



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»

24 – 26 июня 2025 г.

г. Москва

УДК 601
ББК 30.16

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*

Сборник включает тезисы ежегодной отчетной конференции аспирантов Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук»
(24-26 июня 2025 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 24-26, 2025)

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

© Коллектив авторов
© Федеральный исследовательский
центр «Фундаментальные основы
биотехнологии» Российской
академии наук, 2025

Оглавление

Бубнова А.Н. ОЦЕНКА ПОТЕНЦИАЛЬНО НОВЫХ РЕГУЛЯТОРНЫХ ЭЛЕМЕНТОВ В ГЕНОМЕ РИСА	6
Быкова А.В. ОПРЕДЕЛЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ АНТОЦИАНОВ И ПАТТЕРНОВ ЭКСПРЕССИИ ИХ СТРУКТУРНЫХ И РЕГУЛЯТОРНЫХ ГЕНОВ В ЛИСТЬЯХ И КЛУБНЯХ <i>S.TUBEROSUM</i> ПРИ КРАТКОВРЕМЕННОМ И ДЛИТЕЛЬНОМ ХОЛОДОВОМ СТРЕССЕ.....	12
Галлямов А.А. СВЯЗЬ ПЕРВИЧНОЙ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ И КОНТЕКСТА АМИЛОИДОГЕННЫХ УЧАСТКОВ С ИХ ПРИОННЫМИ СВОЙСТВАМИ.....	19
У ДРОЖЖЕЙ <i>SACCHAROMYCES CEREVISIAE</i>	19
Галуза О.А. ДЛИТЕЛЬНОЕ ВЫЖИВАНИЕ БАКТЕРИЙ В ГЕЛЯХ: ФОРМЫ И БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИЙ ПОТЕНЦИАЛ.....	23
Жилкина Т.А. ИЗУЧЕНИЕ СТРЕССОВЫХ РЕАКЦИЙ РАСТЕНИЙ ТОМАТА В ОТВЕТ НА ПРАЙМИРОВАНИЕ НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНЫМ ГИДРОЛИЗАТОМ ХИТОЗАНА ...	28
Калинин Д.С. РАЗРАБОТКА МОДЕЛИ ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ СПОСОБНОСТИ КОЛИЦИНА Е9 ПОДАВЛЯТЬ РЕПРОДУКЦИЮ ВИРУСА АЧС В КУЛЬТУРЕ КЛЕТОК ЖИВОТНЫХ	32
Кузнецов А.С. ОСОБЕННОСТИ БИОЛОГИИ ЛЯМБДОИДНЫХ БАКТЕРИОФАГОВ ϕ 24В И λ _2В8.....	36
Ламердонова Ф.Х. КОЛИЧЕСТВЕННАЯ ЯМР-СПЕКТРОСКОПИЯ $^2\text{H}/^1\text{H}$ МЕТАБОЛИТОВ РАСТЕНИЙ СЗ-ПУТИ ФОТОСИНТЕЗА НА ПРИМЕРЕ ВИНОГРАДА <i>VITIS VINIFERA</i> L., ПРОИЗРАСТАЮЩЕГО В РАЗНЫХ ПРИРОДНО-КЛИМАТИЧЕСКИХ УСЛОВИЯХ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ	41
Шабаетв А.В. БИОДЕСТРУКЦИОННЫЕ СТРАТЕГИИ ГРИБОВ БЕЛОЙ ГНИЛИ РАЗЛИЧНЫХ ЭКОЛОГИЧЕСКИХ НИШ.....	46
Гололобова А.В. ИЗУЧЕНИЕ НОВЫХ МЕХАНИЗМОВ АЦЕТОГЕНЕЗА У ПЕРВЫХ ОБЛИГАТНО АВТОТРОФНЫХ АЦЕТОГЕНОВ	51
Колосов А.В. СОВМЕСТНОЕ БИОВЫЩЕЛАЧИВАНИЕ ОТХОДОВ ОБОГАЩЕНИЯ И ПЕЧАТНЫХ ПЛАТ.....	55
Пахомова М.Д. НАРУШЕНИЕ N-ГЛИКОЗИЛИРОВАНИЯ БЕЛКОВ У МУТАНТОВ <i>OGATAEA POLYMORPHA</i> С ДЕФЕКТНЫМ ФОСФОМАННОЗИЛИРОВАНИЕМ ПРИВОДИТ К УВЕЛИЧЕНИЮ УСТОЙЧИВОСТИ К ОРТОВАНАДАТУ	60
Салтыкова В.А. КОНСТРУИРОВАНИЕ ГАЛОТОЛЕРАНТНЫХ МЕТАНОТРОФНЫХ АССОЦИАЦИЙ ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ БИОПРОТЕИНА	64
Синельников А.В. ПЕРСПЕКТИВЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МОЛОЧНОКИСЛЫХ БАКТЕРИЙ ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ РАСТИТЕЛЬНЫХ ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ ПИЩЕВЫХ ПРОДУКТОВ.....	69
Степанова Н.В. СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ, СВЯЗАННЫХ	71

С АКТИВНОСТЬЮ РУБИСКО В ЛИСТЯХ И ПЛОДАХ ГОРОХА (<i>PISUM SATIVUM</i> L.)	71
Шевцов А.В. КОНВЕЙЕР ДЛЯ МАСШТАБНОЙ ИДЕНТИФИКАЦИИ АЛЛЕЛЬ СПЕЦИФИЧНОЙ ЭКСПРЕССИИ ПО ДАННЫМ 5'-SCRNA-SEQ НА ОСНОВЕ ИНСТРУМЕНТА NEXTFLOW	76
Багаева Д.И. РОЛЬ MSMEG_0614 В ОБЕСПЕЧЕНИИ ВЫЖИВАЕМОСТИ И УСТОЙЧИВОСТИ К ОКИСЛИТЕЛЬНОМУ СТРЕССУ ПОКОЯЩИХСЯ КЛЕТОК <i>MYCOBACTERIUM SMEGMATIS</i>	80
Володина В.Н. СРАВНЕНИЕ ТОКСИЧЕСКОЙ МОДЕЛИ РАССЕЯННОГО СКЛЕРОЗА НА МЫШАХ С РАЗЛИЧНЫМ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИМ СТАТУСОМ (SPF И NON-SPF)	84
Ефремова А.Д. ПОЛУЧЕНИЕ 5'-НУКЛЕОТИДАЗЫ ИЗ <i>LIMOSILACTOBACILLUS REUTERI</i>	89
Зайцев П.Е. ДИФФЕРЕНЦИАЦИЯ РЫХЛОЙ И ПЛОТНОЙ СОЕДИНИТЕЛЬНОЙ ТКАНИ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МРТ В АУТОПТАТАХ, СОДЕРЖАЩИХ УГЛЕРОД-УГЛЕРОДНЫЕ СКАФФОЛДЫ	92
Игнатенко А.В. БИОЛОГИЧЕСКОЕ ВОССТАНОВЛЕНИЕ ХРОМАТА ГАЛОАЛКАЛОФИЛЬНЫМИ БАКТЕРИЯМИ	96
Клюшин Г.С. ЭЛЕКТРОКАТАЛИТИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ЭКСТРЕМОФИЛЬНЫХ ЖЕЛЕЗОРЕДУКТОРОВ И ВЫДЕЛЕНИЕ НОВЫХ ЭЛЕКТРОАКТИВНЫХ БАКТЕРИЙ	102
Лайкова А.А. ИССЛЕДОВАНИЕ МЕХАНИЗМОВ СТИМУЛЯЦИИ ПРОДУКЦИИ БИОВОДОРОДА В ХОДЕ ТЕМНОВОЙ ФЕРМЕНТАЦИИ ЗА СЧЕТ ВНЕСЕНИЯ ИОНОВ Fe^{2+} И Ni^{2+}	106
Рассомахина Н.В. АНАЛИЗ ФЕНОТИПИЧЕСКИХ И ГЕНОТИПИЧЕСКИХ ОТЛИЧИЙ В СУБКЛОНАХ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК, ПОЛУЧЕННЫХ МЕТОДОМ ЛЕНТИВИРУСНОЙ ТРАНСДУКЦИИ	110
Шашин Д.С. ИДЕНТИФИКАЦИЯ БЕЛКОВ МИКОБАКТЕРИЙ, УЧАСТВУЮЩИХ В ЭКСКРЕЦИИ ПОРФИРИНОВ, КАК МИШЕНЕЙ ДЛЯ УВЕЛИЧЕНИЯ ЭФФЕКТИВНОСТИ АФДТ	115
Шехурдина С.В. ВЛИЯНИЕ КАТИОНОВ МАГНИЯ НА АКТИВНОСТЬ ПРЕСНОВОДНОГО АНАММОКС-СООБЩЕСТВА В УСЛОВИЯХ ВЫСОКОЙ СОЛЕННОСТИ	119
Ефремова К.В. БИОКОНВЕРСИЯ АГРО-ПИЩЕВЫХ ОТХОДОВ В ПРОДУКТЫ С ДОБАВЛЕННОЙ СТОИМОСТЬЮ	124
Илясов И.О. СТРУКТУРНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ АНТИТЕЛО-АНТИГЕН ДЛЯ РЯДА НЕЙТРАЛИЗУЮЩИХ ОДНОДОМЕННЫХ АНТИТЕЛ К ТЕРАПЕВТИЧЕСКИМ МИШЕНЯМ	128
Колесов Д.Э. ИССЛЕДОВАНИЕ МЕТАБОЛИЧЕСКИХ СВОЙСТВ АПОПТОЗ РЕЗИСТЕНТНЫХ КЛЕТОК СНО, ИСПОЛЬЗУЮЩИХСЯ ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ ЛИНИЙ ПРОДУЦЕНТОВ ТЕРАПЕВТИЧЕСКИХ БЕЛКОВ	132

Косякова А.И. ЭКОФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ ФИКСАЦИИ АЗОТА ГАЛОАЛКАЛОФИЛЬНЫМИ ЦИАНОБАКТЕРИЯМИ	138
Макарова А.О. ИЗУЧЕНИЕ БИОСИНТЕТИЧЕСКОГО СВРАЧИВАНИЯ БЕЛКОВ IN VIVO	143
Маркелова Е.Е. МУЛЬТИОМИКСНЫЙ АНАЛИЗ ПОПУЛЯЦИОННОЙ СПЕЦИФИЧНОСТИ ФАКТОРОВ И МЕХАНИЗМОВ ДИАБЕТА 2 ТИПА В РОССИИ.	147
Пихтерева В.А. ОСОБЕННОСТИ ДЫХАТЕЛЬНОГО МЕТАБОЛИЗМА АНАЭРОБНЫХ ПРОКАРИОТ, ТРАНСФОРМИРУЮЩИХ МИНЕРАЛЫ ЖЕЛЕЗА	151
Салова В.Д. ИЗУЧЕНИЕ ХАРАКТЕРИСТИК НОВОГО ПРЕДСТАВИТЕЛЯ ФИЛУМА <i>VERRUCOMICROBIOTA</i> , ВЫДЕЛЕННОГО ИЗ БИОРЕАКТОРА С МЕТАНОКИСЛЯЮЩИМИ МИКРООРГАНИЗМАМИ.....	155
Шайфутдинов Р.Р. РАЗРАБОТКА МЕТОДА ТРАНСФОРМАЦИИ ГАЛОАЛКАЛИФИЛЬНОЙ БАКТЕРИИ <i>THIOALKALIVIBRIO PARADOXUS</i>	161
Чепурко В.Г. ПОЛУЧЕНИЕ ПРОДУЦЕНТА БИОАНАЛОГОВОГО FC-СЛИТНОГО БЕЛКА В АПОПТОЗ-РЕЗИСТЕНТНЫХ КЛЕТКАХ СНО	166

Бубнова Анастасия Николаевна

аспирант ФИЦ Биотехнологии РАН 4 года обучения

профиль 1.5.6 Биотехнология

e-mail: an_bubnova@mail.ru

Научный руководитель

Камионская Анастасия Михайловна

кандидат биологических наук, в.н.с.,

руководитель группы биоинженерии растений



ОЦЕНКА ПОТЕНЦИАЛЬНО НОВЫХ РЕГУЛЯТОРНЫХ ЭЛЕМЕНТОВ В ГЕНОМЕ РИСА

Аннотация. В данной работе изучались промоторные последовательности первой хромосомы генома риса, предсказанные методом MAHDS [1]. Для выявления возможной транскрипционной активности вблизи предсказанных промоторов был проведён комплексный анализ: поиск генов ассоциированных с предсказанными промоторами в четырёх независимых аннотациях генома *Oryza sativa*, поиск неаннотированных транскриптов путём де-ново сборки транскриптома, определение неаннотированных сайтов старта транскрипции с использованием данных Cage-seq. Также была проведена отдельная оценка области предсказанных промоторов на доступность хроматина и анализ на наличие коровых промоторных мотивов. Результаты показали, что часть промоторов, предсказанных методом MAHDS, совпадает с аннотированными регионами и содержит ранее неописанные сайты инициации транскрипции, что подтверждает эффективность метода. В других участках выявлены коровые мотивы, указывающие на возможную промоторную природу, однако эти последовательности требуют дальнейшей экспериментальной проверки.

