *Mycobacterium smegmatis* is accompanied by a decrease in membrane fluidity and an impede of the functioning of the respiratory chain // Biochim Biophys Acta Biomembr. – 2024. – v. 1866 (3). – p. 184270.
2. Багаева Д.И., Демина Г.Р., Агафонов М.О. и др. Метилирование копропорфирина как механизм защиты микобактерий при неблагоприятных условиях // Вестн. Моск. ун-та. Сер. 2. Химия. 2. – 2024. – Т. 65 (2) – С. 121–127.

PORPHYRIN METHYLATION AS A PROTECTIVE MECHANISM FOR MYCOBACTERIA SURVIVAL

Abstract. *The transition of *Mycobacterium smegmatis* (Msm) to a dormant state in vitro is accompanied by the accumulation of tetramethylcoproporphyrin (TMC). Wherein, dormant forms (DF) of mycobacteria are characterized by increased membrane microviscosity, lack of respiratory activity and resistance to a number of damaging factors. During the first 8 hours of reactivation of Msm PF, the TMC content and membrane microviscosity return to the level of vegetative bacteria, after which respiration and biosynthetic processes are activated. The Msm strain with increased expression of the methyltransferase MSMEG_0614, capable of methylating coproporphyrin III with the formation of TMC, becomes 7 times more resistant to the action of 40 mM hydrogen peroxide and 90 times more resistant to heating to 80 °C. At the same time, respiratory activity in these cells decreases by 35%. In the presence of 5-aminolevulinic acid in actively growing mycobacteria, the amount of TMC increases, while the viscosity of the membranes increases and the activity of the respiratory chain decreases. Thus, the accumulation of methylated coproporphyrin may be one of the mechanisms of survival of mycobacteria during the dormant period.*

Keywords: *mycobacteria, coproporphyrin III tetramethyl ester, transition to a dormant state, methyltransferases.*

Работа выполнена при поддержке РФФ (грант № 24-15-00221).

Володина Вероника Николаевна

аспирант ФИЦ Биотехнологии РАН 1 года обучения

научная специальность 1.5.4 Биохимия

e-mail: happy-metal@mail.ru

Научный руководитель

Жердева Виктория Вячеславовна

кандидат биологических наук,

зав. лаборатории молекулярного имиджинга



ИЗУЧЕНИЕ БИОЛОГИЧЕСКОГО И ТЕРАПЕВТИЧЕСКОГО ЭФФЕКТА ПРОИЗВОДНЫХ ВИНДЕБУРНОЛА НА МЫШИНЫХ МОДЕЛЯХ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО АУТОИММУННОГО ЭНЦЕФАЛОМИЕЛИТА

Аннотация. *Рассеянный склероз – хроническое аутоиммунное заболевание, при котором поражается миелиновая оболочка головного мозга. Большая роль в этиологии заболевания отводится аутоиммунным и генетическим механизмам. Для поиска лекарств и методов диагностики и лечения на сегодняшний день используются животные модели рассеянного склероза, в частности, мышинная модель. Нами была получена купризоновая модель рассеянного склероза. Критерием получения модели считали развитие клинических признаков 1,5-2 балла и развитие признаков нарушения гематоэнцефалического барьера (ГЭБ) на МРТ («Млечный Путь»). Введение виндебурнола приводило к улучшению состояния животных, что подтверждалось восстановлением функций и двигательной активности в соответствии со шкалой клинических признаков, а также подтверждалось снижением общей площади накопления контраста в головном мозге животных, который оценивали на основе получения суммарных проекций максимальных значений для каждого МР-скана (maximal intensity projection – MIP) что косвенно свидетельствует о восстановлении защитной функции ГЭБ у животных.*

Ключевые слова: *МРТ, купризоновая модель, мышинная модель, рассеянный склероз, экспериментальный аллергический энцефаломиелит, виндебурнол.*

Рассеянный склероз – хроническое аутоиммунное заболевание, при котором поражается миелиновая оболочка головного мозга. Рассеянный склероз вызывает нарушения когнитивной, эмоциональной, двигательной, чувствительной функций и ведет к ранней инвалидизации. В настоящее время около 1,8 млн человек в мире страдают данным заболеванием. Настоящие причины возникновения рассеянного склероза остаются до сих пор неизученными.

Большая роль в этиологии заболевания отводится аутоиммунным и генетическим механизмам. Для поиска лекарств и методов диагностики и лечения на сегодняшний день используются животные модели рассеянного склероза, в частности, мышинная модель. В случае данного заболевания есть несколько видов моделей: ЕАЕ (ЭАЭ) – экспериментальный аллергический энцефаломиелит и купризоновая модель.

Для исследования дегенеративных процессов, происходящих в мозге, используют несколько моделей: купризовую [3], ЭАЭ [2] купризон + ЭАЭ. Все модели демонстрируют процессы, происходящие в организме, при повреждении нервных клеток, в частности – при повреждении миелиновой оболочки.

Целью исследования является выбор оптимальной для исследования рассеянного склероза мышинной модели, в частности, изучение развития МРТ-признаков ЭАЭ при индукции модели купризона и результатов отклика на лекарственную терапию виндебурином.

В работе использовали мышей линии C57/B6 возрастом 12 недель. В ходе эксперимента мышам вместе с кормом давали купризон, в расчете 400 мг на 100 г корма. Суммарно мыши получали купризон 90 дней. В ходе эксперимента животные оценивались по клиническим признакам, поведенческим и инструментальными методами (МРТ).

С 90 дня мыши были разделены на 3 группы: 1 группа – перестала получать купризон (естественное восстановление); 2 группа – продолжала получать купризон и стала получать виндебуринол; 3 группа - перестала получать купризон и стала получать виндебуринол. 2 и 3 группа мышей получали лекарственное вещество виндебуринол (любезно предоставленным д.ф.н. Макаровым В.А.) в виде суспензии препарата в PBS в дозе 20 мг/кг, внутривентриально, раз в 3 дня[4].

МРТ-сканы получали на 1 Т МРТ-системе (Аспект Имиджинг, Израиль) для мелких лабораторных животных. Для получения изображений использовали интегрированную радиочастотную катушку для головы. последовательности импульсов МРТ в режиме T2w FSE (T2-weighted fast spin echo) и T1wGRE (T1-weighted gradient echo). МРТ T2w FSE получали с использованием систем быстрого спин эха с T2 взвешиванием (TR / TE 3000/69,1, FOV 25x25, матрица 168x168, ETL 12, NEX 10, количество срезов 13). МРТ T1wGRE осуществляли использованием системы импульсов 3-мерного градиент эха с T1 взвешиванием (TR / TE = 320/ 13,7 мс, NEX 10, FOV 25x25 мм, матрица 256x256, количество срезов 15). Сканирование головного мозга животных проводилось раз в 3 дня под газовой анестезией (изофлюран, минимальная объемная концентрация (МОК) 1,5–2%). В качестве контрастного агента использовали «Магневист» (Байер Фарма АГ (Германия)), который при неповрежденном ГЭБ не накапливался в ликворе, в то время как при повреждении ГЭБ получали картину усиления релаксивности в режиме T2w. Полученные сканы анализировали в программе ImageJ Fiji.

В ходе эксперимента, с 60 дня наблюдались явные признаки нарушения поведения животных, что оценивалось по клинической шкале от 0 до 5 баллов [1]. Также с помощью МРТ фиксировали поперечные и продольные значения размеров головного мозга.

С помощью МРТ оценивали накопление контраста в системе ликвора при нарушении гематоэнцефалического барьера (ГЭБ) в виде креста (Таблица 1), а также размытая картина желудочков мозга на аксиальном срезе в сравнении с контролем, т.н. «млечный путь»[1] (Таблица 1) и усиление контрастирования каудопутамена.

Изображения переводили из 16 бит в 8 бит. Анализ 8 бит-изображений проводили на основе получения и суммирования проекций с максимальным значением интенсивности (maximal intensity projection – MIP) [5].

Суммарная площадь (рис. 1Б) в этом случае складывалась из суммарной проекции всех сканов MIP (рис.1А). Результатом обсчета таких MIP в программе ImageJ Fiji являются: площадь, интегральная интенсивность, среднее значение интенсивности, стандартное отклонение для данных параметров (Таблица 2).

Рассчитывали средние значения интенсивностей и максимальную площадь накопления контрастного агента в системе желудочков головного мозга мыши, а также в очагах поражения (Таблица 3).

Через 30 дней у мышей, получающих виндебуринол, начали появляться улучшения. К 60 дню мыши из группы 3 полностью восстановились, но на МРТ все еще наблюдались патологические изменения на сагиттальных срезах. Мыши группы 2 по клиническим и поведенческим признакам не уступали мышам группы 3, исключение составляли патологичные очаги на МРТ на аксиальных и сагиттальных срезах. Уменьшение площади поражения в первую очередь связано

Таблица 1.

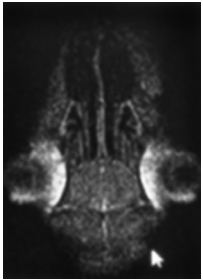
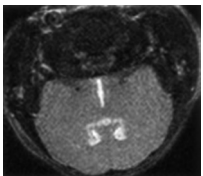
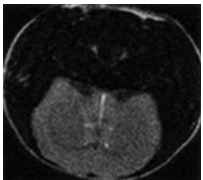
Вид изображения	Название	Описание
	МРТ снимок в режиме T2w, корональный срез	Накопление контраста в системе ликвора при нарушении гематоэнцефалического барьера (ГЭБ) в виде креста
	МРТ снимок в режиме T2, аксиальный срез, наличие «млечного пути» (указано стрелкой)	Размытая картина желудочков мозга на аксиальном срезе в сравнении с контролем
	МРТ снимок в режиме T2, аксиальный срез, отсутствие «млечного пути»	Контроль, отсутствие накопления контраста и «млечного пути».

Таблица 2.

Пример MIP изображения после суммирования 6 сканов МРТ

MIP (n=5)	Контур MIP по параметру площадь
	

Таблица 3.

Параметры обсчета полученных изображений

Фрагмент	Площадь (пиксели)	Средняя интенсивность	Стандартное отклонение	мин	макс	Интегральная плотность	Площадь, %	Ряды интегральной плотности
1	0,143	129,467	7,900	122	148	18,520	100	1942
2	5,760	167,522	32,935	120	255	964,956	100	101183

с уменьшением площади «Млечного пути», что подтверждается МР-сканами. В результате расчета среднего значения площади по группам из 6-8 животных (n=6-8) строили гистограмму нормированной площади накопления контраста в системе желудочков головного мозга (рис.4) для групп 1, 2, 3 (группа «Купризон -» – группа 1, «К+В» – группа 2, «без К + В» – группа 3). Площадь накопления контраста в группах 2 и 3 нормирована на группу 1 (рис.1).

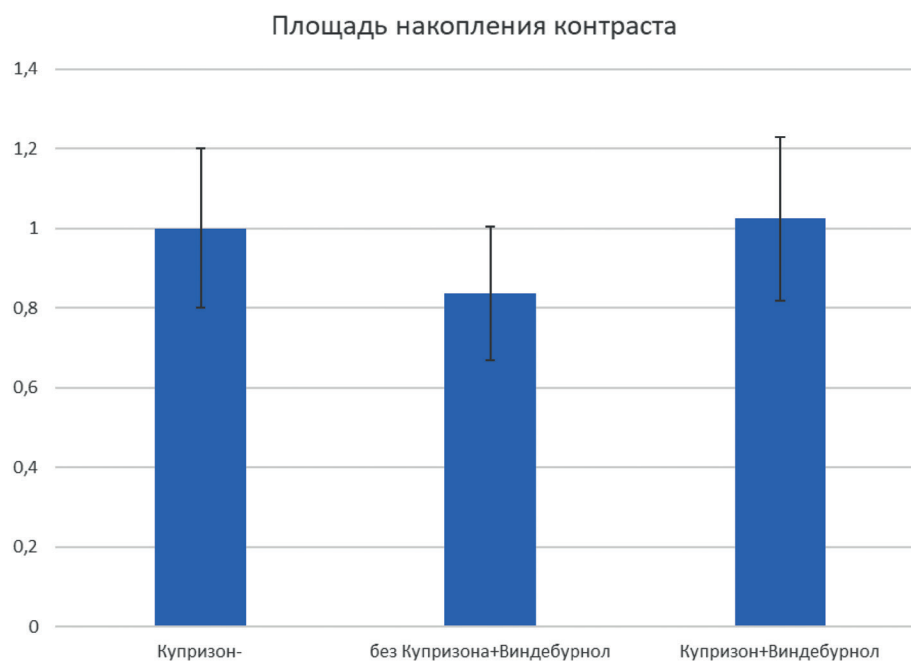


Рис. 1. (График изменения площади контраста в разных группах мышей) (группа «Купризон -» – группа 1, «К+В» – группа 2, «без К + В» – группа 3)

Основные выводы:

Была получена купризоновая модель рассеянного склероза. Критерием получения модели считаем развитие клинических признаков 1,5-2 балла[1] и развитие признаков нарушения ГЭБ на МРТ (Млечный Путь). По сравнению с моделью ЭАЭ (по литературным данным) она характеризуется более длительным развитием клинической картины и определенной степенью неустойчивости: она обратима при изъятии купризона из корма на 3–7 дней. Введение виндебуринола приводило к улучшению состояния животных, что подтверждалось восстановлением функций и двигательной активности в соответствии со шкалой клинических признаков, а также подтверждалось снижением общей площади накопления контраста в головном мозге животных, что косвенно свидетельствует о восстановлении защитной функции ГЭБ у животных.

ЛИТЕРАТУРА

1. Marín-Prida J. et al. Anti-inflammatory mechanisms and pharmacological actions of phycocyanobilin in a mouse model of experimental autoimmune encephalomyelitis: A therapeutic promise for multiple sclerosis //Frontiers in Immunology. – 2022. – Т. 13. – С. 1036200.
2. Polak P. E. et al. The vincamine derivative vindeburnol provides benefit in a mouse model of multiple sclerosis: effects on the Locus coeruleus //Journal of neurochemistry. – 2012. – Т. 121. – №. 2. – С. 206-216.
3. Praet J. et al. Cellular and molecular neuropathology of the cuprizone mouse model: clinical relevance for multiple sclerosis //Neuroscience & Biobehavioral Reviews. – 2014. – Т. 47. – С. 485-505.

4. Zubkov E. et al. Antidepressant-like Effect of the Eburnamine-Type Molecule Vindeburnol in Rat and Mouse Models of Ultrasound-Induced Depression //ACS Chemical Neuroscience. – 2024. – T. 15. – №. 3. – C. 560-571.
5. Park, H., Kwon, M.J., Han, Y. Techniques in image segmentation and 3D visualization in brain MRI and their applications // Medical Imaging Systems Technology, pp. 207-253 (2005)

Volodina Veronika Nikolaevna
RESEARCH CENTER OF BIOTECHNOLOGY RAS

STUDY OF THE BIOLOGICAL AND THERAPEUTIC EFFECT OF VINDEBURNOL DERIVATIVES ON MOUSE MODELS OF EXPERIMENTAL AUTOIMMUNE ENCEPHALOMYELITIS

Abstract. *Multiple sclerosis is a chronic autoimmune disease that affects the myelin sheath of the brain. Autoimmune and genetic mechanisms play a major role in the etiology of the disease. Animal models of multiple sclerosis, in particular the mouse model, are currently used to search for drugs and diagnostic and treatment methods. We have obtained a cuprizone model of multiple sclerosis. The criterion for obtaining the model was the development of clinical signs of 1.5-2 points and the development of signs of disruption of the blood-brain barrier (BBB) on MRI ("Milky Way"). The administration of vindeburnol led to an improvement in the condition of the animals, which was confirmed by the restoration of functions and motor activity in accordance with the scale of clinical signs, and was also confirmed by a decrease in the total area of contrast accumulation in the brain of the animals, which was assessed based on obtaining the total projections of the maximum values for each MR scan (maximum intensity projection - MIP) which indirectly indicates the restoration of the protective function of the BBB(blood-brain barrier) in animals.*

Keywords: *MRI, cuprizone model, mouse model, multiple sclerosis, experimental allergic encephalomyelitis, vindeburnol.*

Ефремова Анастасия Дмитриевна
аспирант ФИЦ Биотехнологии РАН 1 года обучения
научная специальность 1.5.6 Биотехнология
e-mail: nastya.efremova.2000@gmail.com



Научный руководитель
Пометун Анастасия Александровна
доктор химических наук,
зав. лабораторией молекулярной инженерии

ПОЛУЧЕНИЕ И ИЗУЧЕНИЕ СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ ВЗАИМОСВЯЗЕЙ ТРАНСГЛИКОЗИЛАЗЫ ИЗ ЛАКТОБАКТЕРИЙ

Аннотация. Резистентность патогенных бактерий к препаратам антибактериальной терапии неуклонно растёт, некоторые из них уже приобрели множественную лекарственную устойчивость, что является серьёзной проблемой для общественного здравоохранения. Литические трансгликозилазы играют ключевую роль в функциональных защитных преобразованиях бактериальных клеток. Разработка новых антибактериальных белковых препаратов может помочь в борьбе с растущей резистентностью к антибиотикам. Данное исследование направлено на изучение функциональной значимости и особенностей доменных пространственных структур группы литических трансгликозилаз в пробиотических штаммах *Lactobacillus rhamnosus* для потенциальной регуляции и разработки альтернатив существующим методам лечения против бактериальных инфекций.

Ключевые слова: литическая трансгликозилаза, *Lactobacillus rhamnosus*, патогенные бактерии, пробиотики, пептидогликан, мультирезистентность.

В настоящее время существует большое разнообразие бактерий, патогенность которых усиливается их адаптивностью к действию антибиотиков. Ещё в 2020-ом году Всемирная организация здравоохранения (ВОЗ) акцентировала внимание на приоритетности создания новых фармацевтических препаратов против бактерий с множественной лекарственной устойчивостью [1]. Их защитные механизмы включают в себя клеточную стенку, жгутики и пили, токсины, образование биоплёнок, капсул и спор, изменение сайта-мишени лекарственного препарата, повышение проницаемости клеточной стенки для антибиотиков, их инактивация, эффлюксные насосы и др. [2]. Последние из них, а также некоторые антибиотические адъюванты, включая ингибиторы бета-лактамаз, и пермеабиллизаторы (вещества и/или методы повышающие проницаемость) внешней мембраны, предположительно могут способствовать преодолению резистентности. В связи с этим изучение катализаторов биогенеза и ремоделирования пептидогликановой клеточной стенки бактерий становится особенно актуальным. Такими бактериальными ферментами, катализирующие расщепление гликановых нитей, является суперсемейство литических трансгликозилаз [3, 4, 5]. Они ответственны за исполнение целого ряда клеточных задач на всех этапах жизненного цикла бактерий, однако соответствие функций в динамике клеточной стенки (закреплении поверхностных белков и взаимодействии с хозяином) отдельным трансгликозилазам пока неизвестно [4-8].

Целью данного исследования является выявить конкретные ферменты суперсемейства литических трансгликозилаз (LTG) лактобактерий *Lactobacillus rhamnosus*, охарактеризовать

их структурно-функциональные взаимосвязи и провести идентификацию LTG-кодирующих генов в пробиотических бактериях. Для настоящего исследования были выбраны пробиотические бактерии рода *Lactobacillus*, так как они отвечают ряду требований, связанных с их способностью подавлять рост некоторых микробов и патогенов, снижая риски заражения различными инфекциями [9, 10]. Благодаря тому, что этот вид микроорганизмов является частью нормальной микрофлоры желудочно-кишечного тракта и влагалища человека, потенциальное применение LTG из этих бактерий в терапевтических целях не будет провоцировать против себя иммунный ответ. Например, штамм *Lactobacillus rhamnosus GG* – один из наиболее изученных штаммов, который широко используют в различных коммерческих продуктах, включая пробиотики [9, 11]. И хотя эта бактерия хорошо известна своими различными пробиотическими свойствами, информация о ее литических трансгликозилазах в современной научной литературе пока ограничена.

Основные выводы:

Существует более 10 ансамблей LTG-ферментов, кодируемых низшими растениями, грибами, вирусами и, в частности, грамположительными и грамотрицательными бактериями. Каждое семейство литических трансгликозилаз имеет уникальную субстратную специфичность и набор каталитических остатков и включает ферменты как малые и однодоменные, так и большие и многодоменные; липопротеины и растворимые ферменты; ферменты синтеза пептидогликана и ферменты переработки пептидогликана; ферменты, предположительно относящиеся к боковой стенке и перегородке; ферменты без прямых доказательств аллостерической регуляции и ферменты с прямыми доказательствами аллостерической регуляции; и ферменты с (по-видимому) либо одним, либо двумя критическими каталитическими остатками [12].

ЛИТЕРАТУРА

1. Всемирная организация здравоохранения: официальный сайт. – Нехватка новых антибиотиков ставит под угрозу глобальные усилия по сдерживанию распространения лекарственно-устойчивых инфекций [Electronic resource]. URL: <https://www.who.int/ru/news/item/17-01-2020-lack-of-new-antibiotics-threatens-global-efforts-to-contain-drug-resistant-infections> (accessed: 8.05.2024).
2. Baran, Aleksandra et al. “Antibiotics and Bacterial Resistance-A Short Story of an Endless Arms Race.” International journal of molecular sciences vol. 24,6 5777. 17 Mar. 2023, doi:10.3390/ijms24065777;
3. Aggarwal, Rupesh et al. “Antibiotic resistance: a global crisis, problems and solutions.” Critical reviews in microbiology, 1-26. 21 Feb. 2024, doi:10.1080/1040841X.2024.2313024;
4. Martinez-Bond E.A., Soriano B.M., Williams A.H. The mechanistic landscape of Lytic transglycosylase as targets for antibacterial therapy // Current Opinion in Structural Biology. 2022. Vol. 77. P. 102480.
5. Dik, David A et al. “A Structural Dissection of the Active Site of the Lytic Transglycosylase MltE from *Escherichia coli*.” Biochemistry vol. 57,42 (2018): 6090-6098. doi:10.1021/acs.biochem.8b00800;
6. Byun B, Mahasenan KV, Dik DA, Marous DR, Speri E, Kumarasiri M, Fisher JF, Hermoso JA, Mobashery S. Mechanism of the *Escherichia coli* MltE lytic transglycosylase, the cell-wall-penetrating enzyme for Type VI secretion system assembly. Sci Rep. 2018 Mar 7;8(1):4110. doi: 10.1038/s41598-018-22527-y. PMID: 29515200; PMCID: PMC5841429;
7. Lehnherr, H., Hansen, A.-M. and Ilyina, T. (1998), Penetration of the bacterial cell wall: a family of lytic transglycosylases in bacteriophages and conjugative plasmids. Molecular Microbiology, 30: 454-457. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1998.01069.x>;

8. Molecular Microbiology | Microbiology Journal | Wiley Online Library [Electronic resource]. URL: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1046/j.1365-2958.1998.01069.x?sid=nlm%3Apubmed> (accessed: 9.05.2024).
9. Goldstein, Ellie J C et al. "Lactobacillus species: taxonomic complexity and controversial susceptibilities." *Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America* vol. 60 Suppl 2 (2015): S98-107. doi:10.1093/cid/civ072;
10. Stivala, Aldo et al. "Lactobacillus rhamnosus AD3 as a Promising Alternative for Probiotic Products." *Biomolecules* vol. 11,1 94. 13 Jan. 2021, doi:10.3390/biom11010094;
11. Stage, Marianne et al. "Lactobacillus rhamnosus GG Genomic and Phenotypic Stability in an Industrial Production Process." *Applied and environmental microbiology* vol. 86,6 e02780-19. 2 Mar. 2020, doi:10.1128/AEM.02780-19;
12. Dik, David A et al. "Lytic transglycosylases: concinnity in concision of the bacterial cell wall." *Critical reviews in biochemistry and molecular biology* vol. 52,5 (2017): 503-542. doi:10.1080/10409238.2017.1337705.

Efremova Anastasia Dmitrievna
RESEARCH CENTER OF BIOTECHNOLOGY RAS

PRODUCTION AND STUDY OF STRUCTURE-FUNCTION RELATIONSHIPS OF TRANSGLYCOSYLASE FROM LACTOBACILLUS

Abstract. *Resistance of pathogenic bacteria to antibacterial therapies is steadily increasing and some of them have already acquired multidrug resistance, which is a serious public health problem. Lytic transglycosylases play a key role in the functional defense transformation of bacterial cells. The development of new antibacterial drugs targeting these enzymes may help to combat the growing antibiotic resistance. This study aims to investigate the functional significance and domain space structure features of a group of lytic transglycosylases in probiotic strains of Lactobacillus rhamnosus for potential regulation and development of alternatives to existing therapies against bacterial infections.*

Keywords: *lytic transglycosylase, Lactobacillus rhamnosus, pathogen, probiotics, peptidoglycan, multidrug resistance.*

Зайцев Пётр Евгеньевич

аспирант ФИЦ Биотехнологии РАН 1 года обучения

научная специальность 1.5.4 Биохимия

e-mail: pez2000@yandex.ru

Научный руководитель

Жердева Виктория Вячеславовна

кандидат биологических наук,

зав. лабораторией молекулярного имиджинга



ИЗУЧЕНИЕ БИОИНТЕГРАЦИИ УГЛЕРОДНЫХ ИМПЛАНТИРУЕМЫХ МАТЕРИАЛОВ С РАЗЛИЧНЫМИ ПОКРЫТИЯМИ

Аннотация. Исследование направлено на изучение биоинтеграции имплантируемых материалов, в том числе их биосовместимости с окружающими имплантаты тканями. Объектом исследования являлись образцы биопсии, содержащие углеродные скаффолды на сроке 12 недель после подкожной имплантации их мышам линии BDF1, предоставленные коллегами МГТУ им. Баумана в рамках совместных исследований.

Целью нашего исследования являлась разработка методов МРТ для изучения биосовместимости и резорбции углеродных скаффолдов без покрытия и с покрытием на основе синтетического гидроксиапатита. В результате были подобраны параметры сканирования в режимах T1w и T2w, в том числе с использованием импульсов жироподавления 100 мс, на предоставленных образцах. На основе результатов МРТ исследования образцов *ex vivo* в режиме жироподавления был сделан вывод о том, что скаффолды с покрытием на основе гидроксиапатита обладают большей биосовместимостью, так как окружены соединительно-тканной капсулой, содержащей преимущественно рыхлую соединительную ткань[1], что также подтверждали результаты гистологического исследования, выполненные на базе МНИОИ им. Герцена.

Ключевые слова: углерод–углеродные медицинские композиты, гидроксиапатитовые покрытия, электрофоретическое осаждение, тесты *ex vivo* и *in vivo*, радиологические исследования.

На данный момент в медицинских операциях по интеграции имплантатов в костную ткань используются преимущественно конструкции из инертных нетоксичных металлов, например титана, также разрабатывают скаффолды на основе углерода [2]. Инженерия костной ткани основана на синергетическом сочетании биоматериалов, клеток и факторной терапии [3]. Хотя отторжения такой подход в подавляющем большинстве случаев не вызывает, регенерация вокруг чужеродного материала идет заметно хуже чем вокруг родных тканей пациента, что продлевает период реабилитации и может привести к непредвиденным осложнениям.

В связи с этим исследователи работают над новым поколением композитных имплантатов, сочетающих в себе металлические и углеродные части, максимально имитирующие заменяемые костные ткани.

Целью нашего исследования является разработка неинвазивных методов на основе магнитно-резонансной томографии (МРТ) изучения биоинтеграции углеродных скаффолдов (имплантатов) и отслеживания тканевых реакций на имплантаты.

МР-сканы получали на 1 Т МРТ-системе (Аспект Имиджинг, Израиль). Образцы фиксированных в 10 % формалине биоптатов (биоптат представлял собой фрагмент кожи с подкожно подде-

жащими тканями и скаффолд, интегрированный в фиброзную капсулу) помещали в 15 мл пробирки типа Фалькон и заполняли до верхнего мениска 10% раствором забуференного формалина, далее помещали в интегрированную радиочастотную катушку для тела (длина 50 мм, диаметр 38 мм). Для получения изображений использовали последовательности импульсов МРТ в режиме T2w FSE (T2-weighted fast spin echo) и T1wGRE (T1-weighted gradient echo). МРТ T2w FSE получали с использованием систем быстрого спин эха с T2 взвешиванием (TR / TE 4000/38,3, FOV 40x40, матрица 120x180, ETL 5, NEX 8, количество срезов 15). МРТ T1wGRE осуществляли использованием системы импульсов 3-мерного градиент эха с T1 взвешиванием (TR / TE = 60/2,4 мс, FA 30, NEX 20, FOV 40x40 мм, матрица 120x180, количество срезов 15). Для подавления сигнала жировой ткани использовали предимпульс инверсии TI = 100 мс.