Ключевые слова: предсказанные промоторные последовательности, MAHDS-алгоритм, сайт старта транскрипции, аннотированные гены, de novo транскрипты, доступность хроматина, мотивы корового промотора, *Oryza sativa*.

Промоторы играют ключевую роль в регуляции транскрипции, определяя, где и когда начинается синтез РНК. Несмотря на значительный прогресс в аннотировании геномов, точная идентификация промоторных областей остаётся серьёзной задачей. Это обусловлено как высокой вариабельностью промоторных последовательностей, так и ограниченной доступностью экспериментальных данных, необходимых для подтверждения транскрипционной активности. В последние годы активно развиваются алгоритмы предсказания промоторов на основе биоинформатических подходов, в том числе метод MAHDS [1], который позволяет находить потенциальные регуляторные элементы вне известных аннотированных регионов.

В данной работе были проанализированы промоторные последовательности, предсказанные методом MAHDS на первой хромосоме генома *Oryza sativa*. Целью исследования являлась верификация их промоторной природы с использованием нескольких независимых подходов. Для оценки потенциальной транскрипционной активности за предсказанными промоторами был проведён поиск соответствующих транскриптов или сайтов старта транскрипции. Отдельное внимание было уделено анализу доступности хроматина в пределах и предсказанных регуляторных элементов на основании

данных ATAC-seq. Кроме того, для дополнительной оценки функциональности исследуемых последовательностей был выполнен поиск коровых промоторных мотивов в пределах предсказанных областей. Совокупность этих данных позволила провести многоуровневую оценку достоверности предсказаний MAHDS и выявить последовательности, обладающие признаками активных промоторов, требующих дальнейшего экспериментального подтверждения.

Для оценки транскрипционной активности за предсказанными промоторами была проведена *de novo* сборка транскриптома, что позволило идентифицировать ранее неаннотированные транскрипты вблизи исследуемых регуляторных элементов. В результате анализа было обнаружено пять транскриптов [2], расположенных на расстоянии не более 5000 пар оснований downstream от соответствующих промоторных последовательностей. Особенно примечателен один транскрипт, 5'-конец которого находится в пределах всего 82 п.о. от 3'-конца предсказанного промотора, что делает его наиболее вероятным кандидатом на регуляцию данным промотором.

Также был проведён поиск сайтов старта транскрипции путём анализа данных CAGE-seq, что позволило определить точные 5'-концы РНК-транскриптов и, соответственно, локализацию потенциальных сайтов инициации транскрипции. В результате анализа было выявлено 36 предсказанных промоторов (рис. 1), в непосредственной близости от которых располагаются потенциальные, ранее неаннотированные сайты старта транскрипции.

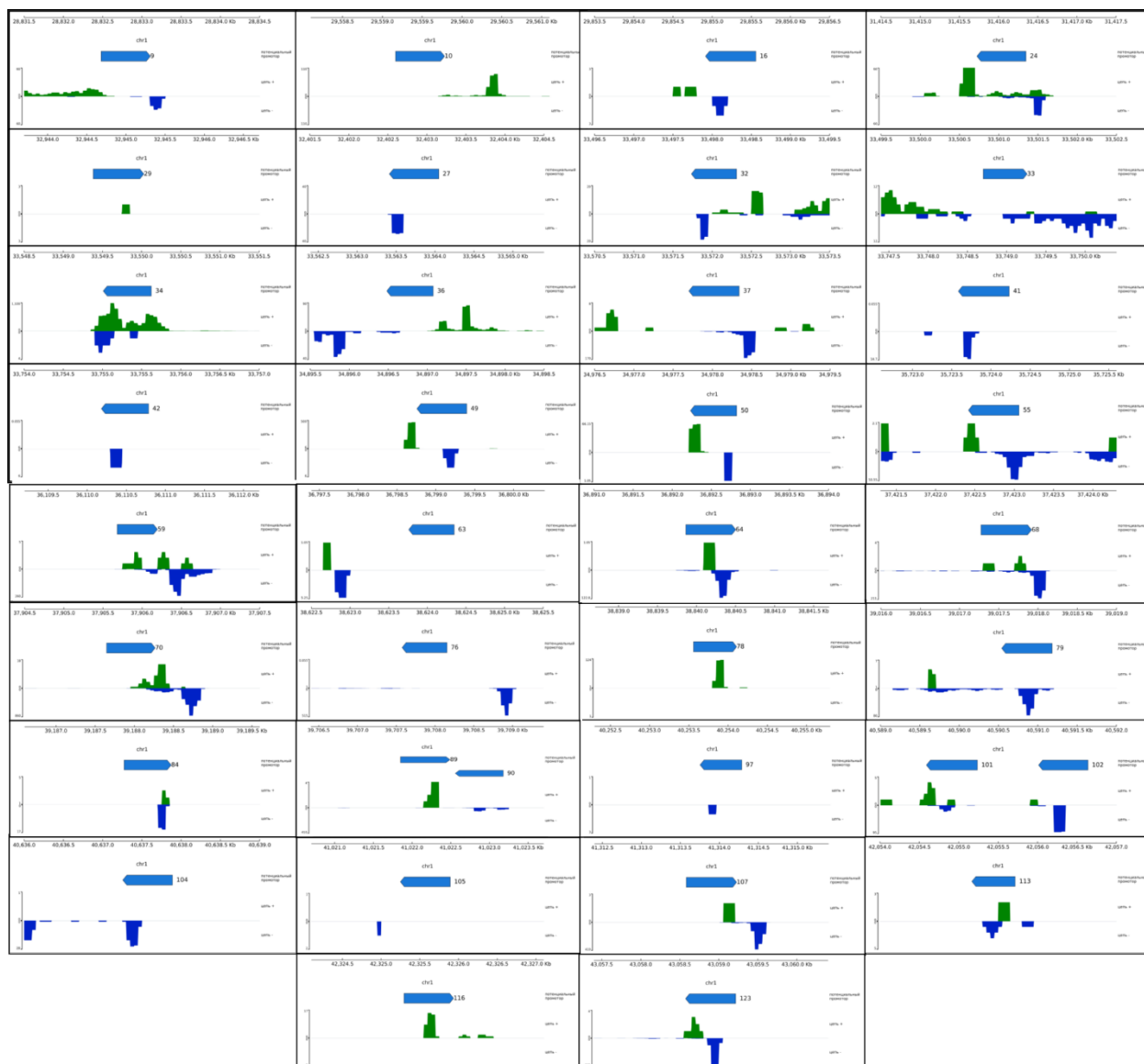


Рис. 1. Пики данных CAGE-seq, характеризующие потенциальные сайты начала транскрипции вблизи предсказанных промоторов

Также был проведён поиск аннотированных генов вблизи предсказанных промоторных последовательностей с использованием четырёх независимых аннотаций генома *Oryza sativa*: IRGSP (Ensembl Plants), RefSeq (NCBI), RAP-DB и RGAP (MSU). В результате анализа было выявлено 25 (рис. 2) предсказанных промоторов, за которыми в пределах 700 пар оснований downstream располагались аннотированные гены, из них за 11 предсказанными промоторами (номера выделены синим на рис. 2) имели также подтверждение в виде выявленных сайтов старта транскрипции при анализе CAGE-seq. Учитывая расположение предсказанных последовательностей относительно начала этих генов, можно предположить, что соответствующие предсказанные промоторы могут являться как основными сайтами инициации транскрипции, так и альтернативными промоторами, обеспечивающими разнообразие транскриптов.

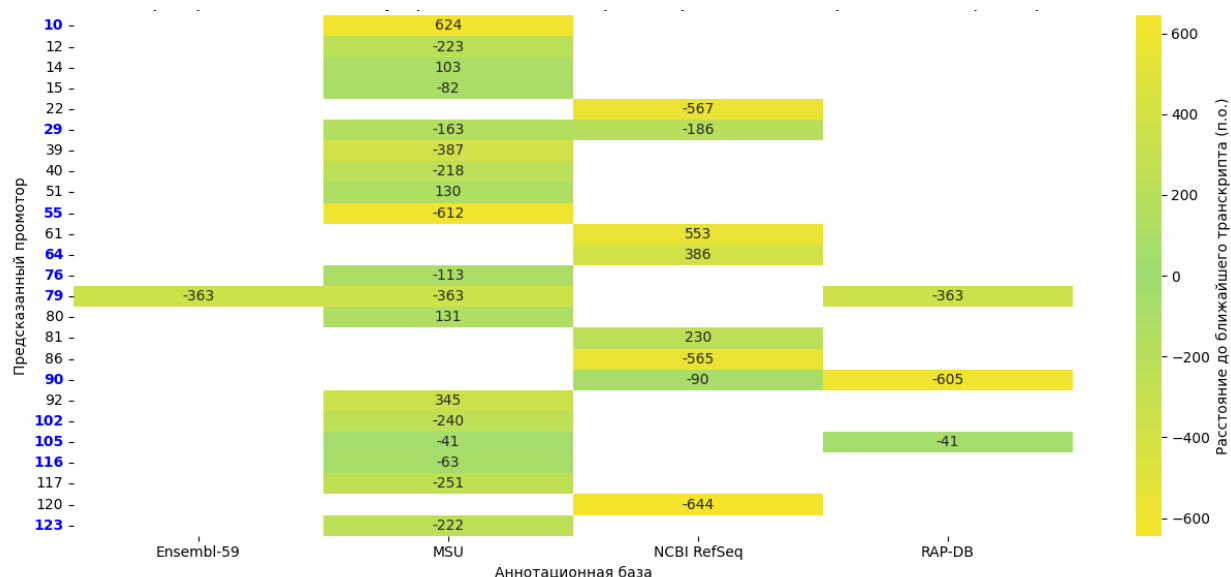


Рис. 2. Тепловая карта расстояний между предсказанными промоторами и аннотированным транскриптами.

Ещё одной стратегией проверки промоторной активности являлось изучение доступности хроматина в области предсказанных промоторных последовательностей. Для этого использовались данные ATAC-seq, позволяющие оценить степень открытости хроматиновой структуры. Данный подход позволяет определить, насколько предсказанные регуляторные участки физически доступны для связывания транскрипционных факторов, что является необходимым условием для инициации транскрипции. Обнаружение 16 предсказанных промоторов [2] в регионах с высокой хроматиновой доступностью послужило дополнительным свидетельством в пользу их функциональности как активных регуляторных элементов.

В дополнение к использованным стратегиям валидации, была проведена проверка области предсказанных промоторов на наличие характерных коровым областям промоторов мотивов. Анализ включал поиск каноничных элементов, таких как Inr, TATA, DPE, MTE и BRE. Эти мотивы являются структурными компонентами коровой области промоторов и участвуют в инициации транскрипции. Все исследуемые последовательности содержали по крайней мере один из указанных мотивов, а в ряде случаев наблюдалась их совместная локализация, что указывает на функциональную кооперацию. Такая синергичная комбинация мотивов дополнительно подтверждает промоторную природу предсказанных областей и снижает вероятность их случайной идентификации в геноме.

Проведённый комплексный анализ продемонстрировал, что метод MANDS позволяет эффективно предсказывать промоторные последовательности, часть из которых совпадает с аннотированными генами и ранее неописанными сайтами старта транскрипции. Использование независимых подходов, таких как анализ CAGE-seq, de novo сборка транскриптов, поиск аннотированных генов и оценка доступности хроматина, позволило подтвердить транскрипционную активность для ряда предсказанных регуляторных элементов.

Дополнительный анализ на наличие мотивов, характерных для коровой области промотора, показал, что все исследуемые последовательности содержат хотя бы один каноничный мотив (TATA, Inr, DPE, MTE, BRE), а в ряде случаев зафиксированы синергичные комбинации этих элементов. Именно такие комбинации могут служить

индикаторами высокой вероятности промоторной активности. Это подтверждает как чувствительность алгоритма MAHDS, так и его способность выявлять потенциально функциональные, но ранее неаннотированные промоторы.