Полученные изображения анализировали путем отбора минимум 3- 4 центральных томографических среза толщиной 1 мм. Пример выделения областей приведен на рис.1, где 1-А – исходный МР-срез. Скаффолд выделен на рис.1-Б. Кожа выделяется по границам резко гипоинтенсивной области рис.1-В. Прилегающий к скаффолду умеренно гипоинтенсивный участок соответствует соединительно-тканной капсуле на рис.1-Г

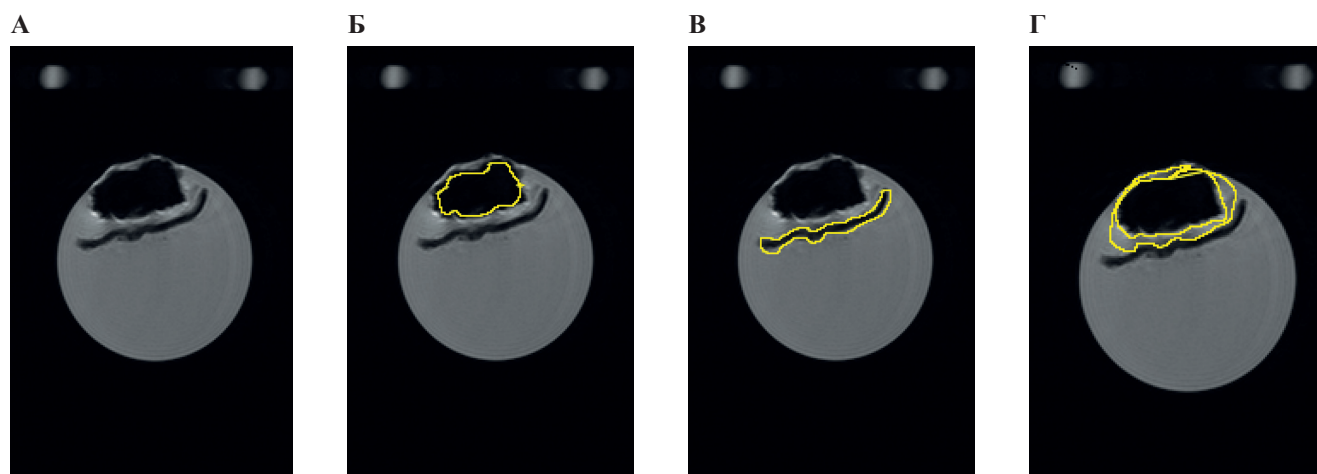


Рис. 1. Выделение участков для обсчета значений МР-интенсивности на примере T2w изображения:

А) исходный скан; Б) скаффолд; В) кожа; Г) соединительно-тканная капсула

Для получения значений интенсивности сигнала скаффолда была использована программа ImageJ Fiji.

Образцы ex vivo были отсканированы в двух режимах – T1w и T2w. Наиболее информативным является режим T1w. На изображениях T1 w скаффолды выглядят резко гипоинтенсивными. При этом соединительно-тканная капсула определяется как умеренно гипоинтенсивная (оттенки серого). Кожа определяется как резко гиперинтенсивная (белая) (рис.2А). Фиброзная капсула определяется в режиме с жироподавлением как умеренно гиперинтенсивная.

Рассчитаны средние значения интенсивности сигнала в режиме T1w и в режиме T1 w в режиме жироподавления для двух образцов – скаффолд без покрытия (рис. 2 В) и с покрытием на основе электрофореза и деионизации (рис.2 Г).

Различные способы нанесения биосовместимого покрытия гидроксиапатита на основе электрофореза или электрофореза с деионизацией при макроскопическом анализе не дают достаточно информации о степени биосовместимости. Косвенным признаком может служить плотность соединительно-тканной капсулы (степень упорядоченности коллагена) [4], каким служит предложенный в данной работе МР-критерий оценки упорядоченности коллагена (рыхлости) фиброзной капсулы. На диаграммах видно, что значение нормированной МР-интенсивности сигнала

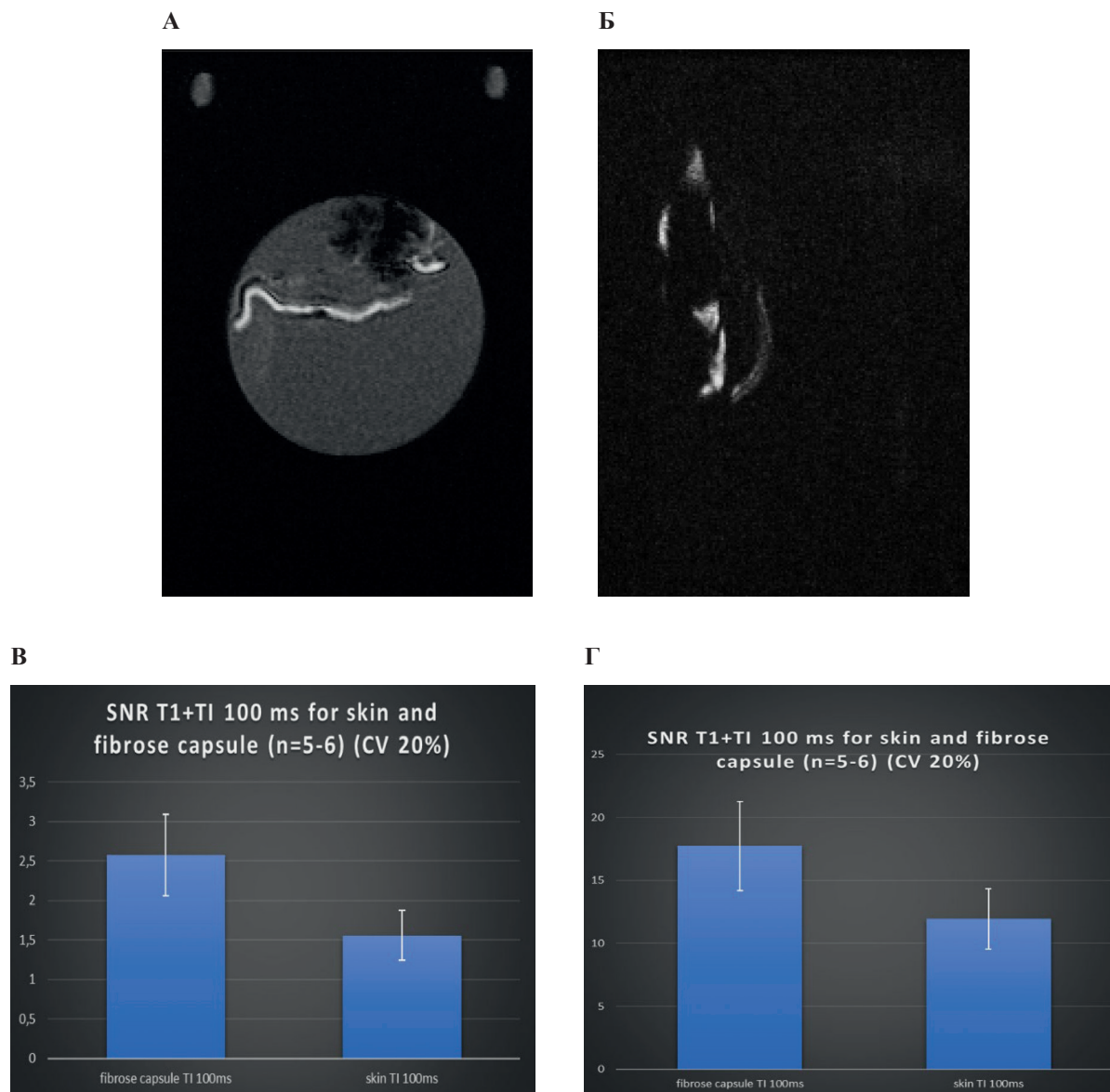


Рисунок 2 –T1w режим получения МР-изображений скаффолдов ex vivo:

- А) T1w центральный МР-срез; Б) центальный МР-срез в режиме жироподавления;
 В) диаграмма соотношения сигнал/шум (SNR) для кожи, соединительно-тканной капсулы в режиме жироподавления T1w для скаффолда без покрытия; Г) диаграмма соотношения сигнал/шум (SNR) для кожи, соединительно-тканной капсулы в режиме жироподавления T1w для скаффолда с покрытием

ла фиброзной капсулы в режиме жироподавления для скаффолдов без покрытия больше, чем для скаффолдов с покрытием, что указывает на увеличенную по сравнению с покрытыми скаффолдами фракцию упорядоченного коллагена. Полученные результаты соответствовали результатам гистологического исследования, выполненные на базе МНИОИ им. Герцена.

Основные выводы:

Предложен МР-критерий оценки степени упорядоченности коллагена (рыхлости) фиброзной капсулы. Скаффолды, покрытые гидроксиапатитом отличаются большей совместимостью в плане склонности к резорбции, образованию более рыхлой, по сравнению со скаффолдом без покрытия, капсулой. Углеродные скаффолды без покрытия относятся к биотолерантным материалам – поверхность таких имплантатов отделяется соединительно-тканной капсулой, в которой контрастируются коллагеновые волокна.

1. Drevet, R.; Fauré, J.; Benhayoune, H. Bioactive Calcium Phosphate Coatings for Bone Implant Applications: A Review. *Coatings* 2023, 13, 1091
2. Teixeira-Santos, R.; Belo, S.; Vieira, R.; Mergulhão, F.J.M.; Gomes, L.C. Graphene-Based Composites for Biomedical Applications: Surface Modification for Enhanced Antimicrobial Activity and Biocompatibility. *Biomolecules* 2023, 13, 1571.
3. Amini AR, Laurencin CT, Nukavarapu SP. Bone tissue engineering: recent advances and challenges. *Crit Rev Biomed Eng.* 2012;40(5):363-408.
4. A. Kader et al., “Collagen-Specific Molecular Magnetic Resonance Imaging of Prostate Cancer,” *Int J Mol Sci*, vol. 24, no. 1, Jan. 2023.

Zaytsev Peter Evgenievich
RESEARCH CENTER OF BIOTECHNOLOGY RAS

STUDYING THE BIOINTEGRATION OF CARBON IMPLANTABLE MATERIALS WITH VARIOUS COATINGS

Abstract. *The research is aimed at studying the biointegration of implantable materials and their biocompatibility with the tissues surrounding the implants. The object of the study was biopsy samples containing carbon scaffolds at a period of 12 weeks after subcutaneous implantation in BDF1 mice, provided by colleagues of Bauman Moscow State Technical University as part of joint research. The aim of our study was to develop MRI methods to study the processes of biocompatibility and resorption of uncoated and coated carbon scaffolds based on synthetic hydroxyapatite. As a result, scanning parameters were selected in T1w and T2w modes, including using 100 ms fat suppression pulses, on the provided samples. Based on the results of the MRI of ex vivo samples in the fat suppression mode, it was concluded that scaffolds coated with hydroxyapatite have greater biocompatibility, since they are surrounded by a connective tissue capsule containing predominantly loose connective tissue[1], which was also confirmed by the results of histological examination performed on the basis of the Herzen Institute of Medical Sciences.*

Keywords: *carbon–carbon medical composites, hydroxyapatite coatings, electrophoretic deposition, ex vivo and in vivo tests, radiological studies.*

Игнатенко Александр Викторович
аспирант ФИЦ биотехнологии РАН 1 года обучения
научная специальность 1.5.11 Микробиология
E-mail: ignatenko5aiav@gmail.com

Научный руководитель
Хижняк Татьяна Владимировна
доктор биологических наук,
зав. лаборатории экологии и геохимической
деятельности микроорганизмов



БИОЛОГИЧЕСКОЕ ВОССТАНОВЛЕНИЕ ТЯЖЕЛЫХ МЕТАЛЛОВ В РАЗЛИЧНЫХ УСЛОВИЯХ НА ПРИМЕРЕ ХРОМАТОВ

Аннотация. В данной работе представлены результаты исследования нового штамма бактерии рода *Salisediminibacterium* MB1000, выделенного из осадков соленых щелочных озер Кулундинской степи (Алтайский Край, Россия), обладающего высокой хроматвосстанавливающей активностью. Определены оптимальные условия роста и восстановления хромата в зависимости от температуры, pH среды, солености и соотношения солей. Найдены условия, при которых восстановление хроматов достигает 100%. Показана возможность масштабирования процесса хроматредукции в лабораторных биореакторах: анаэробном накопительном и аэробном отливно-доливном. В обоих случаях, культура MB1000 показала высокий потенциал для дальнейшей оптимизации и увеличения эффективности процесса восстановления хромата.

Ключевые слова: *Salisediminibacterium*, биотехнологии, биореактор, восстановление хрома, щелочные среды.

С каждым годом проблема загрязнения окружающей среды различными видами отходов становится все актуальней. Хром является одним из наиболее опасных загрязнителей среди большой группы тяжелых металлов [1]. Преобладающая в отходах шестивалентная форма хрома обладает мутагенным и канцерогенным действием на живые организмы [2]. Проблему очистки загрязненных территорий и, особенно, промышленных отходов от токсичного Cr(VI) обычно решают химическим, электрохимическими или физическими методами [3]. В их основе – реакция восстановления Cr(VI) до менее токсичного и подвижного Cr(III). Романенко и Кореньков в конце 70-х годов описали процесс микробиологического восстановления хрома, открыв биотехнологический путь решения проблемы очистки отходов и окружающей среды от токсичного Cr(VI) [4]. За прошедшие 50 лет открыто большое количество хромвосстанавливающих бактерий, однако большинство из них нейтрофилы и не способны переносить условия с повышенным pH и соленостью, характерные, например, для стоков гальванических производств [5, 6].

Выделенный нами штамм MB1000, относящийся к филогенетической ветви бацилл рода *Salisediminibacterium*, показал способность эффективно восстанавливать Cr(VI), используя его в качестве акцептора электронов в анаэробных условиях. Были определены филогенетическое положение, влияние органических компонентов среды на рост и развитие культуры, а также состав образующегося в процессе культивирования хромсодержащего органоминерального осадка [7].

Целью данной работы стало уточнение ключевых параметров среды (pH, температура культивирования, соленость и соотношение ключевых минеральных компонентов среды) и масшта-

бирование процесса биоредукции Cr(VI) культурой *Salisediminibacterium* MB1000 в простейших биореакторах объемом до 1 литра в аэробных и анаэробных условиях.

Все эксперименты проводили с чистой культурой штамма MB1000 в трехкратной повторности с применением химического и биологического контроля. Материалы и методы описаны [7].

Проведенные исследования показывают, что выделенный штамм способен анаэробно расти и эффективно восстанавливать Cr(VI) при температуре от 20 до 46 °C и pH от 8 до 10,7. Оптимальными можно считать температуру 37 °C и pH 9-10.

Исследование соотношения основных минеральных солей и общей солености среды показало, что штамм MB1000 способен развиваться в широком диапазоне условий. При этом необходимым условием является наличие достаточной доли карбонатов в составе среды (соотношение $([Na_2CO_3] + [NaHCO_3])/[NaCl]$ не менее 0,25). Показано, что увеличение доли карбонатов в среде увеличивает диапазон солености, при которой возможен рост культуры и восстановление хроматов. При соотношении $([Na_2CO_3] + [NaHCO_3])/[NaCl] = 0,25$ рост наблюдается в области 1–2,5 М по Na^+ , а при соотношении солей 1,5 штамм растет в диапазоне 1–4М по Na^+ .

При масштабировании штамм MB1000 показал высокую эффективность процесса хроматредукции как в накопительном анаэробном, так и в отливно-доливном аэробном биореакторе.