Результаты работы указывают на высокую чувствительность метода MAHDS и его способность выявлять как известные, так и ранее неаннотированные регуляторные элементы. Тем не менее, несмотря на косвенные свидетельства активности, предсказанные промоторы требуют дальнейшей экспериментальной проверки. Это может быть реализовано, например, путём оценки уровня транскрипции соответствующих РНК методом обратной транскрипции с последующей ПЦР (RT-PCR), либо с использованием транзientной экспрессии репортёрного гена (например, GFP) под контролем исследуемого промотора.

Таким образом, алгоритм MAHDS представляет собой перспективный инструмент для функциональной аннотации генома и предсказания новых регуляторных элементов, а предложенные подходы к валидации — основу для последующего экспериментального подтверждения его результатов.

Литература

1. Korotkov E. V. et al. Mathematical Algorithm for Identification of Eukaryotic Promoter Sequences // *Symmetry*. – 2021. – V. 13. – №. 6. – P. 917.
2. 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; V. – 12. – №. 20. DOI: 10.3390/plants12203573.

Список публикаций по теме работы

Статьи

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; V. – 12. – №. 20. 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 // 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. – 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 // 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. – С. 52-52.
3. Бубнова А.Н., Гайдукова С.Е., Яковлева И.В., Камионская А.М. Идентификация потенциальных промоторных последовательностей, предсказанных методом MAHDS, путем анализа доступности хроматина и поиска неаннотированных сайтов старта транскрипции // Биоинформатика регуляции и структуры геномов / системная биология: Четырнадцатая международная мультikonференция. – 2024. – С. 1036-1038.

**ASSESSMENT OF POTENTIALLY NOVEL REGULATORY ELEMENTS IN THE
RICE GENOME**

Abstract. *In this study, promoter sequences on the first chromosome of the rice genome, predicted using the MAHDS method [1], were analyzed. To identify potential transcriptional activity near the predicted promoters, a comprehensive analysis was conducted. This included: searching for genes associated with the predicted promoters across four independent annotations of the Oryza sativa genome; identifying unannotated transcripts through de novo transcriptome assembly; and detecting unannotated transcription start sites using CAGE-seq data. Additionally, the predicted promoter regions were assessed for chromatin accessibility and analyzed for the presence of core promoter motifs. The results showed that some promoters predicted by the MAHDS method overlap with annotated regions and contain previously unreported transcription initiation sites, confirming the method's effectiveness. In other regions, core motifs were identified, suggesting potential promoter activity, though these sequences require further experimental validation.*

Keywords: *predicter promoter sequences, MAHDS algorithm, transcription start sites, annotated genes, de novo transcripts, chromatin accessibility, core promoter motifs, Oryza sativa.*

Быкова Анастасия Владимировна

аспирант ФИЦ Биотехнологии РАН 4 года обучения

профиль 1.5.6. Биотехнология

e-mail: kulakova_97@mail.ru

Научный руководитель

Кочиева Елена Зауровна

доктор биологических наук, профессор

в.н.с. лаборатории системной биологии растений



ОПРЕДЕЛЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ АНТОЦИАНОВ И ПАТТЕРНОВ ЭКСПРЕССИИ ИХ СТРУКТУРНЫХ И РЕГУЛЯТОРНЫХ ГЕНОВ В ЛИСТЬЯХ И КЛУБНЯХ *S. TUBEROSUM* ПРИ КРАТКОВРЕМЕННОМ И ДЛИТЕЛЬНОМ ХОЛОДОВОМ СТРЕССЕ

Аннотация. Холодовый стресс считается наиболее частым абиотическим стрессом растений. В межсезонье картофель обычно хранится в картофелехранилищах до 6-8 месяцев в условиях пониженных температур (+3-+8°C). Также для большей части РФ характерны кратковременные весенние возвратные заморозки, которые могут поражать листья молодых проростков картофеля. Однако исследований молекулярно-генетических изменений, которые происходят в клубнях и листьях картофеля при таком длительном и кратковременном холодовом стрессе не проводилось.

Целью работы в отчетном году стало определение паттернов экспрессии генов биосинтеза антоцианов клубнях *S. tuberosum* при долговременном (+3°C, 7 месяцев) холодовом стрессе, имитирующего хранение в картофелехранилище, а также в листьях при кратковременном (+3°C, 48 ч) холодовом стрессе, имитирующем возвратные весенние заморозки.

Проведенный биохимический анализ антоцианов в листьях зеленолистного и фиолетоволистного растений выявил увеличение содержания пигментов в листьях при кратковременном холодовом стрессе у обоих сортов картофеля, вне зависимости от исходного содержания антоцианов. Анализ транскрипции 7 генов биосинтеза антоцианов показал, что в листьях картофеля обоих сортов кратковременный холодовый стресс приводил к значительной активации транскрипции структурных (*StCHS*, *StCHI*, *StF3H*, *StDFR*) и регуляторных (*StHY5*, *StGL3*) генов пути. Выявлена корреляция между содержанием антоцианов и паттернами экспрессии генов их биосинтеза при кратковременном холодовом стрессе.

Были определены изменения содержания антоцианов и транскрипции двух генов биосинтеза антоцианов («раннего» *StCHS2* и «позднего» *StDFR*) в клубнях в динамике длительного холодового стресса (+3°C, 7 месяцев) на примере сорта Северное сияние с высоким содержанием антоцианов в клубнях.

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

Холодовый стресс считается наиболее частым абиотическим стрессом растений. Ранее проводились исследования влияния холодового стресса на экспрессию генов в клубнях картофеля. Но при этом в подавляющем большинстве экспериментов длительность

воздействия низких температур не превышало 1-3 месяцев. В условиях РФ картофель обычно хранится в картофелехранилищах до 6-8 месяцев, что определяется временем сбора клубней (сентябрь-октябрь) и посадки в следующем сезоне (апрель-май). Также для большей части РФ характерны весенние возвратные заморозки, которые также могут поражать листья молодых проростков картофеля. Однако исследований молекулярно-генетических изменений, которые происходят в клубнях и листьях картофеля при таком длительном и кратковременном холодовом стрессе не проводилось.

Ранее было показано, что при холодовом стрессе холодостойкость растения положительно коррелирует с содержанием антоцианов (Liu et al., 2020). Низкая температура стимулирует биосинтез антоцианов в листьях и экспрессию генов, регулирующих синтез антоциановых пигментов (Zhang et al., 2019). Известно, что у картофеля могут синтезироваться все шесть антоцианов и на данный момент в геноме *S.tuberosum* идентифицированы основные структурные и регуляторные гены биосинтеза (D'Amelia et al., 2020), а также определены механизмы регуляции синтеза пигментов (Liu et al., 2018; Strygina et al., 2019). Однако влияние различных стрессов на уровни биосинтеза антоцианов определены не были.

Поэтому представлялось интересным изучение изменения содержания антоцианов и экспрессии кодирующих их генов в ответ на действие холодового стресса в листьях и клубнях сортов *S.tuberosum*. Целью работы в отчетном году стало определение изменения содержания антоцианов и паттернов экспрессии генов их биосинтеза клубнях *S.tuberosum* при долговременном (+3°C, 7 месяцев) холодовом стрессе, имитирующего хранение в картофелехранилище, а также в листьях при кратковременном (+3°C, 48 ч) холодовом стрессе, имитирующем возвратные весенние заморозки.

Было интересно определить ответную реакцию генов антоцианового пути на кратковременный холодовый стресс в листьях сортов картофеля, которые отличаются окраской и, соответственно, содержанием антоцианов. Для исследования были выбраны растения сорта Леди Клэр с зеленой окраской листовой пластины и линии гибрид 1 с фиолетовой/антоциановой окраской листьев (рисунок 1).

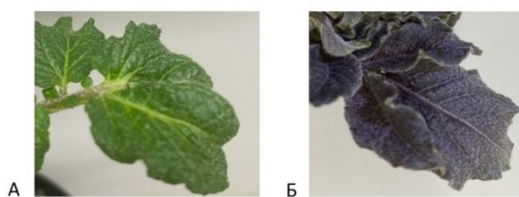


Рисунок 1 – Окраска листовой пластины растений сорта Леди Клэр (А) и гибрида 1 (Б).

Определение содержания антоцианов и выделение РНК проводили на листовых пробах сорта Леди Клэр и гибрид 1 в условиях кратковременного холодового стресса при +3°C: 'к0' (контроль при 20°C), '6h', '24h', '48h' (стресс в динамике) и 'v12' (восстановление после стресса). Биохимический анализ показал, что содержание антоцианов в листьях проростков сорта Леди Клэр увеличивалось после 6 часов холодового стресса, затем падало после 24 часов, а затем снова увеличивалось после 48 часов (рисунок 2А). Падение содержания антоцианов после 24 ч холодового стресса было не ниже контрольного уровня ('к0').

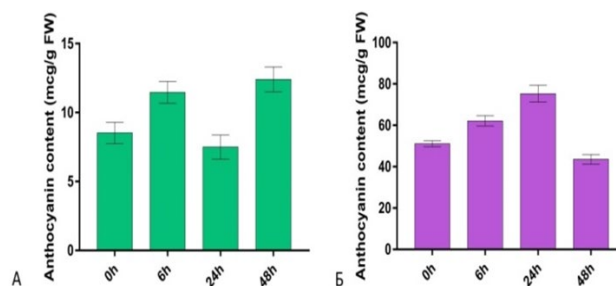


Рисунок 2 — Изменение содержания антоцианов в листьях проростков картофеля сорта Леди Клэр (А) и гибрид 1 (Б) в ответ на кратковременный холодовый стресс (+3°C). 0h-контроль (20°C), 6h, 24h, 48h-холодовый стресс.

Таким образом, под действием холодового стресса в листьях зеленолиственного сорта Леди Клэр и фиолетоволиственного гибрида 1 наблюдается увеличение содержания антоцианов, которые оказывают протекторные функции в качестве антиоксидантов, снижают осмотический потенциал клеток и защищают растения от холодового стресса.

Для характеристики паттернов экспрессии генов биосинтеза антоцианов в зеленолистных и фиолетоволистных растениях в условиях кратковременного холодового стресса были выбраны пять ключевых генов биосинтеза (*StCHS2*, *StCHI*, *StF3H*, *StDFR*, *StANS*), охватывающие весь путь метаболизма. Также в анализ были взяты гены транскрипционных факторов *StJAF13* и *StHY5*.

Анализ экспрессии в листьях сорта Леди Клэр показал, что у всех генов выявлено увеличение транскрипции при кратковременной инкубации растения при +3°C (рисунок 3). Следует отметить, что при холодовом стрессе наблюдался сходный паттерн экспрессии структурных генов *StCHS2*, *StCHI*, *StF3H* и *StDFR*: спустя 6 часов стресса уровень транскрипции всех генов повышался 2-5 раз, через 24 и 48 часов наблюдалось снижение транскрипции или достаточно резкое, как в случае *StCHS2* и *StDFR*, или плавное, как в случае *StCHI* и *StF3H* (рисунок 3). Интересно, что в случае *StDFR* значительное снижение при 24 ч сопровождается повторным увеличением экспрессии после 48 ч стресса. В восстановительный период для генов *StCHS2*, *StCHI*, *StF3H* наблюдалось значительное увеличение (в 1,5-11 раз) транскрипции в сравнении контрольным уровнем до стресса (рисунок 3). Несколько неожиданно было отсутствие достоверных изменений экспрессии гена *StANS* в ответ на холодовый стресс, так как транскрипция гена во всех анализируемых точках, включая контроль, оставалась практически неизменной.