В анаэробном накопительном биореакторе удалось поддерживать жизнеспособность и активный процесс хроматредукции более 800 ч (рис. 1А). Суммарно, с момента начала эксперимента, культура восстановила 780 мг Cr(VI). Добавление хромата в различных количествах показало, что при условии наличия всех необходимых для жизнедеятельности компонентов, процесс редукции способен идти до концентраций 50,7 мг Cr/л. Полученные данные свидетельствуют, что необходимым компонентом для восстановления Cr(VI) является дрожжевой экстракт. Так, после затормаживания процесса после 56 ч культивирования, в среду были дополнительно вне-

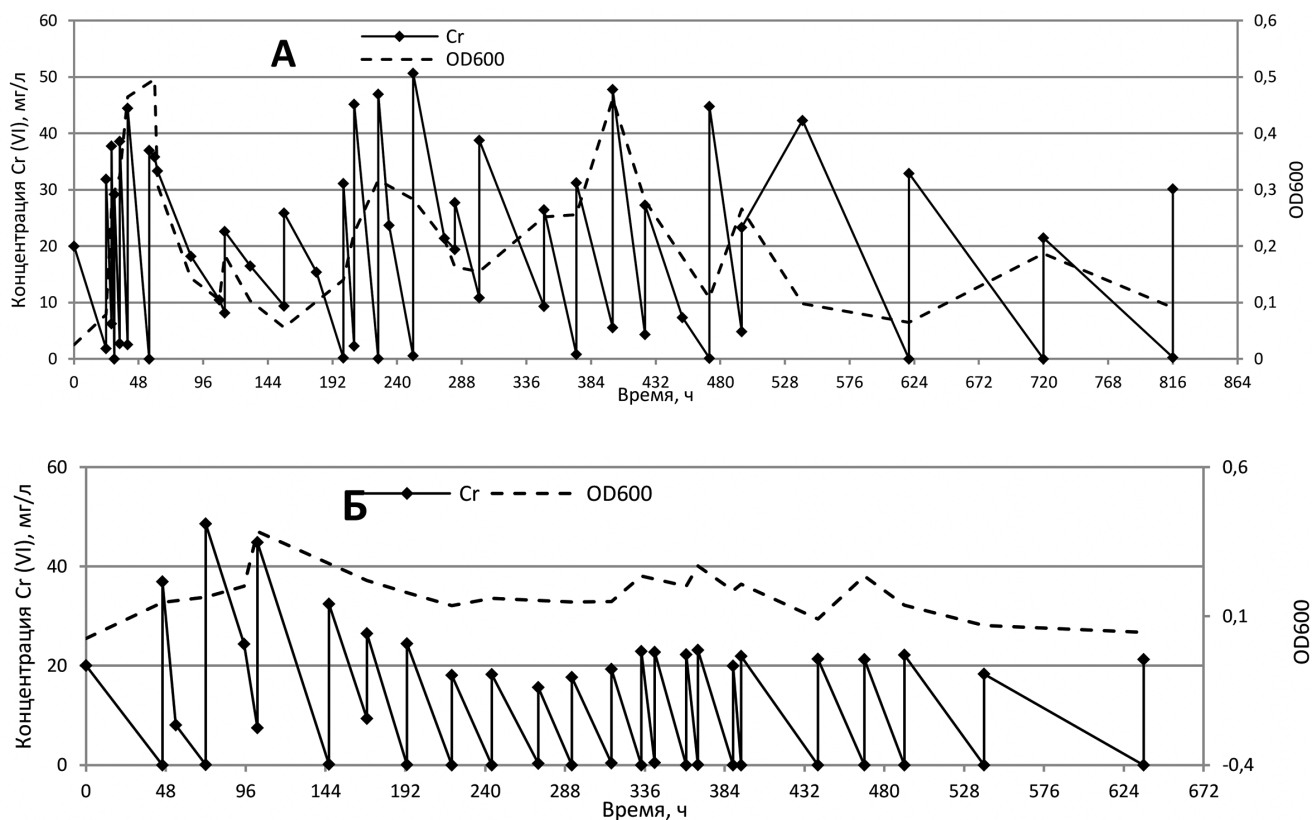


Рис. 1. Динамика роста и восстановления Cr(VI) в лабораторных биореакторах.
А – анаэробный накопительный биореактор; Б – аэробный отливно-доливной биореактор

сены поочередно лактат, аммоний, магний, фосфат калия, микроэлементы и дрожжевой экстракт. Однако действенный эффект оказало только внесение дрожжевого экстракта из расчета 0,1 мг/л на 180 ч культивирования. Позднее были сделаны еще добавки дрожжевого экстракта 0,1 мг/л на 283 и 480 ч культивирования.

В аэробном отливно-доливном биореакторе культура поддерживалась на протяжении более 600 ч (рис. 1Б.). Суммарно, с момента начала эксперимента, культура восстановила 473 мг Cr (VI).

Основные выводы:

В ходе проведенных исследований установлены оптимальные условия роста нового хроматредуцирующего штамма MB1000 по температуре, pH, солености и содержанию карбонатов в среде, при которых наблюдается полное восстановление Cr(VI). Отличительной особенностью штамма стала его высокая устойчивость к повышенной солености (более 2М по Na⁺), щелочности среды (pH > 9) и концентраций хрома до 50,7 мг Cr/л. Проведенное масштабирование показывает возможность дальнейшей работы в биотехнологическом направлении – культура отличается широким диапазоном устойчивости к различным факторам, не теряет своих свойств в течение длительного периода культивирования и имеет значительный запас по технологической оптимизации процесса хроматредукции. Выделенный штамм *Salisediminibacterium* MB1000 готовится к валидному описанию в качестве нового вида.

ЛИТЕРАТУРА

1. Водяницкий Ю.Н. Тяжелые и сверхтяжелые металлы и металлоиды в загрязненных почвах // 2009. М.: ГНУ Почвенный институт им. В.В. Докучаева Россельхозакадемии.
2. Pushkar B., Sevak P., Parab S., Nilkanth N. Chromium pollution and its bioremediation mechanisms in bacteria: A review // Journal of Environmental Management. 2021. V. 287. 112279
3. Barrera-Diaz C.E., Lugo-Lugo V., Bilyeu B. A review of chemical, electrochemical and biological methods for aqueous Cr(VI) reduction // Journal of Hazardous Materials. 2012. V. 223-224. P. 1-12.
4. Романенко В.И., Кореньков В.Н. Чистая культура бактерий, использующих хроматы и бихроматы в качестве акцептора водорода при развитии в анаэробных условиях // Микробиология. 1977. Т. 46. С. 414-417.
5. Pradhan D., Sukla L.B., Sawyer M., Rahman P.K.S.M. Recent bioreduction of hexavalent chromium in wastewater treatment: A review // Journal of Industrial and Engineering Chemistry. 2017. V. 55. P. 1-20.
6. Dhal B., Thatoi H.N., Das N.N., Pandey B.D. Chemical and microbial remediation of hexavalent chromium from contaminated soil and mining/metallurgical solid waste: A review // Journal of Hazardous Materials. 2013. V. 250-251. P. 272-291.
7. Ignatenko A.V., Khizhnyak T.V. A new haloalkaliphilic member of the genus *Salisediminibacterium* capable of efficient chromate reduction // Microbiology. 2024. Vol. 93. N 2. P. 163-166.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ РАБОТЫ

Статьи в рецензируемых журналах:

1. Ignatenko A.V., Khizhnyak T.V. A new haloalkaliphilic member of the genus *Salisediminibacterium* capable of efficient chromate reduction // Microbiology. 2024. Vol. 93. N 2. P. 163-166.

Тезисы докладов:

1. Игнатенко А.В. Бактериальное восстановление хроматов. Возможность применения новых штаммов в системах биоочистки. XVIII Всероссийская научно-техническая конференция мо-

лодых ученых, специалистов и студентов вузов «Научно-практические проблемы в области химии и химических технологий», посвященная 300-летию РАН и 120-летию со дня рождения академика РАН И.В. Тананаева (устный доклад, диплом 2 степени в конкурсе молодых ученых).

Ignatenko Alexandr Victorovich

RESEARCH CENTER OF BIOTECHNOLOGY RAS

BIOLOGICAL REDUCTION OF HEAVY METALS UNDER VARIOUS CONDITIONS USING CHROMATES

Abstract. *This article presents the results of a study of a new bacterial strain of the genus *Salisediminibacterium* MB1000 isolated from sediments of saline alkaline lakes of the Kulunda steppe (Altai Krai, Russia), which has high chromate-reducing activity. Optimal conditions for chromate growth and reduction have been determined depending on temperature, pH of the medium, salinity and salt ratio. Conditions under which the reduction of chromates reaches 100% have been found. The possibility of scaling the chromate reduction process in laboratory batch bioreactors is shown in the anaerobic and aerobic conditions. In both cases, the strain MB1000 showed high potential for further optimization and increased efficiency of the chromate reduction process.*

Keywords: *Salisediminibacterium, biotechnology, bioreactor, chromium reduction, alkaline media.*

Клюшин Георгий Сергеевич

аспирант ФИЦ Биотехнологии РАН 1 года обучения

научная специальность 1.5.11 Микробиология

e-mail: klyushin1999@list.ru

Научный руководитель

Гаврилов Сергей Николаевич

кандидат биологических наук

с.н.с. лаборатории метаболизма экстремофильных прокариот



РОЛЬ ЭКСТРЕМОФИЛЬНЫХ ЭЛЕКТРОАКТИВНЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ В ПРОЦЕССАХ БИОМИНЕРАЛИЗАЦИИ ЖЕЛЕЗА

Аннотация. Электроактивность встречается у многих микроорганизмов, но продукция электрического тока у разных электроактивных микроорганизмов может на порядки отличаться. Ранее электроактивность изучалась среди мезофильных нейтрофильных бактерий. Однако, новые перспективы открываются при поиске электроактивных бактерий среди экстремофилов. В то же время роль и вклад электроактивных прокариот в природные процессы мало изучены. Данная диссертация ставит своей целью поиск новых электроактивных бактерий среди экстремофилов и выявление их вклада в процесс биоминерализации железа. За первый год было проанализировано микробное сообщество осадочного МТЭ. Из него и других источников были получены чистая и накопительные культуры потенциальных электрогенов: термофильного железоредуктора рода *Thermincola*, психрофильного органотрофа рода *Thalassolituus* и термофильного нитратредуктора *Calditerrivibrio*.

Ключевые слова: электромикробиология, электроактивность, электроген, электротроф, экстремофил, биоминерализация железа.

За 30-летний период исследований в области электромикробиологии было открыто значительное количество электроактивных микроорганизмов. С позиции выработки наиболее высоких мощностей и плотностей электрического тока биоэлектрохимическими системами наибольший интерес у исследователей вызывают электрогены. Среди всех микроорганизмов-электрогенов наибольшая продукция электрического тока характерна для прокариот, а именно бактерий [3]. Среди электрогенных бактерий наиболее сильными электрогенами являются модельные виды – *Geobacter sulfurreducens*, *Shewanella oneidensis* и *Shewanella putrefaciens*. Также наравне с модельными видами электрический ток вырабатывают отдельные штаммы *Escherichia coli* (DH5α), *Rhodospseudomonas palustris* (DX1). Способностью к образованию значительно меньших токов обладают бактерии родов *Bacillus*, *Klebsiella*, *Clostridium*, *Enterobacter*, *Acetobacter*, *Lysinibacillus*, *Proteus*, *Desulfuromonas*, *Geomonas* и другие [1, 2]. Тем не менее, пока разнообразие способных к генерации электрического тока прокариот ещё недостаточно изучено. До настоящего времени все ещё актуален поиск наиболее сильного электрогена.

Долгое время исследования в электромикробиологии проводили только среди мезофильных бактерий, выделенных из осадков пресноводных водоемов. Но в последнее время наметился тренд на поиск электрогенных бактерий среди экстремофилов, которые тоже могут генерировать сильные электрические токи, не уступающие даже модельным видам. Активный в последние годы поиск электрогенов среди экстремофилов обусловлен особенностями их метаболизма,

а также наличием более эффективных механизмов ЕЕТ [2]. До сих пор оптимальный для проявления электроактивности диапазон физико-химических условий у микроорганизмов неизвестен. Таким образом, в настоящее время поиск электрогенов среди экстремофилов особенно актуален.

Отдельным важным аспектом является установление экологических функций электроактивных микроорганизмов и их роли в отдельных природных процессах. Наиболее значимым процессом, в котором электроактивные микроорганизмы с глубокой древности могли принимать участие является минералообразование [1,2]. При этом работ, где подробно изучалась бы роль и вклад электроактивных микроорганизмов в образовании определенных минералов, в настоящее время крайне мало.

На основании всего вышесказанного целью настоящего диссертационного исследования является определение вклада электрокаталитической активности экстремофильных микроорганизмов в процессы биоминерализации железа в различных осадочных экосистемах. Были сформулированы следующие задачи: 1) Исследование электрокаталитических свойств экстремофильных микробных сообществ осадочных местообитаний; 2) Выделение и описание новых электрогенных экстремофильных микроорганизмов; 3) Изучение электрокаталитических свойств новых электрогенных экстремофильных микроорганизмов; 4) Исследование электрокаталитических свойств имеющихся в коллекции культур (термофилов); 5) Исследование распространенности электрокаталитических свойств среди экстремофильных микроорганизмов, участвующих в биоминерализации.

На первый год диссертационного исследования был разработан план работ, включающий 3 основных пункта: 1) Получение устойчивых накопительных культур *Thermincola* из осадочного микробного топливного элемента и последующее получение их чистых культур; 2) Получение устойчивой накопительной культуры *Thalassolituus* из морского осадочного микробного топливного элемента и последующее получение его чистой культуры; 3) Получение новых накопительных культур железовосстанавливающих и электрогенных термофильных организмов из проб горячих источников кальдера Узон (Камчатка) или острова Кунашир (Курильские острова).

Самые первые работы были начаты с осадочным микробным топливным элементом, который был разработан и изготовлен сотрудниками лаборатории в 2022 г. Данный осадочный МТЭ представлял собой систему подобную колонке Виноградского, который состоял из слоя нефтезагрязненной почвы (образцы были отобраны в Ульяновской области) и погруженного в нее анод изготовленного из углеткани, выше был слой стерильного песка, выполняющий роль хемоклина, в самой верхней части был расположен катод из углеткани. В момент начала эксперимента осадочный МТЭ был залит стерильной дистиллированной водой и инкубировался при +30 °C 20 недель, затем после отбора проб осадочный МТЭ работал на открытом воздухе в течение 4 недель после чего из него также были отобраны образцы.

Работы по отбору образцов из осадочного МТЭ и определению физико-химических параметров, электрохимических данных и анализу структуры бактериального сообщества различных слоев осадочного МТЭ были впервые мной начаты в ходе прохождения магистерской производственной практики летом 2022 года. Затем подробный анализ полученных данных был мной продолжен уже на 1 курсе аспирантуры в 2024 г. Результаты анализа готовятся к публикации в журнале «Микробиология» в 2024 г.

В результате экспериментальной работы и анализа полученных данных было установлено, что осадочный МТЭ вырабатывал электрический ток силой до 0,7 мА. После всех 24 недель работы осадочного МТЭ произошло сильное расхождение бактериальных сообществ зон анода и катода как таксономически, так и функционально. Анализ структуры бактериальных сообществ различных образцов из осадочного МТЭ выполненный методом высокопроизводительного секвенирования на платформе illumina по гену 16S рРНК показал, что в аноде доминирующими таксонами

были потенциальные электрогены – это *Geobacter*, *Thermincola*, *Geobacteraceae*, *Citri fermentans*, *Syntrophus*, *Desulfovibrio* и *Corriobacteriia*, которые в сумме составляли почти 45% бактериального сообщества. На катоде же многие доминирующие таксоны были потенциальными электротрофами – это *Pseudomonas*, *Acidithiobacillaceae*, *Hyphomicrobium*, *Hydrogenophaga*, которые в сумме составляли до 58% бактериального сообщества. Таким образом, за все время работы в осадочном МТЭ сложились селективные условия для развития электроактивных бактерий.

Также в ходе 1 года диссертационного исследования была получена устойчивая накопительная культура электрогена *Thermincola* из образца анода осадочного МТЭ. Данная накопительная культура активно росла и восстанавливала синтезированный ферригидрит до магнетита при потреблении в среде ацетата и СО (из 100% газовой фазы). При замене газовой фазы с СО на N₂ рост культуры и восстановление ферригидрита прекращался. Таким образом, полученная накопительная культура *Thermincola* продемонстрировала способность к водородной карбоксидотрофии. Культивирование накопительной культуры *Thermincola* проводили при температуре +50 °С. В результате последовательных пересевов накопительной культуры и успешного выращивания колоний на твердой питательной среде Пфеннига с ферригидритом достигли 100% доли фило типов рода *Thermincola* в накопительной культуре по результатам высокопроизводительного секвенирования, однако оказалось, что накопительная культура содержит 2 фило типа рода *Thermincola*, которые показали 99.25% и 98.84% сходства по V4 участку гена 16SpPHK с “*Thermincola potens*”, второй фило тип вероятно является новым видом. Интересной особенностью полученной накопительной культуры *Thermincola* является сильная адгезия клеток на поверхности образующегося клетками магнетита, в микроскопе клетки есть только на поверхности минерала.

Также получены первые накопительные культуры углеводородокисляющего психрофила *Thalassolituus* из морского осадочного топливного элемента. Клетки под микроскопом представляют собой небольшие по размеру палочки, потребляющие ацетат и дизельное топливо в качестве источника углерода, культивируются на морской среде с ферригидритом при +14 °С. И получены первичные накопительные культуры термофила из пробы горячего источника кальдеры Узон нитратредуктора рода *Calditerrivibrio*. Ранее было показано накопление этого фило типа на анодах осадочного МТЭ в горячем источнике кальдеры Узон. Клетки *Calditerrivibrio* растут при +55 °С и потребляют ацетат, наиболее активный рост наблюдался при наличии в среде нитратов.

Основные выводы:

В ходе работ 1 года диссертационного исследования удалось проанализировать данные по осадочному МТЭ и охарактеризовать его бактериальные сообщества. Также из проб анода анализируемого осадочного МТЭ была получена накопительная культура на 100% состоящая из представителей *Thermincola*. Получены накопительные культуры психрофила рода *Thalassolituus* и термофила рода *Calditerrivibrio*.

ЛИТЕРАТУРА

1. Logan B.E., Rossi R., Ragab A., Saikaly P.E., 2019. Electroactive microorganisms in bioelectrochemical systems // J. Nature Reviews Microbiology. V.17. P. 307-319.
2. Lovley D.R., Holmes D.E., 2021. Electromicrobiology: the ecophysiology of phylogenetically diverse electroactive microorganisms // J. Nature Reviews Microbiology. P. 1-15.
3. Nealson K.H., 2017. Bioelectricity (electromicrobiology) and sustainability // J. Microbial biotechnology. V. 10(5). P. 1114-1119.

THE ROLE OF EXTREMOPHILIC ELECTROACTIVE MICROORGANISMS IN THE PROCESS OF IRON BIOMINERALIZATION

Abstract. *Electroactivity is found in many microorganisms, but the production of electric current in different electroactive microorganisms can differ by orders of magnitude. Previously, electroactivity has been studied among mesophilic neutrophilic bacteria. However, new perspectives are opened by searching for electroactive bacteria among extremophiles. At the same time, the role and contribution of electroactive prokaryotes in natural processes are poorly understood. This thesis aims to search for new electroactive bacteria among extremophiles and to identify their contribution to iron biomineralization. During the first year, the microbial community of the sedimentary MFC was analyzed. Pure and accumulative cultures of potential electrogenes were obtained from it and other sources: thermophilic iron reducer of the genus *Thermincola*, psychrophilic organotroph of the genus *Thalassolituus* and thermophilic nitrate reducer *Calditerrivibrio*.*

Keywords: *electromicrobiology, electroactivity, electrogen, electrotroph, extremophile, iron biomineralization.*

Лайкова Александра Алексеевна
аспирант ФИЦ Биотехнологии РАН 1 года обучения
научная специальность 1.5.11 Микробиология
e-mail: laykova2011@yandex.ru

Научный руководитель
Литти Юрий Владимирович
кандидат биологических наук,
зав. лаборатории микробиологии антропогенных мест обитания



ИССЛЕДОВАНИЕ ОПТИМИЗАЦИИ БИОДЕГРАДАЦИИ ОТХОДОВ И ПРОДУКЦИИ БИОВОДОРОДА В ХОДЕ ТЕМНОВОЙ ФЕРМЕНТАЦИИ В АНАЭРОБНОМ МИКРОБНОМ СООБЩЕСТВЕ

Аннотация. Работа посвящена изучению влияния металлосодержащих добавок (магнетита, Fe^0 , Ni^0 , $FeCl_3$) и их концентраций (10-200 мг/л) на параметры темновой ферментации молочной сыворотки водородпродуцирующим штаммом *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* SP-H2 в термофильном периодическом режиме. Оптимальные концентрации добавок для стимуляции выхода водорода и гидрогеназной активности составили 10, 100, 10 и 50 мг/л, соответственно. Внесение 10 мг/л магнетита приводило к увеличению выхода водорода на 34,8%. Впервые было продемонстрировано, что микробные клетки аккумулируют металлы в фазе активной продукции водорода, затем концентрация металлов в клетках уменьшается. Полученные результаты позволили выявить закономерности использования металлосодержащих добавок при продукции биоводорода. Перспективой дальнейших исследований является изучение ассимиляции металлов в микробном метаболизме.

Ключевые слова: биоводород, темновая ферментация, гидрогеназная активность, металлосодержащие добавки, *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum*.

Анаэробное сбраживание отходов – это экологичный способ получения энергии, позволяющий снизить антропогенную нагрузку на окружающую среду. Водород занимает особое место среди генерируемого биотоплива как наиболее перспективный, ценный и экологически чистый газообразный продукт. Темновая ферментация является одной из стадий анаэробного сбраживания и представляет собой оптимальный и эффективный метод промышленной продукции водорода, поскольку имеет ряд преимуществ с точки зрения экономических и энергетических затрат [4]. В настоящее время активно изучаются различные методы оптимизации темновой ферментации, связанные, главным образом, с поиском и применением новых высокоэффективных штаммов, продуцирующих водород. Водородопродуцирующие бактерии характеризуются наличием $[Ni-Fe]$ и $[Fe-Fe]$ гидрогеназ, способных восстанавливать протоны до молекулярного водорода. Стимуляция гидрогеназной активности и выработки водорода путем добавления в среду определенных концентраций соединений металлов (прежде всего, железа и никеля) является современным подходом, направленным на повышение производительности процесса [5]. Важным аспектом является изучение ассимиляции металлов в микробном метаболизме и стимуляции продукции водорода у новых выделенных суперпродуцирующих штаммов. Известно, что основные механизмы стимуляции продукции водорода соединениями металлов связаны с участием ионов металлов в синтезе гидрогеназ, электрохимическими

характеристиками добавок, влиянием на экспрессию целевых генов, участвующих в производстве водорода, улучшением транспорта электронов и развития биопленок [1]. Целью данной работы является оценка влияния металлосодержащих добавок (магнетита ($(\text{FeO} \cdot \text{Fe}_2\text{O}_3)$), нулевалентного железа (Fe^0), нулевалентного никеля (Ni^0) и FeCl_3) и их концентраций (10-200 мг/л) на характеристики сбраживания молочной сыворотки чистой культурой *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* SP-H2.

Положительное влияние на водородную продукцию в ходе темновой ферментации молочной сыворотки наблюдалось практически для всех добавок в концентрации до 100 мг/л. Оптимальные концентрации добавок, т.е. наилучшим образом стимулирующие продукцию водорода, составили 10 мг/л магнетита, 100 мг/л нулевалентного железа, 10 мг/л нулевалентного никеля или 50 мг/л FeCl_3 . При внесении 10 мг/л магнетита наблюдалось улучшение выхода водорода на 34,8% (примерно до 130 мл H_2 /г ХПК) по сравнению с контролем. При добавлении 100 мг/л Fe^0 наблюдалось увеличение гидрогеназной активности на 23,6%. Одновременно было показано, что избыточные концентрации добавок оказывают негативный эффект на характеристики темновой ферментации. Анализ состава и соотношения растворимых продуктов метаболизма показал, что преобладающими соединениями были ацетат, бутират, пропионат и этанол. В большинстве проб, характеризующихся наилучшей продукцией водорода, были зафиксированы наиболее высокие концентрации ацетата по сравнению с контролем, что согласуется с литературными данными о том, что ацетатный путь темновой ферментации является наиболее эффективным с точки зрения выхода водорода [3]. На основании известных данных о выходе водорода и теплоте сгорания водорода и лактозы (основного компонента субстрата) была рассчитана эффективность преобразования энергии (ECE) для оценки энергетической эффективности процесса темновой ферментации. Было продемонстрировано значительное улучшение ECE на 22,7% при добавлении 10 мг/л магнетита по сравнению с контролем ($p < 0,05$). Подобный эффект наблюдали и при добавлении оптимальных концентраций других соединений. Таким образом, внесение добавок на основе металлов усиливает энергетическую конверсию субстрата за счет интенсификации продукции водорода. Однако чрезмерные дозировки отрицательно влияют на выработку метаболитов и общую энергоэффективность.

По результатам изучения спектров распределения металлов в клетках при помощи метода SEM-EDS было обнаружено, что в клетках накапливаются металлы в начале активной фазы роста и продукции водорода, а в стационарной фазе, характеризующейся минимальным образованием водорода, содержание железа или никеля значительно уменьшается. Так, содержание железа в клетках в начале инкубации превышало содержание в конце на 67,9% и 52,9% при добавлении FeCl_3 и магнетита, соответственно. При росте культуры в среде с добавлением Ni^0 разница между содержанием никеля в клетках в начале и в конце инкубации составила 30,0%. Была показана положительная корреляция между выходом водорода и содержанием железа в клетках ($p < 0,001$). Накопление металлов свидетельствует о способности и потребности микроорганизмов использовать данные соединения в ходе метаболизма. Снижение содержания металлов в клетках к концу культивирования, предположительно, связано с окончанием активной фазы образования водорода, обеднением субстрата в среде и способностью клеток выводить избыточное количество переходных металлов при снижении метаболическую активность, чтобы избежать внутриклеточного повреждения [2]. Полученные результаты предоставляют важную информацию о закономерностях поглощения металлов в ходе темновой ферментации, а также об оптимальных формах и дозировках металлов для увеличения производства биоводорода. В ходе дальнейших исследований необходимо сфокусироваться на более детальном изучении механизмов поглощения и использования метал-

лов клетками, а также стимуляции гидрогеназной активности и других путей повышения продукции биоводорода.

Основные выводы:

Показано, что внесение оптимальных количеств магнетита (10 мг/л), Fe⁰ (100 мг/л), Ni⁰ (10 мг/л), и FeCl₃ (50 мг/л) значительно улучшает характеристики процесса темновой ферментации молочной сыворотки. При добавлении 10 мг/л магнетита зафиксировано наиболее существенное увеличение выхода водорода (на 34,8%) и эффективности преобразования энергии (на 22,7%). Наибольшее увеличение гидрогеназной активности составило 23,6% при добавлении 100 мг /л Fe⁰. В период активной продукции водорода в клетках *T. thermosaccharolyticum* SP-H2 накапливаются значительные количества железа (до 2,8% мас.) и никеля (до 0,5% мас.), содержание которых снижается до 67,9% в стационарной фазе темновой ферментации.

ЛИТЕРАТУРА

1. Arun J. Sasipraba T., Gopinath K. P., Priyadharsini P., Nachiappan S., Nirmala N., Dawn S. S, Chi N. T. L., Pugazhendhi A. Influence of biomass and nanoadditives in dark fermentation for enriched biohydrogen production: A detailed mechanistic review on pathway and commercialization challenges //Fuel. – 2022. – Т. 327. – С. 125112.
2. Bennett B. D., Brutinel E. D., Gralnick J. A. A ferrous iron exporter mediates iron resistance in *Shewanella oneidensis* MR-1 //Applied and environmental microbiology. – 2015. – Т. 81. – №. 22. – С. 7938-7944.
3. Sim X. Y., Tan J. P., He N., Yeap S. K., Hui Y. W., Luthfi A. A. I., Manaf S.F.A., Bukhari N. A., Jamali N. S. Unraveling the effect of redox potential on dark fermentative hydrogen production //Renewable and Sustainable Energy Reviews. – 2023. – Т. 187. – С. 113755.
4. Tagne R. F. T., Costa P., Casella S., Favaro L. Optimization of biohydrogen production by dark fermentation of African food-processing waste streams //International Journal of Hydrogen Energy. – 2024. – Т. 49. – С. 266-276.
5. Yin Y., Wang J. Mechanisms of enhanced biohydrogen production from macroalgae by ferrous ion: insights into correlations of microbes and metabolites //Bioresource technology. – 2019. – Т. 291. – С. 121808.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ РАБОТЫ

Тезисы докладов:

1. A.A. Laikova, P.D. Biryuchkova, S.V. Shekhurdina, E.A. Zhuravleva, A.A. Ivanenko, N.G. Loiko, A.A. Kovalev, D.A. Kovalev, Y.V. Litt. The accumulation of iron in *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* cells coincides with increased biohydrogen production // Abstract Book of the International Conference on New Horizons in Biotechnology (NHBT-2023): November 26-29, 2023, Trivandrum, India. – P. 269 (постерный доклад, диплом за лучший постер).
2. Лайкова А.А., Журавлева Е.А. Накопление металлов в клетках *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* SP-H2 в ходе стимуляции темновой ферментации за счет добавления соединений железа и никеля // Материалы Международного молодежного научного форума «ЛОМОНОСОВ-2024» (устный дистанционный доклад).