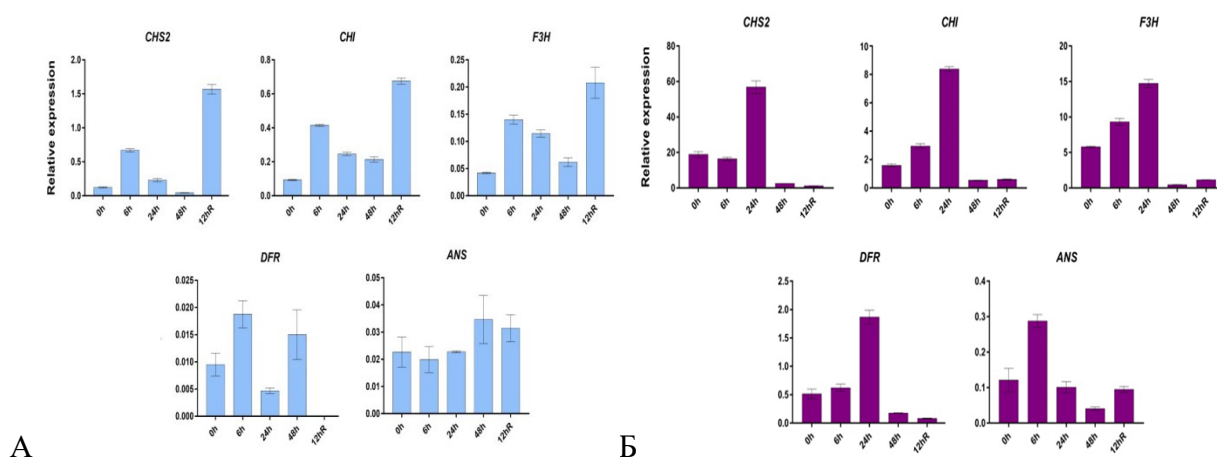


Рисунок 3 – Изменение транскрипции генов *StCHS2*, *StCHI*, *StF3H*, *StDFR* и *StANS* в листьях сорта Леди Клэр (А) и гибрид 1 (Б) в ответ на кратковременный холодовый стресс.

В случае с фиолетоволиственными растениями гибрида 1 отмечался гораздо более высокий уровень транскрипции всех анализируемых структурных генов *StCHS2*, *StCHI*, *StF3H*, *StDFR* и *StANS*, до 7,5-100 раз превышающий таковой в зеленых листьях сорта Леди Клэр даже в отсутствии стресса (рисунок 3). Это коррелировало с содержанием антоцианов в листьях, где содержание антоцианов у гибрида 1 в 10 раз превосходило их количество в листьях сорта Леди Клэр (рисунок 2). Анализ экспрессии в богатых антоцианами листьях линии гибрид 1 показал, что, также как и в случае растений Леди Клэр, у всех анализируемых генов биосинтеза антоцианов показано увеличение транскрипции при холодовом стрессе. И также как и в листьях зеленолиственного растения паттерн экспрессии структурных генов *StCHS2*, *StCHI*, *StF3H* и *StDFR* у гибрида 1 также сходен. Но, в отличие от растений Леди Клэр, где наблюдался быстрый ответ, то есть максимальное увеличение экспрессии через 6 часов стресса, в листьях гибрида 1 максимальное (в 3 раза) увеличение экспрессии наблюдается лишь через 24 часа. Паттерны транскрипции гена *StANS* отличались временем ответа, и максимум мРНК был отмечен через 6 часов стресса. Интересно, что через 48 часов стресса для всех структурных генов в листьях гибрида 1 было детектировано резкое падение уровня транскрипции, которое не сопровождалось увеличением уровней мРНК в восстановительный период.

Также помимо структурных генов в анализ было взято два гена транскрипционных факторов *StHY5* и *StJAF13*, которые считаются активаторами биосинтеза антоцианов и для которых показано участие в ответе растений на действие различных абиотических стрессоров (Jin et al., 2022; Zhan et al., 2023) (рисунок 4).

Кратковременный холодовый стресс в листьях растений с разным содержанием антоцианов приводил к изменению транскрипции регуляторных генов *StHY5* и *StJAF13*. При этом транскрипция гена *StHY5* коррелировала с профилем экспрессии структурных генов биосинтеза антоцианов: у зеленолиственного сорта Леди Клэр наблюдалось значительное повышение уровня транскрипции через 6 ч холодового стресса; которое сопровождалось резким снижением уровня транскрипции спустя 24 ч и 48 ч холодового стресса и увеличением транскрипции (11-22 раз) в восстановительный период.

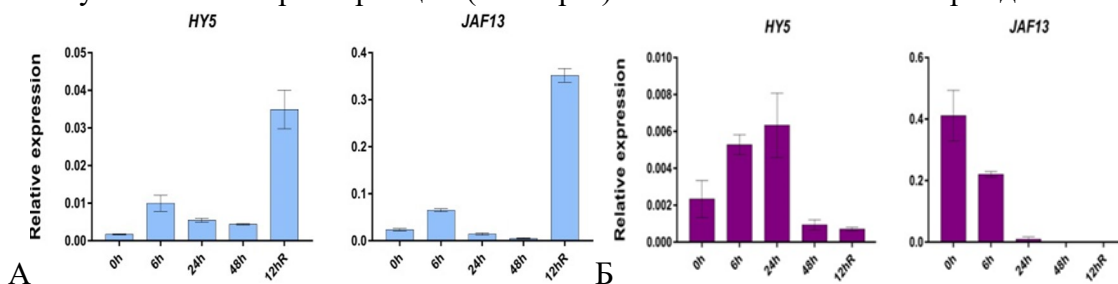


Рисунок 4 – Изменение экспрессии регуляторных генов *StHY5* и *StJAF13* биосинтеза антоцианов листьях сорта Леди Клэр (А) и гибрид 1 (Б) в ответ на кратковременный холодовый стресс (+3°C).

В случае гибрида 1 повышение транскрипции было более плавным и, как в случае структурных генов, достигало максимума через 12 часов стресса, далее с резким падением без повышения в период восстановления после стресса (рисунок 4). В случае ТФ *StJAF13* у зеленолиственного растения при холодовом стрессе полностью повторяется паттерн

структурных генов, в то время, как у фиолетоволистного наблюдается уменьшение экспрессии после 6 часов стресса и резкое падение в остальных точках (рисунок 4).

Были определены изменения транскрипции двух генов биосинтеза антоцианов – «раннего» *StCHS2* и «позднего» *StDFR* генов в клубнях в динамике длительного холодого стресса. Для анализа был взят сорт Северное сияние, характеризовавшийся высоким содержанием антоцианов в клубнях (рисунок 5).

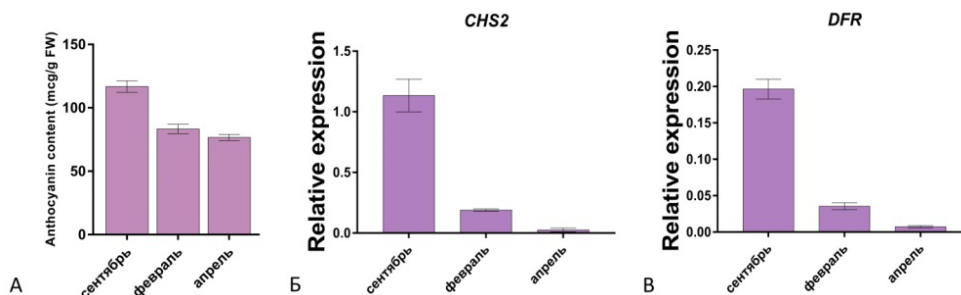


Рисунок 5 — Изменение содержания антоцианов (А) и экспрессии генов *StCHI* (Б) и *StDFR* (В) в клубнях сорта Северное сияние в ответ на длительный холодовый стресс.

Проведенный биохимический анализ содержания антоцианов в клубнях в динамике длительного холодого стресса показал, что содержание этого метаболита в клубнях сорта Северное сияние, отобранных в феврале после 3,5 месяцев инкубации при +3°C, падало (на 29%) и продолжало незначительно (на 8,4%) сокращаться после 7 месяцев стресса (рисунок 5). Как видно из рисунка 5, если содержание антоцианов в период сентябрь-февраль сократилось на треть, то экспрессия и гена *StCHS2*, и *StDFR* резко падала (в 6 раз) после 3,5 месяцев инкубации клубней при +3°C, доходя до следовых количеств после 7 месяцев холодого стресса. Полученные экспрессионные данные в целом коррелировали с данными по сокращению содержания антоцианов в клубнях сорта Северное сияние при длительном низкотемпературном хранении.

Основные выводы

Определены паттерны экспрессии генов биосинтеза антоцианов в клубнях *S. tuberosum* при долговременном (+3°C, 7 месяцев) и кратковременном (+3°C, 48 ч) холодом стрессе.

Проанализированы транскрипции семи генов биосинтеза антоцианов (структурных (*StCHS*, *StCHI*, *StF3H*, *StDFR*) и регуляторных (*StHY5*, *StGL3*) генов) в листьях картофеля сортов зеленолистной Леди Клер и фиолетоволистной линии гибрид 1 при кратковременном холодом стрессе.

Были определены изменения транскрипции двух генов биосинтеза антоцианов – «раннего» *StCHS2* и «позднего» *StDFR* генов в клубнях в динамике длительного холодого стресса на примере сорта Северное сияние.

Литература

1. Zhang Q., Zhai J., Shao L., et al. Accumulation of anthocyanins: an adaptation strategy of *Mikania micrantha* to low temperature in winter //Frontiers in Plant Science. – 2019. – Т. 10. – С. 1049.

2. Liu, B., Wang, X. Y., Cao, Y., et al. Factors affecting freezing tolerance: a comparative transcriptomics study between field and artificial cold acclimations in overwintering evergreens //The Plant Journal. – 2020. – Т. 103. – №. 6. – С. 2279-2300.
3. D'Amelia, V., Villano, C., Batelli, G., et al. Genetic and epigenetic dynamics affecting anthocyanin biosynthesis in potato cell culture //Plant Science. – 2020. – Т. 298. – С. 110597.
4. Liu, Y., Tikunov, Y., Schouten, R. E., et al. Anthocyanin biosynthesis and degradation mechanisms in Solanaceous vegetables: a review //Frontiers in chemistry. – 2018. – Т. 6. – С. 52.
5. Strygina K. V., Kochetov A. V., Khlestkina E. K. Genetic control of anthocyanin pigmentation of potato tissues //BMC genetics. – 2019. – Т. 20. – С. 35-43.

Список публикаций по теме работы

Статьи

1. Дьяченко, Е. А., Кулакова, А. В., Мелешин, А. А. и др. Ингибитор амилаз SbAI видов картофеля: вариабельность структуры и профиля экспрессии //Генетика. – 2021. – Т. 57. – №. 1. – С. 44-55.
2. Кулакова, А. В., Мелешин, А. А., Щенникова, А. В., Кочиева, Е. З. Экспрессия гена α -амилазы *StAMY23* в фотосинтезирующих и нефотосинтезирующих тканях растений у сортов картофеля *Solanum tuberosum* L. //Сельскохозяйственная биология. – 2021. – Т. 56. – №. 5. – С. 899-909.
3. Кулакова, А. В., Ефремов, Г. И., Щенникова, А. В., Кочиева, Е. З. Зависимость содержания крахмала и редуцирующих сахаров от уровня экспрессии генов β -амилаз *StBAM1* и *StBAM9* и ингибитора амилаз *StAI* при длительном низкотемпературном хранении клубней картофеля //Вавиловский журнал генетики и селекции. – 2022. – Т. 26. – №. 6. – С. 507-514.
4. Кулакова А. В., Щенникова А. В., Кочиева Е. З. Экспрессия генов биогенеза каротиноидов в процессе длительного холодового хранения клубней картофеля //Генетика. – 2023. Т. 59. – № 8. – С. 914–928.
5. Кулакова А.В., Щенникова А.В., Кочиева Е.З. Гены фитоинсинтаз (*StPSY1*, *StPSY2*, *StPSY3*) *Solanum tuberosum* L. участвуют в ответе растений картофеля на холодовой стресс //Доклады Российской академии наук. Науки о жизни. – 2024– Т 516. – С. 3-9.
6. Быкова А.В., Мелешин А.А., Щенникова А. В., Кочиева Е. З. Влияние холодового стресса на содержание антоцианов и экспрессию генов пути биосинтеза антоцианов в листьях картофеля //Генетика № 7-2025.

Тезисы

1. 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.
2. Кулакова А. В. Экспрессия гена сахарозсинтазы *SUS/SS16* у сортов картофеля в процессе длительного низкотемпературного хранения клубней //Сборник тезисов 26- ой Пушкинской школы-конференции молодых ученых с международным участием «Биология-наука XXI века» — Пушкино, 2023, С. 39-40.

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. — С. 140.

4. Кулакова А.В. Профиль экспрессии генов биосинтеза антоцианов в клубнях сортов картофеля *Solanum tuberosum*, контрастных по окраске клубней //Международный Конгресс «VIII Съезд Вавиловского общества генетиков и селекционеров, посвященный 300-летию российской науки и высшей школы», — Саратов, 2024, С. 644.

5. Быкова А.В. Изменение экспрессии генов биосинтеза антоцианов в листьях растений *Solanum tuberosum* при кратковременном холодовом стрессе //Сборник тезисов 28- ой Пущинской школы-конференции молодых ученых с международным участием «Биология-наука XXI века» — Пущино, 2025.