OPTIMIZATION OF ORGANIC WASTE BIODEGRADATION AND BIOHYDROGEN PRODUCTION DURING DARK FERMENTATION IN THE ANAEROBIC MICROBIAL COMMUNITY

Abstract. *The research is devoted to studying the influence of metal-based additives (magnetite, Fe₀, Ni₀, FeCl₃) and their concentrations (10-200 mg/l) on the parameters of dark fermentation of cheese whey by the hydrogen-producing strain *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* SP-H2 in a thermophilic batch mode. The optimal concentrations of additives to stimulate hydrogen production and hydrogenase activity were 10, 100, 10 and 50 mg/l, respectively. The addition of 10 mg/l magnetite led to an increase in hydrogen yield by 34.8%. It was revealed for the first time that microbial cells accumulate metals in the phase of active hydrogen production, but the concentration of metals in the cells subsequently decreases. The results obtained made it possible to identify patterns in the application of metal-based additives in dark-fermentative biohydrogen production. The prospect for further research is to investigate the assimilation of metals in microbial metabolism.*

Keywords: *biohydrogen, dark fermentation, hydrogenase activity, metal-based additives, *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum*.*

Рассомахина Наталья Вадимовна

аспирант ФИЦ Биотехнологии РАН 1 года обучения

научная специальность 1.5.4 Биохимия

e-mail natalia.rassomahina@ya.ru



Научный руководитель

Жердева Виктория Вячеславовна

кандидат биологических наук,

зав. лабораторией молекулярного имиджинга

МОДЕЛИРОВАНИЕ ПРОЦЕССОВ, ОБЪЕДИНЯЮЩИХ МЕТОДЫ ГЕНЕРАЦИИ ТРЁХМЕРНЫХ ОПУХОЛЕВЫХ ОРГАНОИДОВ ИЗ КСЕНОТРАНСПЛАНТАТОВ И КУЛЬТУР ЛИМФОЦИТОВ

Аннотация. На сегодняшний день в онкологии самыми релевантными моделями, имитирующими поведение опухоли *in vivo*, являются 3D-тканевые конструкции, получаемые в условия сокультивирования органоидов из тканей пациентов резецированной опухоли и лимфоцитов. Главное преимущество таких моделей в том, что они имитируют клеточный состав и фенотип ткани органа, из которого они получены, и содержат стволовые клетки, реализующие возможность неограниченного деления, демонстрируют механизмы иммунной системы в ответ на терапию.

Технологии прецизионной медицины на основе пациент-специфических опухолевых органоидов являются весьма дорогостоящими и требуют соблюдения медицинской этики и персонального согласия пациентов. В связи с чем, на предварительном этапе работы нами были подобраны оптимальные условия для генерации и длительного культивирования функциональных 3D опухолевых линий на основе резецированного опухолевого материала из ксенотрансплантатов опухолей человека на животных, а также подобраны методы получения и культивирования лимфоцитов для изучения иммунногенных механизмов клеточной гибели.

Ключевые слова: 3D опухолевые органоидные модели; Т-лимфоциты, иммунногенные механизмы клеточной гибели, пролиферативный потенциал.

Изучение регуляторных механизмов иммунной системы, индуцирующих сигналинг клеточного стресса и контролируемую «иммуногенную клеточную гибель» (Immunogenic cell death – ICD) [1, 2], пробудило интерес к поиску потенциальных противоопухолевых мишеней. Взаимодействие клеток опухоли, опухолевого окружения (Tumor microenvironment – TME) и клеток иммунной системы наиболее адекватно отражает «индивидуальность» злокачественного новообразования. Персонализированный подход невозможен без учета особенностей взаимодействия опухоли с клетками иммунной системы. Неоднократно подчеркивалось, что стандартные модели животных *in vivo* и 2D клеточные модели *in vitro* не способны воспроизводить сложное иммунное микроокружение исходной опухоли (Tumor immune microenvironment – TIME) [3] в отличие от органоидов.

Органоиды опухолей человека (patient-derived tumor organoids or PDOs) представляют собой универсальные 3D тканевые модели *ex vivo*, которые могут быть сконструированные из резецированных опухолей пациентов или материала, полученного при помощи биопсии, благодаря чему служат уникальными платформами для персонализированного тестирования химиотера-

пептической чувствительности. Органоиды сохраняют генетические и фенотипические характеристики исходной ткани. На сегодняшний день в лабораториях по всему миру созданы биобанки различных «подтипов» опухолевых органоидов. Внедрение технологий 3D культивирования позволит усовершенствовать методы лекарственного скрининга и проводить анализ резистентности, и, кроме того, повысит эффективность исследований прогностических маркеров, вовлеченных в патогенез заболевания [4].

Технологии прецизионной медицины на основе пациент-специфических опухолевых органоидов являются весьма дорогостоящими и требуют соблюдения медицинской этики и персонального согласия пациентов. В связи с чем, на предварительном этапе работы нам представлялось необходимым подобрать протоколы генерации и культивирования таких 3D опухолевых моделей в культуре, а также подобрать методы получения и культивирования лимфоцитов для изучения иммунногенных механизмов клеточной гибели без участия пациентов. Руководствуясь ранее опубликованными методами, мы получали трехмерные опухолевые модели органоидов из опухолевых человеческих линий, стабилизированных в виде подкожных опухолевых ксенографтов на мышах линии nude.

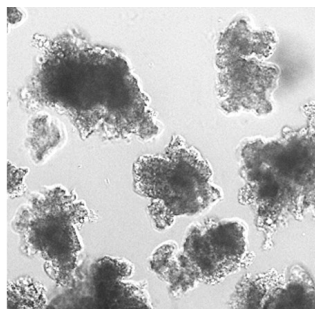
Методы генерации и культивирования трёхмерных опухолевых органоидов были протестированы с использованием линии человеческих опухолевых клеток, стабилизированных в виде подкожных опухолевых ксенографтов на мышах линии nude.

Для этого клетки аденокарциномы легких A549 прививали подкожно мышам линии nude. По достижении опухоли размера около 1 см³ проводили лечение ингибиторами тимидинкиназы (любезно предоставленными д.ф.н. Макаровым В.А.), регулярно фиксируя изменения размеров опухолевых узлов. Размеры опухолевых узлов рассчитывали по модифицированной эллипсоидной формуле $V \text{ опухоли} = 1/2 (\text{длина} \times \text{ширина}^2)$ [5, 6]. Для расчета торможения роста опухоли (ТРО) мышей группировали в когорты, помеченные как ответившие на терапию и не ответившие (или плохо отреагировавшие) на терапию. среднее значение ингибирования роста опухоли (%) по формуле: $\text{ТРО, \%} = (V \text{ опухоли контр} - V \text{ опухоли экспер}) / V \text{ контр} \times 100$.

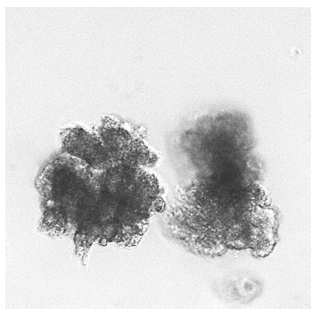
Мышей из экспериментальной группы, плохо отреагировавшей на терапию, вскрывали спустя 45 дней после начала терапии и инспектировали на предмет наличия метастазов, выявленных в легких и печени. На первом этапе методом резекции были извлечены ткани легких и печени мыши, предположительно содержащие метастазированные области [7, 8]. Используя технику биопсии с помощью пинцета отделяли очаги опухолевого поражения размером 1 мм и помещали их в предварительно подготовленные фальконы с холодным буферным раствором, содержащим антибиотики. Затем фрагменты ткани обрабатывали в 5 мл TrypLE Express (ThermoFisher, 12605028) и инкубировали при 37 °C в течение 10 мин. После чего суспензию клеток пропускали через клеточное сито (размер пор 50 мкм) и промывали 5 мл среды DMEM содержащей 10% FBS и антибиотики, после чего центрифугировали при 1200 x g в течении 5 минут. На следующем этапе удаляли надосадочную жидкость, суспендировали осадок клеток с Matrigel Matrix (Corning), высевали в планшеты и подвергали полимеризации в условиях CO2 5% и 37C. После добавляли усовершенствованную культуральную среду DMEM/F-12 (GIBCO), дополненную 1:50 B-27 (GIBCO), 1:100 N-2 (GIBCO), 10 мМ никотинамида (Sigma), 1,25 мМ N-ацетил-L-цистеина (Sigma), 10 нМ [Leu15]-гастрина (Sigma), 5 мМ A83-01 (Tocris), 50 нг/мл EGF (PeproTech), 100 нг/мл FGF10 (PeproTech), 25 нг/мл HGF (PeproTech), 500 нг/мл RSpol (Peprotech, 120-38) и 10 нг/мл Wnt3a (Peprotech, 31520), 100 мкг/мл Normocin, 100 мкг/мл Gentamicin [8]. Пересев проводили, используя раствор для диссоциации 0.25% Trypsin-EDTA (GIBCO). Для криоконсервирования использовали сыворотку FBS (Capricorn Scientific), дополненную 10% DMSO. Органоидные культуры перед криоконсервированием были протестированы на контаминацию микоплазмой с помощью набора MycoReport (Eurogen). Полученные из ткани печени и легких органоиды представлены на рисунке 1.

Органоиды из ткани печени

1 пассаж

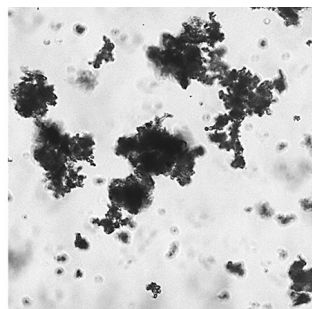


3 пассаж



Органоиды из ткани легких

1 пассаж



3 пассаж

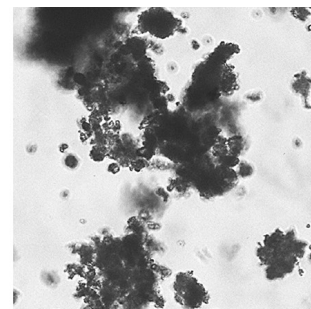


Рис. 1. Культуры опухолевых органоидов мыши, изображение получено в белом свете: органоиды печени, органоиды легких. Увеличение – x20. Зое имиджер (Termofisher Scientific, USA)

Для подтверждения пролиферативного потенциала, было проведено иммунофлуоресцентное окрашивание органоидов, полученных из ткани печени, на маркеры Ki67, также оценивали маркер PD-L1 (лиганд рецептора лимфоцитов PD-1 программируемой клеточной гибели) (Рис. 2).

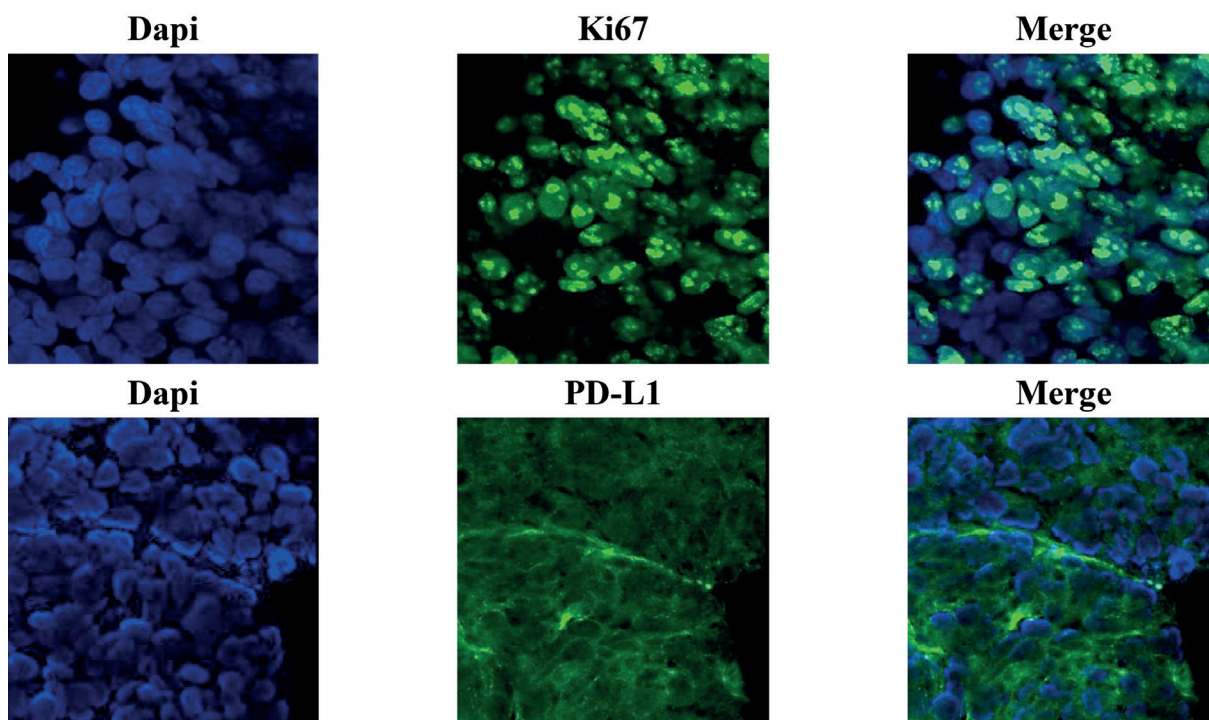
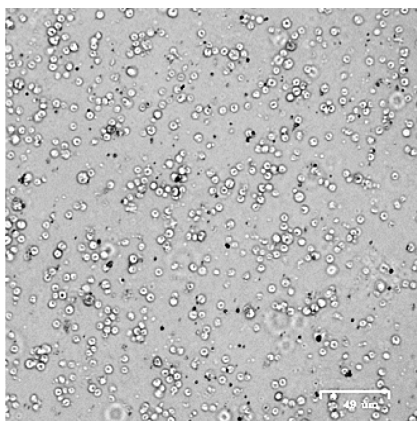


Рис. 2. Иммунофлуоресцентное окрашивание органоидов печени мыши.
Dapi – blue; Ki67, PD-L1 - green. Масштабная шкала – 200 мкм

Дополнительно была получена культура Т-лимфоцитов из селезенки мыши линии C57BL/6. Резецированная селезенка была помещена в пробирку с ЭДТА, затем гомогенизирована при помощи пестика. Выделение лимфоцитов и моноцитов проводили, используя реагент HiSep™ LSM 1077, согласно протоколу. Полученные линии клеток были частично криоконсервированы и для тестирования выживаемости помещены в чашки Петри с культуральной средой DMEM содержащей 10% FBS и антибиотики, поверхность чашек предварительно покрывали Matrigel. Было продемонстрировано, что клетки сохраняют жизнеспособность в течении 7 дней. (Рис. 3).

Лимфоциты



Моноциты

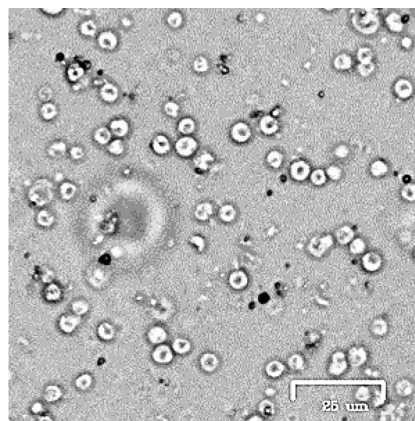


Рис. 3. Культура лимфоцитов и моноцитов, полученная из селезенки мыши линии C57BL/6; клетки сохраняют жизнеспособность в течении 7 суток (1 фото масштабная шкала – 50 мкм; 2 фото масштабная шкала – 25 мкм) , Zое имиджер (Termofisher Scientific, USA)

Таким образом, в ходе исследований были протестированы основные методы, включающие получение опухолевых органоидов из ксенотранспланатов и поддержание культур Т-лимфоцитов. Полученные результаты предполагают возможность совместного культивирования и поддержания жизнеспособности опухолевых органоидных линий с иммунными клетками.

Основные выводы:

1. Получены культуры опухолевых органоидов печени и легких.
2. Подтвержден пролиферативный потенциал линии опухолевых органоидов печени методом иммунофлуоресцентного анализа на маркеры Ki67 и маркеры программируемой клеточной гибели PD-L1.
3. Получены линии иммунных клеток (лимфоцитов и моноцитов) из селезенки мышей C57BL/6 и показана их сохранность в культуре в течении 7 суток.

ЛИТЕРАТУРА

1. Garg A. et al. Immunogenic cell death //The International journal of developmental biology. – 2015. – Т. 59. – №. 1. – С. 131-140.
2. Galluzzi L, Vitale I, Warren S, Adjemian S, Agostinis P, Buqué Martinez A, et al. Consensus guidelines for the definition, detection and interpretation of immunogenic cell death. J Immunother Cancer. 2020;8:1–21.
3. Dutta D., Heo I., Clevers H. Disease modeling in stem cell-derived 3D organoid systems //Trends in molecular medicine. – 2017. – Т. 23. – №. 5. – С. 393-410.
4. Kastner, C.; Hendricks, A.; Deinlein, H.; Hankir, M.; Germer, C.-T.; Schmidt, S.; Wiegering, A. Organoid Models for Cancer Research—From Bed to Bench Side and Back. Cancers 2021, 13, 4812. <https://doi.org/10.3390/cancers13194812>
5. Jensen MM, Jørgensen JT, Binderup T, Kjaer A. Tumor volume in subcutaneous mouse xenografts measured by microCT is more accurate and reproducible than determined by 18F-FDG-microPET or external caliper. BMC Med Imaging. 2008 Oct 16;8:16. doi: 10.1186/1471-2342-8-16. PMID: 18925932; PMCID: PMC2575188.
6. Nuciforo S. et al. Organoid models of human liver cancers derived from tumor needle biopsies //Cell reports. – 2018. – Т. 24. – №. 5. – С. 1363-1376

7. Li Y. F. et al. Patient-derived organoids of non-small cells lung cancer and their application for drug screening //Neoplasma. – 2020. – T. 67. – №. 2.
8. Huch M. et al. Long-term culture of genome-stable bipotent stem cells from adult human liver // Cell. – 2015. – T. 160. – №. 1. – С. 299-312.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ РАБОТЫ

Статьи в рецензируемых журналах:

1. Rassomakhina N. V. et al. Tumor Organoids: The Era of Personalized Medicine //Biochemistry (Moscow). – 2024. – T. 89. – №. Suppl 1. – С. S127-S147.

Rassomakhina Natalia Vadimovna
RESEARCH CENTRE OF BIOTECHNOLOGY RAS

MODELING OF PROCESSES COMBINING METHODS FOR GENERATING THREE-DIMENSIONAL TUMOR ORGANOIDS FROM XENOGRAFTS AND LYMPHOCYTE CULTURES

Abstract. *Today in oncology, the most relevant models that simulate the behavior of a tumor in vivo are 3D tissue constructs obtained by co-cultivating organoids from patient tissues of resected tumors and lymphocytes. The main advantage of such models is that they imitate the cellular composition and phenotype of the tissue of the organ from which they are obtained, and contain stem cells that realize the possibility of unlimited division and demonstrate the mechanisms of the immune system in response to therapy. Precision medicine technologies based on patient-specific tumor organoids are very expensive and require compliance with medical ethics and personal consent of patients. In this regard, at the preliminary stage of work, we tested methods for the generation and cultivation of such 3D tumor models based on resected tumor material from xenografts of human tumors in animals, and also selected methods for obtaining and culturing lymphocytes to study the immunogenic mechanisms of cell death.*

Keywords: *3D tumor organoid models, cancer, immune cells, the proliferative potential.*

Шашин Денис Максимович

аспирант ФИЦ Биотехнологии РАН 1 года обучения

научная специальность 1.5.4 Биохимия

e-mail: dmshashin@gmail.com

Научный руководитель

Шлеева Маргарита Олеговна

доктор биологических наук,

зав. лабораторией биохимии стрессов микроорганизмов



ФОТОДИНАМИЧЕСКИЙ ЭФФЕКТ ЭНДОГЕННЫХ ПОРФИРИНОВ ДЛЯ ИНАКТИВАЦИИ МИКОБАКТЕРИЙ

Аннотация. Фотодинамическая терапия – это перспективный метод борьбы с инфекционными заболеваниями, в том числе с туберкулёзом. При переходе в покоящееся состояние *Mycobacterium tuberculosis* накапливают большое количество эндогенных фоточувствительных молекул – порфиринов. Это накопление можно индуцировать и в вегетативных формах микобактерий, что приводит к их фоточувствительности. Воздействие света с длиной волны 565 нм оказывает фотодинамическое действие за счёт взаимодействия с молекулой порфиринов, а также приводит к образованию фотопродукта, проявляющего собственную фототоксичность при воздействии света с длиной волны 650 нм. Под действием света с длиной волны 565 нм происходит необратимое образование белковых агрегатов в покоящихся формах *M. smegmatis*, вследствие которого наблюдается исчезновение белков в разделяющем геле электрофореза. Светочувствительные белки включают в себя белки, принадлежащие гликолитическому пути, ЦТК, пентозафосфатному пути, пути окислительного фосфорилирования и продукции энергии. Так же защитные белки были чувствительны к свету. Фотодинамическая инактивация (ФДИ) приводит к подавлению активности дыхательной цепи и разрушению ферментов, вовлечённых в процесс биосинтеза белков и нуклеиновых кислот – необходимых процессов для перехода бактерий из покоящегося состояния в состояние активного размножения.

Ключевые слова: порфирины, туберкулёз, покоящиеся формы, фотодинамическая терапия.

Большой проблемой при лечении туберкулёза является распространённость антибиотикорезистентных штаммов возбудителя этого заболевания – *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*). Особенностью данного патогенного микроорганизма является его способность переходить в покоящееся состояние, которое обуславливает развитие латентной формы туберкулёза, носителями которой является около четверти населения земли. Кроме того, в покоящемся состоянии бактерия, за счёт кардинально замедленного метаболизма, устойчива к воздействию большинства используемых в клинике антибиотиков. Эти факты обуславливают необходимость поисков новых методов борьбы с бактерией *Mycobacterium tuberculosis*, её резистентными штаммами и покоящимися формами. Одним из таких методов является фотодинамическая терапия.

Фотодинамическая терапия (ФДТ) – это метод лечения заболеваний различной этиологии, при котором взаимодействие света и фотосенсибилизатора (ФС) внутри клетки-мишени приводит к образованию активных форм кислорода, повреждающих данные клетки и приводящие к их разрушению. ФДТ нашла широкое применение в онкологии при лечении опухолей различной локализации [1], но этот метод можно применить и для борьбы с возбудителями инфек-

ционных заболеваний. Обнаружено, что некоторые патогенные микроорганизмы, в частности представители рода *Mycobacterium* – возбудители микобактериозов и туберкулёза – при переходе в состояние покоя накапливают в себе эндогенные ФС – порфирины, что делает их уязвимыми к фотодинамическому воздействию [2]. Воздействие света на такие бактерии приводит к запуску последовательных реакций, в результате чего клетка гибнет, причём этот эффект способен поражать как покоящиеся и резистентные микобактерии, так и метаболически активные патогены, при определённых условиях.

Целью данной работы является разработка подходов для индуцированного накопления эндогенных порфиринов в микобактериях и выявление белковых мишеней их фотодинамического действия.

Для этого покоящиеся формы бактерий были получены путём культивирования их в среде Сотона с постепенным снижением pH [3]. Стимуляции синтеза ФС была достигнута путём добавления в среду роста 5-аминолевулиновой кислоты и разных концентраций ионов металлов Zn^{2+} и Mg^{2+} .

Транскриптомный анализ выявил активацию 8 генов, участвующих в метаболизме тетрапирролов при переходе *Mycobacterium tuberculosis* в состояние покоя, что может приводить к наблюдаемому накоплению свободных порфиринов. Среди этих генов наиболее важными являются гены, расположенные в начале пути синтеза гема (HemB, HemC, HemD). Отмечается повышение уровня экспрессии магниевой хелатазы (Rv0958), участвующей в образовании порфирина магния, а также генов, ответственных за синтез кобиринатов: Rv2848c (кобиринат А, С-диамидсинтаза, а,с-диамидсинтаза гидробириновой кислоты); Rv1314c (cob(I)иринат а, аденозилтрансфераза с-диамид); Rv2207 (никотинатнуклеотиддиметилбензимидазолфосфорибозилтрансфераза); Rv2208 (аденозилкобинамид-ГДФ-рибазолтрансфераза).

В присутствии 5-аминолевулиновой кислоты происходило увеличение уровня экспрессии генов, ответственных за метаболизм порфиринов в активно растущих клетках *M. tuberculosis*: синтазы уропорфириноген-III (Rv0260c) и С-метилтрансферазы уропорфирин-III (Rv0511)—SAM-зависимая мембраносвязанная метилтрансфераза, метилирующая уропорфирин III с образованием сирогидрохлорина.

Поскольку активность некоторых ферментов синтеза порфиринов сильно зависит от ионов металлов, было исследовано, как различные концентрации ионов металлов Mg^{2+} и Zn^{2+} , добавленные в среду, влияют на синтез порфиринов в культуре *Mycobacterium smegmatis* (Msm). При увеличении концентрации магния в 5 раз (с 5 мкМ до 25 мкМ) и при увеличении концентрации цинка в 10 раз (с 6,2 мкМ до 62 мкМ) относительно стандартной среды Сотона, происходило заметное увеличение продукции эндогенных порфиринов в покоящихся формах Msm. В то же время синергетический эффект двух ионов привел к наибольшей продукции порфиринов в этих бактериях.

В спектрах поглощения хлороформно-метанольного экстракта покоящихся клеток Msm, выращенных в присутствии повышенной концентрации ионов металлов, появляется заметное плечо в полосе Soret в длинноволновой области, что можно интерпретировать как появление металлопорфирина, скорее всего Zn-порфирина, что и было подтверждено методами ВЭЖХ и масс-спектрометрии.

Под действием света с длиной волны 565 нм (соответствует пику в спектре поглощения порфиринов) происходила значительная гибель покоящихся форм *Mycobacterium smegmatis* (99, 99%). При облучении светом с длиной волны 565 нм растворённого копорпорфирина – одного из основных накапливающихся пигментов в микобактериях – наблюдали изменение в спектрах поглощения и флуоресценции раствора, что свидетельствует о накоплении фотопродукта (появляется пик 650 нм в спектре поглощения). При последовательном воздействии света с длиной

волны 565 нм и затем с длиной волны 650 нм на порфирин-содержащие клетки *Mycolicibacterium smegmatis* усиливается эффект фотодинамической инактивации микобактерий.

Для определения мишени фотодинамического воздействия в микобактериях, был проведён анализ белков *Msm* до и после облучения. Клетки подвергали воздействию света с длиной волны 565 нм (совпадает с одной из полос в спектре поглощения порфиринов в видимой области) в течение 5 и 15 минут (плотность мощности 180 мВт/см²). Белки облучённых микобактерий разделили с помощью денатурирующего электрофореза в 12% ПААГ в присутствии SDS, а полученные после разделения белковые полосы были проанализированы методом MALDI-TOF. Функциональную активность мембранно-связанных белков дыхательной цепи – потенциальных мишеней фотодинамического воздействия – оценили по активности ДФИ-редуктазы и скорости поглощения кислорода культурой до после облучения.

Было обнаружено, что чем выше доза облучения, тем меньше белковых полос наблюдалось в разделяющем геле и тем больше белка оставалось в верхней части концентрирующего геля и на границе раздела между концентрирующим и разделяющим гелями. При анализе изменений количества белков различных функциональных групп было выявлено, что наибольшие изменения (вплоть до исчезновения белков) произошли в группах “информационные пути”, “клеточная стенка и клеточные процессы”, “промежуточный метаболизм и дыхание” и “регуляторные белки”.

Активность дыхательной цепи клеток *Mycolicibacterium smegmatis* в стационарной фазе оценивали по скорости общего потребления кислорода (активности всей дыхательной цепи) и снижению окислительно-восстановительного показателя 2,6-дихлорфенолиндофенола. Было обнаружено, что после 30-минутного облучения клеток *Msm*, выращенных в присутствии АЛК, активность дыхательной цепи существенно снижалась в соответствии с этими двумя экспериментами.

Основные выводы:

1. При добавлении АЛК к метаболически активным клеткам МТБ повышается концентрация эндогенных порфиринов за счет повышения уровня экспрессии генов начальных участков биосинтеза гема: Rv0512 (порфобилиногенсинтаза), Rv0510 (порфобилиноген деаминаза), Rv2677c (копропорфириноген III оксидаза), уропорфириноген-III синтаза (Rv0260c) и уропорфирин-III С-метилтрансфераза (Rv0511). Кроме того, происходит повышение уровня экспрессии генов биосинтеза кобаламинов: Rv2066 (бифункциональная S-аденозил-L-метионин-прекоррин-2-метилтрансфераза), Rv2072c (кобальт-прекоррин-6В C5, C15-метилтрансфераза), Rv2848c (кобиринат А, С-диамидсинтаза), Rv2064 (прекоррин-3В синтаза); а также генов, участвующих в метаболизме кофактора B12: Rv1314c (коб(І)ириновая кислота а, с-диамид аденозилтрансфераза), Rv2207 (никотинат-нуклеотид-диметилбензимидазолфосфорибозилтрансфераза); Rv2208 (аденозилкобинамид-GDP рибазолтрансфераза).
2. Было выявлено, что при увеличении концентрации магния в 5 и 10 раз (с 5 мМ до 25 и 50 мМ) и при увеличении концентрации цинка в 10 раз относительно стандартной среды Сотона, наблюдалось увеличение продукции (в 1,5 раза) эндогенных порфиринов в *M. smegmatis*. Синергическое действие этих концентраций цинка и магния (3,1 мкМ и 25 мМ соответственно) приводит к 8-кратному увеличению продукции порфиринов в покоящихся формах *Mtb*, при этом монодействие 25 мМ магния увеличивает продукцию порфиринов в 3.5 раза, а увеличение концентрации цинка в 10 раз приводит к 2.5-кратному увеличению внутриклеточных порфиринов у *Mtb*.
3. Световое воздействие с длиной волны 565 нм на вегетативные микобактерии после индукции с АЛК приводит к снижению их жизнеспособности на 2 порядка. Последующее воздействие при длине волны 650 нм снижает жизнеспособность бактерий ещё дополнительно на 2 порядка.