6. Быкова А.В., Е.З. Кочиева, А.В. Щенникова. Транскриптомный профайлинг клубней картофеля в динамике длительного холодового хранения //VIII Международная научная конференция «Генетика, геномика, биоинформатика и биотехнология растений» — Новосибирск, 2025.

Bykova Anastasia Vladimirovna
RESEARCH CENTRE OF BIOTECHNOLOGY RAS

**DETERMINATION OF ANTHOCYANIN CONTENT AND EXPRESSION PATTERNS
OF THEIR STRUCTURAL AND REGULATORY GENES IN *S. TUBEROSUM* LEAVES
AND TUBERS UNDER SHORT-TERM AND LONG-TERM COLD STRESS**

Abstract. Cold stress is considered the most common abiotic stress of plants. In the off-season, potatoes are usually stored in potato storage facilities for up to 6-8 months at low temperatures (+3-+8°C). Also, short-term spring recurrent frosts are typical for most of the Russian Federation, which can affect the leaves of young potato sprouts. However, no studies have been conducted on the molecular genetic changes that occur in potato tubers and leaves under such long-term and short-term cold stress. The aim of the work in the reporting year was to determine the expression patterns of anthocyanin biosynthesis genes in *S. tuberosum* tubers under long-term (+3°C, 7 months) cold stress simulating storage in a potato storehouse, as well as in leaves under short-term (+3°C, 48 h) cold stress simulating recurrent spring frosts.

The conducted biochemical analysis of anthocyanins in the leaves of green-leaved and purple-leaved plants revealed an increase in the pigment content in the leaves under short-term cold stress in both potato varieties, regardless of the initial anthocyanin content. Transcription analysis of 7 anthocyanin biosynthesis genes showed that in the leaves of both potato varieties, short-term cold stress led to significant activation of the transcription of structural (*StCHS*, *StCHI*, *StF3H*, *StDFR*) and regulatory (*StHY5*, *StGL3*) genes of the pathway. A correlation was found between the anthocyanin content and the expression patterns of genes involved in their biosynthesis under short-term cold stress.

Changes in the anthocyanin content and transcription of two anthocyanin biosynthesis genes (early *StCHS2* and late *StDFR*) in tubers were determined in the dynamics of long-term cold stress (+3°C, 7 months) using the example of the Severnoye Siyanie variety with a high anthocyanin content in tubers.

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

Галлямов Артур Альбертович

аспирант ФИЦ Биотехнологии РАН 4 года обучения

профиль 1.5.3 Молекулярная биология

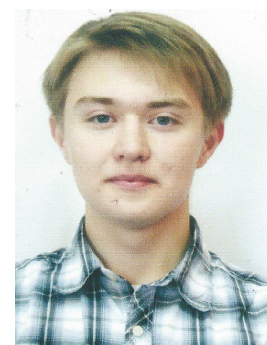
e-mail: arturens96@gmail.com

Научный руководитель

Кушников Виталий Владимирович

доктор биологических наук, в.н.с.,

зав. лабораторией молекулярной генетики



СВЯЗЬ ПЕРВИЧНОЙ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ И КОНТЕКСТА АМИЛОИДОГЕННЫХ УЧАСТКОВ С ИХ ПРИОННЫМИ СВОЙСТВАМИ У ДРОЖЖЕЙ *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*

Аннотация. В работе исследовано влияние локализации прионогенных участков, а также шаперона Hsp104 на свойства и структуру дрожжевых прионов. Ранее в нашей лаборатории картирование множества прионных структур белка Sup35 показало, что все они включают N-конец, а у белка Rnq1 – C-конец. Мы добавляли к N-концу Sup35 последовательности различной длины (от 1 до 29) и степени амилоидогенности. Путём картирования прионных структур полученных конструкций, показано, что терминальное расположение QN-богатых участков способствует формированию ими прионной структуры, хотя и не является достаточным условием. Также были сконструированы укороченные с карбоксильного конца варианты белка Rnq1, прионные структуры которых были сопоставлены методом протеазного картирования в двух штаммах $[RNQ^+]$. Результаты также указывают на предпочтительное формирование прионной укладки в терминальных участках. Согласно литературным данным, в отсутствие Hsp104 в клетках млекопитающих N-концевой участок белка Sup35 не участвует в формировании прионной структуры. Недавно нами были получены прионы мутантного Sup35, способные поддерживаться в клетках дрожжей, лишённых Hsp104. Проведение экспериментов с дрожжевыми $\Delta hsp104$ -штаммами позволит установить, в какой степени присутствие Hsp104 критично для реализации прионных структур в терминальном расположении.

Ключевые слова: дрожжевой прион, амилоид, прионогенный домен, Rnq1, Sup35, Hsp104, масс-спектрометрия, флуоресцентная микроскопия.

Прионы дрожжей служат модельной системой для изучения молекулярных механизмов амилоидогенеза. Прионные свойства, как правило, определяются наличием в белке прионного домена, обогащённого остатками глутамина и аспарагина (QN), обладающего способностью образовывать кросс- β -структуру. Часто такие домены локализованы в терминальных областях белка, и это расположение, как показали наши исследования, играет важную роль в прионогенезе [1].

Мы исследовали влияние терминального расположения на формирование прионных структур с использованием белков Sup35 и Rnq1. Sup35 (eRF3) – фактор терминации трансляции, образующий прион $[PSI^+]$ [2,3]. Ранее в нашей лаборатории картирование множества вариантов прионных структур белка Sup35 показало, что все они включают N-конец. В ходе выполнения этой работы его прионный N-домен был модифицирован путём добавления коротких прионогенных или случайных последовательностей к его N-концу,

что делало исходный прионный домен внутренним. В результате амилоидная структура чаще формировалась в добавленных последовательностях, а исходная прионная структура исчезала или модифицировалась. Даже небольшие вставки вблизи N-конца Sup35 (1-5 остатков) приводили к дестабилизации и потере приона, подчёркивая чувствительность Sup35 к сдвигу прионного домена. Картирование прионных структур методом частичного протеолиза с последующей MALDI-спектрометрией подтвердило смещение или исчезновение амилоидных участков. При исследовании других дрожжевых прионов, включая Mot3, Swi1, Lsb2, а также предполагаемых прионных белков Asm4, Nsp1, Cbk1 и Ybr16, было установлено, что прионные домены преимущественно локализируются в терминальных участках полипептидной цепи, тогда как их расположение во внутренних регионах последовательности встречается реже.

Белок Rnq1, образующий прион $[RNQ^+]$, имеет большую C-концевую QN-богатую область (остатки 153-405), которую традиционно рассматривают как прионный домен [4,5,6]. Однако ранее в нашей лаборатории было показано, что в амилоидную структуру входят преимущественно последние 40 аминокислотных остатков, несмотря на наличие значительного QN-богатого участка. Используя CRISPR/Cas9, были получены штаммы *S. cerevisiae*, в которых Rnq1 имел C-концевые укорочения [7]. При укорочении Rnq1 до 392-го остатка прион сохранялся, но при более сильных усечениях – исчезал. Однако в отличие от Sup35 при укорочении до 50 остатков Rnq1 оставался способным образовывать прион *de novo*. Дополнительно, присоединение GFP к C-концу Rnq1 нарушало формирование терминальной прионной структуры и приводило к потере $[RNQ^+]$. Гибриды Rnq1-GFP и GFP-Rnq1 демонстрировали существенно отличающиеся паттерны агрегации, а при сверхпродукции GFP-конъюгатов были получены агрегаты без терминального протеазоустойчивого участка. Это подчёркивает высокую чувствительность $[RNQ^+]$ к изменениям на C-конце белка и указывает, что использование Rnq1-GFP не является адекватным инструментом для изучения прионных свойств.

На данный момент известно, что все прионы дрожжей зависят от Hsp104. Однако в этой работе был получен ряд рандомизированных вариантов Sup35, которые могут формировать прионные состояния даже в отсутствие шаперона Hsp104. В то время как Sup35 дикого типа не образует $[PSI^+]$ без Hsp104 [8,9,10], некоторые варианты Sup35 с изменённым прионным доменом способны образовывать прионы. Наблюдение с помощью флуоресцентной микроскопии агрегации мутантных гибридов Sup35-GFP подтвердило наличие прионного состояния. Это открывает путь к изучению механизмов поддержания прионов в отсутствие Hsp104. Согласно литературным данным, в клетках млекопитающих N-концевой участок белка Sup35 не вовлечён в формирование прионной структуры [11], что контрастирует с дрожжевыми клетками, где именно N-терминальный фрагмент формирует прионный домен. Полученные нами прионные формы Sup35 в $\Delta hsp104$ -штаммах позволят установить, в какой степени Hsp104 участвует в организации прионных структур в терминальном расположении.

Основные выводы. Показано, что терминальное расположение QN-богатых доменов способствует прионогенезу, но не гарантирует их образование. Протеазное картирование прионных структур было сделано для ряда дрожжевых прионных белков и белков-кандидатов в прионы, мутантов с N-концевыми присоединениями Sup35 и C-концевых укорочений Rnq1. Замены N-конца Sup35 или присоединение к нему коротких прионогенных и случайных последовательностей приводили к исчезновению или

перестройке прионной структуры. Короткие вставки пролинов или аргининов приводили к похожему результату. Аналогично, С-концевое присоединение GFP к Rnq1 нарушало формирование карбоксиконцевой прионной структуры. Замена полноразмерного Rnq1 на укороченные конструкции приводила к потере приона. Показано также, что в отсутствие Hsp104 некоторые мутантные варианты Sup35 сохраняют способность к прионогенезу. Будущие исследования будут направлены на определение физических свойств этих агрегатов и уточнение их структурной организации. Таким образом, полученные данные подтверждают: как сама первичная последовательность, так и её контекстное положение в белке существенно влияют на способность амилоидогенных участков образовывать прионные структуры у дрожжей.

Литература

1. Galliamov A. A. et al. On the Significance of the Terminal Location of Prion-Forming Regions of Yeast Proteins //International Journal of Molecular Sciences. – 2025. – Т. 26. – №. 4. – С. 1637.
2. Wickner R. B. [URE3] as an altered URE2 protein: evidence for a prion analog in *Saccharomyces cerevisiae* //Science. – 1994. – Т. 264. – №. 5158. – С. 566-569.
3. Ter-Avanesyan M. D. et al. The SUP35 omnipotent suppressor gene is involved in the maintenance of the non-Mendelian determinant [psi+] in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* //Genetics. – 1994. – Т. 137. – №. 3. – С. 671-676.
4. Sondheimer N., Lindquist S. Rnq1: an epigenetic modifier of protein function in yeast //Molecular cell. – 2000. – Т. 5. – №. 1. – С. 163-172.
5. 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.
6. 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.
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. Wickner R. B. et al. Prion diseases of yeast: amyloid structure and biology //Seminars in cell & developmental biology. – Academic Press, 2011. – Т. 22. – №. 5. – С. 469-475.
9. Kushnirov V. V., Ter-Avanesyan M. D. Structure and replication of yeast prions //Cell. – 1998. – Т. 94. – №. 1. – С. 13-16.
10. Chakravarty A. K. et al. A non-amyloid prion particle that activates a heritable gene expression program //Molecular cell. – 2020. – Т. 77. – №. 2. – С. 251-265. e9.
11. Krammer C. et al. The yeast Sup35NM domain propagates as a prion in mammalian cells //Proceedings of the National Academy of Sciences. – 2009. – Т. 106. – №. 2. – С. 462-467.

Список публикаций по теме работы

Статьи

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.

2. Galliamov A. A. et al. On the Significance of the Terminal Location of Prion-Forming Regions of Yeast Proteins //International Journal of Molecular Sciences. – 2025. – Т. 26. – №. 4. – С. 1637.

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).