4. Под действием света с длиной волны 565 нм происходит необратимое образование белковых агрегатов и гибель покоящихся формах *M. smegmatis*, вследствие которого наблюдается исчезновение белков в разделяющем геле электрофореза. Светочувствительные белки, принадлежат гликолитическому пути, ЦТК, пентозафосфатному пути, пути окислительного фосфорилирования и продукции энергии; а также фоточувствительны белки, участвующие в защите клетки от окислительного стресса. Происходит подавление активности дыхательной цепи.

ЛИТЕРАТУРА

1. Moghissi, K. *Is bronchoscopic photodynamic therapy a therapeutic option in lung cancer?* / Moghissi, K., K. Dixon // *European Respiratory Journal*. – 2003. – 22(3) – P. 535-541.
2. Nikitushkin, V.D. *The main pigment of the dormant Mycobacterium smegmatis is porphyrin.* / V.D. Nikitushkin, M. O. Shleeva, A. I. Zinin, K. A. Trutneva, D. N. Ostrovsky and A. S. Kaprelyants // *FEMS Microbiol Lett.* – 2016 – 363(19).
3. Shleeva, M.O. *Dormant ovoid cells of Mycobacterium tuberculosis are formed in response to gradual external acidification.* / M. O. Shleeva, Y. K. Kudykina, G. N. Vostroknutova, N. E. Suzina, A.L. Mulyukin and A. S. Kaprelyants. // *Tuberculosis (Edinb)*. – 2011. – 91(2) – P. 146-54.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ РАБОТЫ

Статьи в рецензируемых журналах:

1. M.O. Shleeva *Acquiring of photosensitivity by Mycobacterium tuberculosis in vitro and inside infected macrophages is associated with accumulation of endogenous Zn-porphyrins* / M.O. Shleeva, I.A. Linge, I.A. Gligonov, G.N. Vostroknutova, D. M. Shashin, A.M. Tsedilin, A.S. Apt, A.S. Kaprelyants, A.P. Savitsky // *Sci Rep.* – 2024 – Vol.14(1) – p.846
2. D.M. Shashin *The Effect of Antimicrobial Photodynamic Inactivation on the Protein Profile of Dormant Mycobacterium smegmatis Containing Endogenous Porphyrins* / D.M. Shashin, G.R. Demina, I. A. Linge, G. N. Vostroknutova, A. S. Kaprelyants, A. P. Savitsky and M.O. Shleeva // *Int. J. Mol. Sci.*, – 2023 – Vol.24(18)

Shashin Denis Maksimovich
RESEARCH CENTER OF BIOTECHNOLOGY RAS

PHOTODYNAMIC EFFECT OF ENDOGENOUS PORPHYRINS FOR INACTIVATION OF MYCOBACTERIA

Abstract. *Photodynamic therapy is a promising method of combating infectious diseases, including tuberculosis. During the transition to a resting state, Mycobacterium tuberculosis accumulates a large number of endogenous photosensitive molecules – porphyrins. This accumulation can also be induced in vegetative forms of mycobacteria, which leads to their photosensitivity. Exposure to light with a wavelength of 565 nm has a photodynamic effect due to interaction with a porphyrin molecule, and also leads to the formation of a photoprotect that exhibits its own phototoxicity when exposed to light with a wavelength of 650 nm. Under the action of light with a wavelength of 565 nm, the irreversible formation of protein aggregates in the resting forms of M. smegmatis occurs, as a result of which the disappearance of proteins in the separating gel of electrophoresis is observed. Photosensitive proteins*

include proteins belonging to the glycolytic pathway, TCA, pentosaphosphate pathway, oxidative phosphorylation pathway, and energy production. The protective proteins were also sensitive to light. Photodynamic inactivation (PDI) leads to the suppression of the activity of the respiratory chain and the destruction of enzymes involved in the biosynthesis of proteins and nucleic acids, which are necessary processes for the transition of bacteria from a dormant state to a state of active reproduction.

Keywords: *porphyrins, tuberculosis, dormancy, photodynamic therapy.*

Работа поддержана грантом РФФ № 24-15-00221

Шехурдина Светлана Витальевна

аспирант ФИЦ Биотехнологии РАН 1 года обучения

научная специальность 1.5.11 Микробиология

e-mail: sh.sweeta@yandex.ru

Научный руководитель

Литти Юрий Владимирович

кандидат биологических наук,

зав. лаборатории микробиологии антропогенных мест обитания



ИЗУЧЕНИЕ РАЗЛИЧНЫХ СПОСОБОВ ОПТИМИЗАЦИИ МЕТАНОГЕННОГО СБРАЖИВАНИЯ И СТИМУЛЯЦИИ ПРЯМОГО МЕЖВИДОВОГО ПЕРЕНОСА ЭЛЕКТРОНОВ

Аннотация. Исследование было направлено на изучение влияния разных дозировок пыли систем газоочистки (25–200 мг/л) на параметры анаэробного сбраживания смеси летучих жирных кислот двумя типами инокулятов в периодическом режиме при температуре 55 °С. Определены корреляции оптимальных концентраций пыли и производства метана в зависимости от природы используемого инокулята. Оптимальная концентрация пыли для электроактивного инокулята составила 25 мг/л, для диэлектрического – 50 мг/л. Внесение пыли в концентрации 25 мг/л способствовало увеличению выхода метана на 23%. Полученные результаты свидетельствуют о биотехнологическом потенциале использования пыли систем газоочистки в качестве электропроводящего материала для оптимизации параметров анаэробного сбраживания промышленных стоков, богатых летучими жирными кислотами.

Ключевые слова: анаэробное сбраживание, биогаз, анаэробные микроорганизмы, метаногенез, прямой межвидовой перенос электронов, наноразмерные материалы, электроактивные микроорганизмы.

Анаэробное сбраживание (АС) является перспективной и широко используемой технологией для рекуперации ресурсов путем переработки различных видов органических отходов и производства на их основе возобновляемого источника энергии в виде биогаза [4]. В процессе АС последовательная трансформация органических отходов происходит в результате взаимодействия разных трофических групп микроорганизмов на стадиях гидролиза, ацидогенеза, ацетогенеза и метаногенеза. Нарушение баланса между основными группами микроорганизмов является основной причиной дестабилизации работы системы АС. В частности, чрезмерное накопление промежуточных продуктов метаболизма, а именно летучих жирных кислот (ЛЖК), со скоростью, превышающей возможность их потребления, усиливает дисбаланс между ацидогенными и метаногенными группами микробного сообщества. Накопление ЛЖК в конечном итоге служит причиной снижения pH в системе и негативно сказывается на метаногенной активности архей, что приводит к снижению степени разложения органического вещества и уменьшению выхода метана [1].

Для эффективного разложения ЛЖК необходимо сбалансированное развитие консорциума синтрофных бактерий и метаногенных архей, в основе которого лежит межвидовой перенос электронов между микроорганизмами [3]. В связи с этим стимуляция процесса прямого межвидового переноса электронов (DIET), посредством внесения электропроводящих ма-

териалов, получила широкое признание как способ, позволяющий улучшить стабильность и характеристики метаногенеза за счет высокой скорости передачи электронов в синтрофном консорциуме. В настоящее время среди электропроводящих материалов наиболее распространенными добавками для повышения эффективности АС являются проводящие наноразмерные материалы на основе железа. Структура поверхности, высокое соотношение площади к объему, растворимость, каталитическая природа и электромагнитные свойства соединений железа оказывают стимулирующее влияние на выход метана. Отмечено, что проникновение и внедрение наночастиц железа в клетки микроорганизмов вызывает рост бактерий и стимулирует активность ферментов, в результате чего наблюдается более высокий процент содержания метана в биогазе [2]. Пыль систем газоочистки представляет собой металлургический отход, образующийся в больших количествах в результате очистки отходящих газов при обработке черных металлов. В соответствии с характером получения, пыль газоочистки может иметь перспективный биотехнологический потенциал использования в качестве электропроводящего материала для стимуляции DIET при анаэробном разложении органических отходов.

Целью данной работы являлось изучение влияния разных дозировок пыли газоочистки (25-200 мг/л) на АС смеси ЛЖК (ацетата, бутирата и пропионата) в концентрации 7 г/л с применением двух типов инокулятов. В качестве инокулятов применялись био пленки, выросшие на электропроводящей и диэлектрической поверхностях действующего метантенка.

Пыль систем газоочистки была предварительно проанализирована с помощью методов рентгеноспектрального микроанализа и порошковой рентгеновской дифракции для определения элементного и структурного состава. Элементный состав образца пыли включал преобладание таких элементов, как Fe, Zn и O. Основным структурным компонентом пыли являются наночастицы $ZnFe_2O_4$. Наилучшие результаты по выходу метана при АС ЛЖК были показаны для электроактивного инокулята с добавлением пыли, по сравнению с диэлектрическим инокулятом. Для электроактивного инокулята оптимальная концентрация пыли составила 25 мг/л, а для диэлектрического – 50 мг/л. При внесении 25 мг/л пыли наблюдалось увеличение выхода метана на 23% (367,8 мл CH_4 /г ХПК) по сравнению с контролем (299,7 мл CH_4 /г ХПК). При добавлении 50 мг/л пыли происходило увеличение выхода метана на 19,5% (315,5 мл CH_4 /г ХПК) по сравнению с контролем (264,1 мл CH_4 /г ХПК). Также было показано, что увеличение дозировки вносимой пыли не оказывало стимулирующего влияния на выход метана по сравнению с оптимальными дозировками. Динамика разложения и соотношение ЛЖК аналогичным образом различались для двух инокулятов и разных дозировок пыли. Только для электроактивного инокулята при концентрации пыли 25 мг/л на 27-е сутки эксперимента происходило полное разложение ацетата, бутирата и пропионата, в отличие от контроля и других дозировок пыли. В то время как для диэлектрического инокулята при концентрации пыли 50 мг/л полное разложение ацетата и бутирата приходилось на 32-е сутки эксперимента.

Для изучения активности анаэробного сообщества в процессе сбраживания ЛЖК с использованием разных дозировок пыли была измерена активность системы переноса электронов (ETS). Поскольку метаболическая активность микроорганизмов напрямую связана с процессом переноса электронов в электрон-транспортной цепи, то оценка эффективности ETS является важной характеристикой для определения биологической активности анаэробного сообщества при сбраживании субстрата. Для электроактивного инокулята было продемонстрировано значительное улучшение активности ETS на 98% при добавлении 25 мг/л пыли по сравнению с контролем, а для диэлектрического инокулята повышение активности ETS на 54% наблюдалось при концентрации пыли в 50 мг/л. Электрохимические характеристики, в частности способность ми-

кроорганизмов осуществлять внеклеточный перенос электронов оценивали с помощью метода циклической вольтамперометрии. Наличие пиков окисления и восстановления на циклических вольтамперограммах для биомассы с концентрацией пыли 25 мг/л, при их отсутствии в контрольном варианте, вероятно, свидетельствует о более активном развитии электроактивного компонента микробного сообщества.

Состав микробного сообщества контрольных и обогащенных пылью образцов с двумя типами инокулятов были проанализированы методом высокопроизводительного секвенирования V4 региона гена 16S рРНК (Illumina MiSeq, США). Основу архейного сообщества обоих инокулятов составил гидрогенотрофный метаноген рода *Methanothermobacter*. Основу бактериального микробного сообщества составили предположительно электроактивные микроорганизмы рода *Coprothermobacter*; группы MBA03 класса *Limnochordia*, рода *Candidatus Caldatribacterium*, *Clostridium sensu stricto* 1, DTU014, а также синтрофные ацетат-окисляющие бактерии *Syntrophaceticus*, *Dethiobacteraceae uncultured*, *Clostridia* D8A-2 и синтрофные пропионат-окисляющие бактерии рода *Pelotomaculum*.

Основные выводы:

Структурным компонентом пыли являются наночастицы $ZnFe_2O_4$. Эффективность АС смеси ЛЖК существенно различается в зависимости от природы инокулята и разных дозировок пыли. Для электроактивного инокулята оптимальная концентрация пыли составила 25 мг/л, для диэлектрического – 50 мг/л. При внесении 25 мг/л пыли отмечено наиболее значительное увеличение выхода метана на 23% и улучшение активности ETS на 98%. Наличие пиков окисления и восстановления на циклических вольтамперограммах для биомассы электроактивного и диэлектрического инокулята с концентрациями пыли 25 мг/л и 50 мг/л соответственно, а также обогащение микробного сообщества синтрофными и электроактивными микроорганизмами свидетельствует о вкладе электропроводящего наноразмерного материала в стимуляцию DIET в процессе АС смеси ЛЖК.

ЛИТЕРАТУРА

1. Alavi-Borazjani S.A., Capela I., Tarelho L.A. Over-acidification control strategies for enhanced biogas production from anaerobic digestion: A review // Biomass and Bioenergy. – 2020. – Vol. 143. – P. 105833.
2. Hassanein A., Kumar A.N., Lansing S. Impact of electro-conductive nanoparticles additives on anaerobic digestion performance - A review // Bioresource Technology. – 2021. – Vol. 342. – P. 126023.
3. Nozhevnikova A.N., Russkova Y.I., Litti Y.V., Parshina S.N., Zhuravleva E.A., Nikitina A.A. Syntrophy and interspecies electron transfer in methanogenic microbial communities // Microbiology. – 2020. – Vol. 89. – P. 129-147.
4. Sun H., Wang E., Li X., Cui X., Guo J., Dong, R. Potential biomethane production from crop residues in China: Contributions to carbon neutrality // Renewable and Sustainable Energy Reviews. – 2021. – Vol. 148. – P. 111360.

**INVESTIGATION OF DIFFERENT WAYS TO OPTIMIZE
METHANOGENIC DIGESTION AND STIMULATE DIRECT
INTERSPECIES ELECTRON TRANSFER**

Abstract. *The work was aimed at studying the effect of different dust dosages of gas purification systems (25-200 mg/l) on the parameters of anaerobic digestion of a mixture of volatile fatty acids by two types of inoculum in a batch mode at a temperature of 55 °C. Correlations of optimal dust concentrations and methane production have been determined depending on the nature of the inoculum used. The optimal dust concentration for the electroactive inoculum was 25 mg/l, for the dielectric inoculum – 50 mg/l. The addition of 25 mg/l dust contributed to an increase in methane yield by 23%. The obtained results indicate the biotechnological potential of using gas purification system dust as an electrically conductive material to optimize the parameters of anaerobic digestion of industrial wastewater enriched with volatile fatty acids.*

Keywords: *anaerobic digestion, biogas, anaerobic microorganisms, methanogenesis, direct interspecies electron transfer, nanoscale materials, electroactive microorganisms.*

СБОРНИК ТЕЗИСОВ

отчетной конференции аспирантов

Федерального государственного учреждения
«Федеральный исследовательский центр
«Фундаментальные основы биотехнологии»
Российской академии наук»
18 – 20 июня 2024 г.

Дизайн обложки Д.М. Мухин
Верстка Е. Игнатьева
Формат 60х90/8. Печать офсетная.
Усл. печ. л. 21,75. Тираж 300 экз.
Подписано в печать 05.07.2024 г. Заказ 0721.

Отпечатано в типографии «ВАШ ФОРМАТ»
г. Москва, ул. Донская, 32.
+7 (495) 749-45-84
www.kniga-premium.ru