2. Галлямов А. А., Малухина А. Д., Кушников В. В. Картирование протеазоустойчивых структур дрожжевого приона Rnq1 // Сборник тезисов 28-й Пушкинской школы-конференции молодых ученых с международным участием «БИОЛОГИЯ – НАУКА XXI ВЕКА». Пушкино: ФИЦ ПНЦБИ РАН, 2025. – 668 с. – С. 27-27. (устный доклад)

3. Галлямов А. А., Ураков В. Н., Дергалёв А. А., Кушников В. В. Значение для свойств и структуры прионов терминального расположения прионогенных участков дрожжевых белков // Биосистемы: организация, поведение, управление: Тезисы докладов 78-й Международной школы-конференции молодых ученых (Н. Новгород, 14–18 апреля 2025 г.). Нижний Новгород, Университет Лобачевского. 2025. (устный доклад)

Galliamov Artur Albertovich
RESEARCH CENTER OF BIOTECHNOLOGY RAS

**RELATIONSHIP BETWEEN THE PRIMARY SEQUENCE AND STRUCTURAL
CONTEXT OF AMYLOIDOGENIC REGIONS AND THEIR PRION PROPERTIES IN
*SACCHAROMYCES CEREVISIAE***

Abstract. *This study investigates the effect of prionogenic region localisation on the properties of yeast prions, as well as the role of the chaperone Hsp104 in facilitating terminal positioning of the prion fold. Prion structures of several yeast prion proteins were mapped, and Sup35 mutants bearing prionogenic or random sequences at the N-terminus were analyzed. These experiments demonstrated that while terminal positioning of QN-rich regions promotes prion fold formation, it is sufficient on its own. Additionally, C-terminally truncated variants of the Rnq1 protein were constructed, and their prion folds were compared using protease mapping in two [RNQ⁺] strains. The results suggest a preference for prion fold formation in terminal regions. However, literature data indicate that in mammalian cells lacking Hsp104, the N-terminal region of Sup35 does not participate in prion structure formation. We recently obtained mutant Sup35 prions capable of propagation in Δhsp104 yeast cells. Ongoing experiments with these strains will help determine the extent to which Hsp104 is essential for terminally localized prion fold formation.*

Keywords: *yeast prion, amyloid, prionogenic domain, Rnq1, Sup35, Hsp104, mass spectroscopy, fluorescence microscopy.*

Галуза Олеся Александровна

аспирант ФИЦ Биотехнологии РАН 4 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



ДЛИТЕЛЬНОЕ ВЫЖИВАНИЕ БАКТЕРИЙ В ГЕЛЯХ: ФОРМЫ И БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИЙ ПОТЕНЦИАЛ

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 и форм выживания и стрессоустойчивости иммобилизованных клеток. В работе представлены результаты исследования механизмов и форм длительного выживания молочнокислых бактерий при иммобилизации в различные гели — органические (желатиновые и камедевые), а также гель смешанного состава, силанольно-гуматный (СГГ). Показано, что длительное выживание бактерий, иммобилизованных в гелях, обеспечивается их переходом в гипометаболическое состояние, использованием органических кислот (в случае силанольно-гуматного геля) как источника энергии и замедлением процессов автолиза (благодаря пространственному разобщению клеток в матрице геля), переходом части популяции в покоящееся состояние, формированием биоплёночного фенотипа. Установлено, что СГГ эффективно защищает клетки МКБ от неблагоприятных факторов окружающей среды при хранении и улучшает их пробиотические свойства. Разработанный метод иммобилизации МКБ в СГГ позволяет значительно продлить срок их хранения при комнатной температуре и сохранить технологические характеристики для производства кисломолочных продуктов.*

Ключевые слова: *молочнокислые бактерии, силанольно-гуматные гели, выживаемость бактерий, механизмы и формы, биопрепараты, пробиотики.*

Молочнокислые бактерии (МКБ) — распространённая группа пробиотических микроорганизмов, играющих важную роль в микробиоме кишечника человека и животных, а также участвующих в симбиотических отношениях с растениями [1]. В современных условиях при производстве и хранении биопрепаратов и продукции с МКБ наблюдается значительное снижение количества жизнеспособных клеток, что делает актуальным исследование механизмов их адаптации и разработку новых методов поддержания жизнеспособности [1]. Одним из перспективных методов сохранения жизнеспособности бактериальных клеток является их иммобилизация, особенно включение в гелевые структуры, что обеспечивает сохранение их жизнеспособности и функциональной активности (что аналогично биоплёночному фенотипу) [2]. Системы с иммобилизованными клетками распространены, однако систематических исследований механизмов выживания клеток микроорганизмов в гелях очень мало, что открывает

широкие перспективы для совершенствования технологий хранения и использования пробиотических продуктов и бактериальных препаратов [2]. Данная работа направлена на изучение механизмов длительного сохранения жизнеспособности клеток молочнокислых бактерий и модельного объекта *E. coli*, иммобилизованных в различные органические гели и новый силанольно-гуматный гель.

При использовании МКБ в качестве удобрений и средств защиты растений необходим эффективный носитель, сохраняющий их активность и схожий по составу со средой внесения. В качестве такого носителя перспективен новый силанольно-гуматный гель на основе гуматов различного происхождения, модифицированных органосиланами. Гуминовые вещества, входящие в состав геля, являются природными полиэлектrolитами, способными поддерживать жизнедеятельность бактерий [3]. Ранее было успешно продемонстрировано, что СГГ эффективно продлевает жизнеспособность иммобилизованных углеводородокисляющих бактерий, при этом легко растворяясь в воде и высвобождая биопрепарат. Использование СГГ для иммобилизации МКБ может стать решением проблемы длительного хранения пробиотических продуктов благодаря его способности сохранять жизнеспособность бактериальных клеток.

На первом этапе исследований был проведен скрининг известных способов иммобилизации клеток (иммобилизация на поверхности носителя (адсорбция) или в матрице), а также анализ влияния различных по природе гелей (органических и смешанных) и их отдельных компонентов. Было показано, что применение химических стабилизаторов, гуминовых веществ (типичных компонентов почв), повышает численность выживающих клеток в 2-3 раза. При поверхностной иммобилизации (адсорбции) на органо-силанольных или неорганических носителях (органосилан, кремнезём), численность выживающих в условиях голодания клеток повышается в 1.25-3 раза. *Иммобилизация молочнокислых бактерий в органические гели (желатиновые и камедевые) способствует сохранению титра жизнеспособных клеток в течение двух месяцев на уровне в 2.5-4 раза выше, чем в контрольном образце.* Наиболее эффективным подходом была иммобилизация клеток МКБ и *E. coli K12* в силанольно-гуматные гели (повышение численности выживающих клеток до 200 раз относительно контроля). *Таким образом, на первом этапе исследований определено, что самым эффективным способом иммобилизации клеток МКБ является иммобилизация в матрице (геле). А самым лучшим гелем для длительного хранения пробиотических культур является силанольно-гуматный гель.*

Далее было необходимо определить основные механизмы, позволяющие клеткам выживать при иммобилизации в широко применяемых, но мало изученных органических гелях (из разных камедей и желатина), а также при иммобилизации в новый, ранее неизвестный, тип геля (СГГ).

Сохранение высокого титра жизнеспособных клеток в желатиновом геле обеспечивается за счет поддержания клеток в вегетативном состоянии и их перехода на метаболизм аминокислот, что характерно для биоплёночного фенотипа. В гелях из геллановой камеди наблюдается формирование нативной биоплёнки, что связано с их низкой вязкостью (1 Па*с), позволяющей клеткам активировать гены, ответственные за синтез полисахаридного матрикса. В отличие от этого, в более вязком геле из гуаровой камеди (4-5 Па*с) не формируется истинная биоплёнка, хотя экспрессия генов биоплёночного фенотипа происходит. Важную роль играет химический состав полимеров: геллановая камедь содержит глюкозу, глюкуроновую кислоту и рамнозу, а гуаровая камедь

состоит из галактозы и маннозы. Из-за меньшей доступности галактозы и маннозы для метаболизма энтерококков в гуаровой камеди преобладают L-формы бактерий без клеточной стенки и лизированные клетки.

При иммобилизации и хранении клеток МКБ в СГГ экспериментально доказанными причинами длительного выживания являются: 1) нахождение большей части клеток в состоянии гипометаболизма и потребление ими органических кислот, что доказывается снижением их концентрации при хранении, а также выделением CO₂ в случае *E. faecium* (при этом уровень метаболизма понижен относительно растущих клеток в 1000 раз); 2) отсутствие массового автолиза клеток, что, предположительно, обусловлено «пространственной разобщённостью» клеток в геле и невозможностью создания достаточных концентраций ауторегуляторов и ферментов автолиза; 3) нахождение части клеток в состоянии покоя в виде стрессоустойчивых цистоподобных клеток, что доказывается анализом ультраструктурных особенностей строения. Также есть основания полагать, что при переносе в гель формируется альтернативный (биоплёночный) фенотип, обладающий повышенной стрессоустойчивостью. При иммобилизации модельного объекта, *E. coli* K12 в СГГ было показано, что у культуры развивается адаптивный ответ, проявляющийся в приобретении гипометаболического состояния, росте выживших клеток, а также переходе части популяции в покоящиеся формы

В заключительной части работы, раскрывающей биотехнологический потенциал применения нового разработанного геля, были исследованы защитные свойства самого геля, а также потенциальные пробиотические свойства хранившейся в нём культуры. Установлено, что СГГ эффективно защищает клетки МКБ от гибели при длительном хранении при температурах 4°C и 25°C, влажности воздуха 40, 50 и 99%, при интенсивном освещении, а также при доступе кислорода воздуха. Защитный эффект геля обусловлен главным образом тем, что в геле присутствуют гуминовые вещества, которые могут поглощать свет, а также оказывать стресс-потенцирующую и антиоксидантную активность. Выявлено, что при иммобилизации и хранении клеток энтерококка в СГГ в течение месяца улучшаются их потенциальные пробиотические свойства, а именно, увеличивается антагонистическая активность в отношении тест-штаммов *E. coli* K12, *St. aureus* ATCC 6538 и *Y. lipolytica* Y-4950. Также клетки энтерококка после длительного хранения в СГГ выживают лучше в условиях, *in vitro* имитирующих ЖКТ. При pH 1.5-2.5 выживает до 30% популяции, что на 3 порядка больше, чем в контроле. При воздействии ферментов поджелудочной железы выживает до 20-112% клеток, по сравнению со 100% летальностью контроля. При воздействии желчных кислот выживает до 30% клеток как в геле, так и в контроле.

Основные выводы:

1. Впервые успешно применены различные гели (желатиновые, камедевые и СГГ с органическими кислотами) для длительного хранения молочнокислых бактерий и *E. coli*, что позволило достичь титра жизнеспособных клеток до 100 раз выше контрольных значений.
2. Выявлено, что длительно выживающие в СГГ бактерии представляют собой смешанную популяцию, включающую метаболически активные клетки, анабиотические клетки, клетки-персистеры и клетки с биоплёночным фенотипом.

3. Определены ключевые механизмы, обеспечивающие высокую выживаемость бактерий в силанольно-гуматных гелях: нахождение клеток в гипометаболическом состоянии; использование органических кислот как источника энергии; наличие покоящихся клеток; замедление автолиза клеток из-за их разрозненного распределения в матрице геля; индукция перехода клеток в биоплёночный фенотип.

4. Разработан новый тип биопрепаратов молочнокислых бактерий на основе клеток, иммобилизованных в СГГ.

Литература

1. Thirabunyanon M. Probiotic potential of lactic acid bacteria isolated from fermented dairy milks on antiproliferation of colon cancer cells // *Biotechnol Lett.* – 2009. – Vol. 31. – P. 571-576.

2. Zur J. Metabolic Responses of Bacterial Cells to Immobilization // *Molecules.* – 2016. – Vol. 21, № 7. – P. 958-963.

3. Perminova I., Hatfield K. Hertkorn N. Use of Humic Substances to Remediate Polluted Environments: From Theory to Practice. // Dordrecht, the Netherlands: Springer Verlag. – 2005. – 506 p.

Список публикаций по теме работы

Статьи:

1. Galuza, O.A. Long-Term Survival of Bacteria in Gels / O.A. Galuza, N.E. Kovina, N.A. Korotkov, Yu.A. Nikolaev, G.I. El'-Registan // *Microbiology.* – 2023. – Vol. 92, Suppl. 1. – P. S17-S21.

2. Galuza O.A. Long-Term Survival of *Enterococcus faecium* under Varied Stabilization and Cell Immobilization Conditions // *Microbiology.* – 2024. – Vol. 93, №5. – P. 615-628.

3. Galuza O.A. New Approaches to Development of Biopreparations of Lactic Acid Bacteria // *Microbiology.* – 2024. – Vol. 93, Suppl. 1. – P. S11-S116.

4. Galuza O.A. Survival Mechanisms of Lactic Acid Bacteria Immobilized in Silanol-Humate Gels with Organic Acids // *Microbiology.* – 2025. – Vol. 94, №1. – P. 1-17.

Тезисы докладов

1. Галуза О.А., Эль-Регистан Г.И., Коротков Н. А., Николаев Ю.А. Новые подходы к созданию биопрепаратов молочнокислых бактерий // PLAMIC 2024: материалы IV Международной конференции «РАСТЕНИЯ И МИКРООРГАНИЗМЫ: BIOTEХНОЛОГИЯ БУДУЩЕГО» и III Всероссийской конференции с международным участием «Механизмы адаптации микроорганизмов к различным условиям среды обитания». Байкальск, 15-22 сентября 2024 г. / отв. ред. И.А. Тихонович. – Иркутск: Издательство ИГУ. – 2024. – С. 115-118 (тезисы и устный доклад).

2. Галуза О.А., Эль-Регистан Г.И., Коротков Н. А., Николаев Ю.А. Разработка биопрепаратов молочнокислых бактерий с длительным сроком хранения на основе гелей // Актуальные аспекты современной микробиологии. XIV молодежная школа-конференция с международным участием. Институт микробиологии им. С.Н. Виноградского, ФИЦ Биотехнологии РАН, Москва, 06–08 ноября 2024 года. – Москва, 2024. – С. 41-43 (тезисы и устный доклад).

**LONG-TERM BACTERIAL SURVIVAL IN GELS: FORMS AND
BIOTECHNOLOGICAL POTENTIAL**

Abstract. *The research in 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 and forms of survival and stress resistance of immobilized cells. The paper presents the results of a study of the mechanisms and forms of long-term survival of lactic acid bacteria during immobilization in various gels - organic (gelatin and gum), as well as a gel of mixed composition, silanol-humate (SHG). It has been shown that the long-term survival of bacteria immobilized in gels is ensured by their transition to a hypometabolic state using organic acids (in the case of silanol-humate gel) as a source of energy and by slowing down the processes of autolysis (due to the spatial separation of cells in the gel matrix), the transition of a part of the population to a resting state, and the formation of a biofilm phenotype. It has been established that the SHG effectively protects LAB cells from adverse environmental factors during storage and improves their probiotic properties. The developed method of immobilization of LAB in SHG makes it possible to significantly extend their shelf life at room temperature and preserve the technological characteristics for the production of fermented dairy products.*

Keywords: *lactic acid bacteria, food gels, silanol-humate gels, bacterial survival, biologics, probiotics.*

Жилкина Татьяна Алексеевна

аспирант ФИЦ Биотехнологии РАН 4 года обучения

профиль 1.5.6 Биотехнология

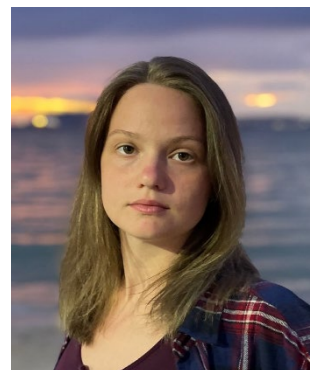
e-mail: timofeyka2033@mail.ru

Научный руководитель

Варламов Валерий Петрович

доктор химических наук, профессор

г.н.с. лаборатории инженерии биополимеров



ИЗУЧЕНИЕ СТРЕССОВЫХ РЕАКЦИЙ РАСТЕНИЙ ТОМАТА В ОТВЕТ НА ПРАЙМИРОВАНИЕ НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНЫМ ГИДРОЛИЗАТОМ ХИТОЗАНА

Аннотация. Изучение механизмов действия хитозана показало, что гидролизат хитозана действует как стимулятор роста и элиситор для растений томата, повышая их устойчивость к атакам фитопатогенов. Однако высокие концентрации (2–5 мг/мл) замедляют рост проростков и вызывают стрессовые реакции, снижая активность фермента PAL и изменяя гормональные пути. Предпосевной прайминг семян низкими дозами (0,2 мг/мл) стимулирует рост, обеспечивая баланс между защитой и развитием растений. Реакция томатов на хитозан зависит от сорта и включает модуляцию иммунных и гормональных сигналов, что важно для оптимизации применения в агрономии. Полученные результаты призваны помочь понять механизмы, лежащие в основе влияния хитозана на развитие растений.

Ключевые слова: гидролизат хитозана, томат, прайминг, биотический стресс.

В последние годы биологические средства защиты растений активно внедряются в агротехнологии, в том числе для борьбы с насекомыми-вредителями и болезнями [1]. Одним из перспективных биологических соединений является хитозан - природный полиаминосахарид, получаемый из хитина, который содержится в панцирях ракообразных и экзоскелетах насекомых [2]. Хитозан представляет значительный интерес для современного сельского хозяйства благодаря своей биологической активности и экологической безопасности [3–6]. Однако применение хитозана ограничено его низкой растворимостью, что решается снижением молекулярной массы путем кислотного гидролиза [7; 8].

В данной работе было исследовано действие низкомолекулярного гидролизата хитозана, полученного методом азотнокислого гидролиза высокомолекулярного хитозана из панцирей крабов. Особое внимание было уделено изучению зависимости "доза-эффект", определению оптимальных концентраций для практического применения и анализу молекулярных механизмов взаимодействия хитозана с растениями томата.

Результаты исследований продемонстрировали выраженную фунгицидную активность хитозана в отношении трех патогенов томата: *Botrytis cinerea*, *Fusarium solani* и *Alternaria solani*. Анализы проводились как *in vitro*, так и при заражении патогенами после обработки листьев и плодов томата сорта Черри. Однако концентрации хитозана, необходимые для подавления патогенов (2–5 мг/мл), оказались токсичными для проростков томата, замедляя их рост и влияя на архитектуру корней.

Сравнительный анализ двух сортов томата подтвердил, что длительное воздействие высоких концентраций гидролизата негативно влияет на развитие проростков. В то же время предпосевной прайминг семян низкомолекулярным гидролизатом хитозана в концентрациях 0,2–5 мг/мл стимулировал рост проростков, что указывает на возможность использования хитозана в низких дозах для улучшения всхожести и начального развития растений.

Дальнейший анализ стрессовых реакций томатов на высокие концентрации хитозана выявил значительные изменения в физиологии и молекулярных процессах. Высокие дозы гидролизата хитозана снижали активность фермента фенилаланин-аммоний-лиазы (PAL) и содержание общих фенолов в корнях проростков томата трех сортов, что может быть связано со стрессовой реакцией растений на присутствие хитозана. При этом не было выявлено существенных различий в активности PAL между сортами, однако экспрессия генов *SIPAL* изменялась в генотип-специфическом паттерне.

Анализ динамики экспрессии генов показал, что обработка хитозаном модулирует гормональные сигнальные пути и функционирование апикальной меристемы. В частности, активировался путь биосинтеза жасмоновой кислоты, что подтверждает роль хитозана как элиситора иммунитета. Одновременно наблюдалось подавление биосинтеза салициловой кислоты и ауксинового ответа, что объясняет изменения в архитектуре корней, включая нарушение тропизма.

Результаты исследования подчеркивают, что реакция томатов на хитозан зависит не только от вида, но и от сорта растения. Хотя динамика изменения экспрессии большинства генов была схожей, уровни их экспрессии и соотношение с контролем варьировались. Результаты, полученные в условиях повышенных концентраций, должны помочь нашему пониманию молекулярных механизмов взаимодействия хитозана с растениями томата.

Основные выводы

Установлена эффективная концентрация низкомолекулярного гидролизата хитозана для подавления роста и вирулентности фитопатогенов на томате. Показано, что предпосевная обработка семян томата (прайминг) гидролизатом хитозана оказывает стимулирующий эффект на рост проростков томата. При этом длительное воздействие высоких концентраций на проростки вызывает изменение тропизма корней, при экспозиции более 24 часов подавляет скорость развития растений. Постоянное присутствие раствора в концентрации 5 мг/мл полностью ингибирует прорастание семян. Воздействие гидролизата хитозана на проростки томата в течение 4-48 ч снижает содержание общих фенолов и активность PAL в корнях томатов трех сортов, а экспрессия отобранных генов *SIPAL* возрастает через 4 часа в корнях анализируемых сортов. Иммуностимулирующая активность гидролизата хитозана отражается в подавлении экспрессии генов в пути биосинтеза ауксина на фоне активации сигнальных путей салициловой и жасмоновой кислот, что также отражается на изменении экспрессии генов покоящегося центра апикальной меристемы в корнях томата.

Литература

1. Krämer, W. Modern crop protection compounds / W. Krämer, Ulrich. Schirmer. – Wiley-VCH, 2007. – 1302 p..

2. Sergienko, V.I. Chitosan , Skryabin, K.G., Mikhailov, S.N., and Varlamov, V.P., Eds., Moscow: Tsentr Bioinzheneriya, Ross. Akad. Nauk, 2013. / V.I. Sergienko // Прикладная биохимия и микробиология. – 2014. – Vol. 50. – № 5. DOI: 10.7868/s0555109914050092.
3. Tarakanov, R. Biocidal and resistance-inducing effects of chitosan on phytopathogens / R. Tarakanov, B. Shagdarova, V. Varlamov, F. Dzhalilov // E3S Web of Conferences. – EDP Sciences, 2021. – Vol. 254.
4. Karpova, N. Antifungal action of chitosan in combination with fungicides in vitro and chitosan conjugate with gallic acid on tomatoes against Botrytis cinerea / N. Karpova, B. Shagdarova, A. Lunkov et al. // Biotechnology Letters. – 2021. – Vol. 43. – № 8. – P. 1565-1574. DOI: 10.1007/s10529-021-03138-6.
5. Lyalina, T. Effect of Seed Priming with Chitosan Hydrolysate on Lettuce (Lactuca sativa) Growth Parameters / T. Lyalina, B. Shagdarova, Y. Zhuikova et al. // Molecules. – 2023. – Vol. 28. – № 4. DOI: 10.3390/molecules28041915.
6. Hadrami, A. El. Chitosan in plant protection. Vol. 8 / A. El Hadrami, L.R. Adam, I. El Hadrami, F. Daayf. – MDPI AG, 2010..
7. Shagdarova, B. Investigation of the properties of N-[(2-hydroxy-3-trimethylammonium) propyl] chloride chitosan derivatives / B. Shagdarova, A. Lunkov, A. Il'ina, V. Varlamov // International Journal of Biological Macromolecules. – 2019. – Vol. 124. – P. 994-1001. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2018.11.209.
8. Schmitz, C. Conversion of chitin to defined chitosan oligomers: Current status and future prospects. Vol. 17 / C. Schmitz, L.G. Auza, D. Koberidze, et al. – 2019.

Список публикаций по теме работы

Статьи

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. Жилкина Т.А., Варламов В.П., Камионская А.М. Фенольный метаболизм проростков томата в ответ на внесение гидролизата хитозана. В сб.: 67-я Всероссийская научная конференция МФТИ. Москва, 30 марта–5 апреля 2025 г. (устный доклад).
3. 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).

4. 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

STUDY OF STRESS REACTIONS OF TOMATO PLANTS IN RESPONSE TO PRIMING WITH LOW MOLECULAR WEIGHT CHITOSAN HYDROLYSATE

Abstract. *The study of chitosan's mode of action demonstrated that chitosan hydrolysate functions as a growth stimulator and elicitor in tomato plants, enhancing their resistance to phytopathogen attacks. However, high concentrations (2–5 mg/mL) inhibit seedling growth and induce stress responses by reducing phenylalanine ammonia-lyase (PAL) enzyme activity and altering hormonal pathways. Pre-sowing seed priming with low doses (0.2 mg/mL) stimulates growth, achieving a balance between plant protection and development. The tomato response to chitosan is cultivar-dependent and involves modulation of immune and hormonal signaling pathways, which is crucial for optimizing its application in agronomy. These findings contribute to understanding the underlying mechanisms of chitosan's impact on plant development.*

Keywords: *chitosan hydrolysate, tomato, priming, biotic stress.*

Калинин Данил Сергеевич

аспирант ФИЦ Биотехнологии РАН 4 года обучения

профиль 1.5.3 Молекулярная биология

e-mail: 309163@gmail.com

Научные руководители

Федоров Алексей Николаевич

доктор биологических наук

г.н.с. лаборатории молекулярной биотехнологии

Грановский Игорь Эдуардович

кандидат биологических наук

с.н.с. лаборатории молекулярной биотехнологии



РАЗРАБОТКА МОДЕЛИ ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ СПОСОБНОСТИ КОЛИЦИНА Е9 ПОДАВЛЯТЬ РЕПРОДУКЦИЮ ВИРУСА АЧС В КУЛЬТУРЕ КЛЕТОК ЖИВОТНЫХ

Аннотация. Работа направлена на исследование возможности использования неспецифической нуклеазы колицина Е9 для нарушения репликации вируса африканской чумы свиней в культуре клеток млекопитающих. Было показано, что экспрессия ДНКазы Е9 в присутствии белка иммунитета Im9 не токсична для культуры клеток линии VERO. В работе описан эффективный метод получения вирусной протеазы рS273R и простой количественный метод определения ДНКазной активности. Проведены моделирование и конструирование модифицированных белков иммунитета, содержащих сайт вирусной протеазы в различных положениях белковой молекулы. В результате был отобран белок иммунитета, Im9-1.4, который не только эффективно ингибирует активность ДНКазы Е9, но и утрачивает свои ингибирующие свойства после протеолитического расщепления. Инкубация комплекса ДНКазы Е9/Im9-1.4 с протеазой рS273R сопровождается расщеплением белка иммунитета и высвобождением нуклеазной активности *in vitro*.

Ключевые слова: вирус АЧС, протеаза рS273R, колицин Е9, белок иммунитета Im9.

Данная работа направлена на разработку новых подходов к приданию сельскохозяйственным животным устойчивости к вирусам, наносящим значительный экономический ущерб и потенциально опасным для человека. Исследование проводится на модели вируса африканской чумы свиней. Настоящее исследование направлено на разработку комплекса ДНКазного домена колицина Е9 и модифицированного белка иммунитета Im9, активируемого протеазой рS273R вируса АЧС. Модификация белка иммунитета заключается в введении в его последовательность сайта протеазы рS273R, расщепление которого приводило бы к высвобождению нуклеазной активности. Для достижения поставленной цели был разработан эффективный способ наработки протеазы рS273R вируса АЧС в клетках *E. coli* путем ее слияния с шапероном SlyD, а также предложена простая схема очистки фермента и детекции его активности. Показано, что сконструированный субстрат на основе EGFP, эффективно и селективно расщепляется протеазой вируса АЧС рS273R даже в сложных белковых смесях, таких как лизаты клеток млекопитающих. В работе предложено два метода количественной оценки неспецифической ДНКазной активности. Один из методов основан на гидролизе ДНК в присутствии интеркалирующего красителя Eva Green, другой – на использовании

молекулярного бикон с флюорофором и гасителем. Была исследована возможность экспрессии ДНКазного домена колицина E9 (ДНКазы E9) в клетках млекопитающих. Для этого были получены генетические конструкции для экспрессии ДНКазы E9 в клетках млекопитающих с сигналами локализации в различных компартментах клетки. В двух конструкциях кодируемая ДНКазы была слита либо с сигнальным пептидом и сигналом удержания в ЭПР для локализации белка в люмене ЭПР, либо с трансмембранным доменом гемоксигеназы 1 для закоривания белка на цитоплазматической поверхности ЭПР. Однако клетки VERO и HEK-293T, которые экспрессировали ДНКазу E9 без естественного ингибитора, были либо нестабильны, либо нежизнеспособны. Совместная же экспрессия ДНКазы E9 с белком иммунитета Im9, слитого с сигналом ядерной локализации, позволила получить стабильные клеточные линии VERO. Это демонстрирует способность белка иммунитета защищать клетки млекопитающих от токсического действия ДНКазы E9. Вариант локализации ДНКазы E9 на внешней стороне мембраны ЭПР совместно с белком иммунитета, имеющем ядерную локализацию, является оптимальным. Проведены моделирование и конструирование модифицированных белков иммунитета, содержащих сайт вирусной протеазы в различных положениях белковой молекулы. Установлено, что петля P56 – D62 наиболее подходит для встраивания сайта протеазы pS273R. Первоначально были отобраны модифицированные белки иммунитета, которые имеют физико-химические свойства (CD-спектр, температура плавления, константа диссоциации с ДНКазой E9), сходные с природным Im9. Была проведена оптимизация сайта протеазы pS273R в модифицированном белке иммунитета для повышения его доступности протеазе за счет большей конформационной гибкости и экспонированности на поверхности комплекса. В результате был отобран белок иммунитета Im9-1.4, который не только эффективно ингибирует активность ДНКазы E9, но и утрачивает свои ингибирующие свойства после протеолитического расщепления. Инкубация комплекса ДНКазы E9/Im9-1.4 с протеазой pS273R сопровождается расщеплением белка иммунитета и высвобождением нуклеазной активности *in vitro*. Сконструированный нами белковый модуль, состоящий из токсина и нейтрализующего его белка, чувствительного к вирус-кодируемой протеазе, может послужить прототипом новых синтетических вирусных рестрикционных факторов при разработке подходов к получению животных, генетически устойчивых к определенным вирусным инфекциям.

Основные выводы

Показана принципиальная возможность применения системы ДНКазы E9/Im9 в клетках млекопитающих. Разработан как эффективный метод получения вирусной протеазы, так и простой количественный метод определения ДНКазной активности. В работе продемонстрирована возможность конструирования белка иммунитета Im9, который содержит сайт протеазы pS273R вируса АЧС и сохраняет способность формировать стабильный комплекс с ДНКазным доменом колицина E9 (ДНКазы E9) и ингибировать его активность. При этом он способен расщепляться вирусной протеазой в составе комплекса и высвобождать нуклеазную активность. Сконструированный в данной работе белковый модуль, состоящий из антивирусного фактора и нейтрализующего его белка, чувствительного к вирус-кодируемой протеазе, может послужить прототипом новых синтетических вирусных рестрикционных факторов, адаптация вирусов к которым будет затруднительной.

Список публикаций по теме работы

Статьи

1. Калинин Д.С., Евтехова П.В., Малаев Л.Г., Еремина М.А., Майоров С.Г., Шляпников М.Г., Грановский И.Э. Метод определения ДНКазной активности в присутствии интеркалирующего красителя Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова. 2023. Т. 19. № 2. С. 54-61.

2. Danil S Kalinin, Sergey G Mayorov, Marina Yu Zemskova, Oleg R Latypov, Michael G Shlyapnikov, Maria A Gorshkova, Eva N Titova, Natalia N Vlasova, Alexey V Lipkin, Alexey N Fedorov, Igor E Granovsky. A method for producing protease pS273R of the African swine fever virus. December 2024, J. Virol. Methods, Volume 330, doi: 10.1016/j.jviromet.2024.115037.

F. Stetoi, Alexander V. Efimov, Andrey V. Kajava, Marina Yu. Zemskova, Alexey N. Fedorov, Igor E. Granovsky. Engineering of a complex of the DNase.

Тезисы докладов

1. Конструирование химерных белков иммунитета Im9, чувствительных к протеазе pS273R вируса африканской чумы свиней. VII Пущинская конференция «Биохимия, физиология и биосферная роль микроорганизмов» Москва, 2021. С. 151. Калинин Д.С., Ефимов А.В., Каява А.В., Шляпников М.Г., Соловьев И.Д., Грановский И.Э.

2. Способ получения протеазы pS273R вируса африканской чумы свиней. 25-я международная Пущинская школа-конференция молодых ученых «биология – наука XXI века». 2022. Калинин Д.С., Майоров С.Г., Латыпов О.Р., Грановский И.Э.

3. Метод получения протеазы pS273R вируса африканской чумы свиней. X Всероссийская Пущинская конференция «Биохимия, физиология и биосферная роль микроорганизмов». Сборник тезисов, 2024., стр. 82, УДК 579.2, ББК 28.4, ISBN 978-5-89118-894-5. DOI: 10.34756/GEOS.2023.17.39090. Калинин Д.С., Майоров С.Г., Земскова М.Ю., Латыпов О.Р., Шляпников М.Г., Горшкова М.А., Титова Е.Н., Власова Н.Н., Липкин А.В., Федоров А.Н., Грановский И.Э.

4. Метод определения ДНКазной активности в режиме реального времени. В книге: перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии. Сборник тезисов. XXXIII зимняя международная молодёжная научная школа. Москва, 2021. С. 82. Калинин Д.С., Трофимова П.В., Ерем М.А., Грановский И.Э.

5. Разработка молекулярных механизмов устойчивости к вирусным инфекциям с вовлечением вирус-кодируемых протеаз. В книге: III объединенный научный форум физиологов, биохимиков и молекулярных биологов. Материалы: VII съезд биохимиков России. X российский симпозиум «белки и пептиды». VII съезд физиологов СНГ. Москва, 2021. С. 88. Грановский И.Э., Калинин Д.С., Зражаева Д.С., Земскова М.Ю., Холод Н.С., Майоров С.Г., Латыпов О.Р., Шляпников М.Г., Ефимов А.В.

6. Конструирование белка иммунитета Im9, природного ингибитора колицина E9, инактивируемого протеазой pS273R вируса африканской чумы свиней. Сборник тезисов отчетной конференции аспирантов Федерального государственного учреждения "Федеральный исследовательский центр "Фундаментальные основы биотехнологии" Российской академии наук". Сборник тезисов. Москва, 2022. С. 11-15. Калинин Д.С.

7. Разработка модели для исследования способности колицина E9 подавлять репродукцию вируса АЧС в культуре клеток животных. Сборник тезисов отчетной конференции аспирантов Федерального государственного учреждения "Федеральный

исследовательский центр "Фундаментальные основы биотехнологии" Российской академии наук". Сборник тезисов. Москва, 2023. С. 97-101.

Основные достижения, патенты

1. 2 место в конкурсе научно-исследовательских работ студентов и аспирантов российских вузов «Science of the future».
2. 3 место на Школе-конференции для молодых ученых, аспирантов и студентов «Генетические технологии в микробиологии и микробное разнообразие», VII Пущинская конференция.
3. Патент (Способ получения каспазы-3 RU 2 792 795 C1).
4. Патент (Метод определения ДНКазной активности в режиме реального времени) № 2021138490/10(080616).

Kalinin Danil Sergeevich
RESEARCH CENTER OF BIOTECHNOLOGY RAS

OBTAINING STABLE CELL LINES PRODUCING DIFFERENT VARIANTS OF COLICIN E9 AND IMMUNITY PROTEIN Im9.

Abstract. *The aim of the work is to investigate the possibility of using the non-specific nuclease colicin E9 to disrupt the replication of the African swine fever virus in mammalian cell culture. It was shown that expression of DNase E9 in the presence of the immunity protein Im9 is not toxic to the VERO cell line culture. The work describes an effective method for obtaining the viral protease pS273R and a simple quantitative method for determining DNase activity. Modeling and construction of modified immunity proteins containing the viral protease site in various positions of the protein molecule were carried out. As a result, the immunity protein Im9-1.4 was selected, which not only effectively inhibits the activity of DNase E9, but also loses its inhibitory properties after proteolytic cleavage. Incubation of the DNase E9/Im9-1.4 complex with the pS273R protease is accompanied by cleavage of the immunity protein and the release of nuclease activity in vitro.*

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

Кузнецов Александр Сергеевич

аспирант ФИЦ Биотехнологии РАН 4 года обучения

профиль 1.5.11 Микробиология

e-mail: alexbluesking@gmail.com

Научный руководитель

Летаров Андрей Викторович

доктор биологических наук

г.н.с., зав. лабораторией вирусов микроорганизмов



ОСОБЕННОСТИ БИОЛОГИИ ЛЯМБДОИДНЫХ БАКТЕРИОФАГОВ $\phi 24B$ И λ_2B8

Аннотация. *Stx-конвертирующие бактериофаги, обуславливающие токсигенность многих штаммов *Escherichia coli*, в основном относятся к группе лямбдоидных колифагов. Показано, что фаг $\phi 24B$ избирательно инфицирует rough-варианты *E. coli*, лишенные О-антигена, в то время как лизогенизация штаммов, экспрессирующих О-антиген, происходит за счет спонтанно возникших rough-мутантов. Показано, что О-антиген экранирует конечный рецептор фага, вероятно, препятствуя адсорбции. Биоинформатический анализ генома выявил ключевые белки адсорбционного аппарата, включая белок осевой фибриллы *gp56* и белок боковых фибрилл *gp61*, а также эстеразу *gp84* и белок *gp47*, имеющий гомологию с белком эжектосомы фага T7. На основании выравнивания белков фагов обнаружено эволюционное родство подовирусов $\phi 24B$ и GP4. Оптимизирована методика, позволившая получить очищенные концентрированные препараты со значением биологического титра $\geq 10^{12}$ БОЕ/мл для дальнейших исследований. Полученные таким образом препараты фага $\phi 24B$ использовали для протеомного анализа и получения криоэлектронной реконструкции вирионов. Также проведено функциональное исследование мутантов фага $\phi 24B$ с инаktivацией генов 47, 61 и 84. Исследование адсорбции фага $\lambda_2B8J\lambda$, полученного на основе фага λ_2B8 , на клеточной поверхности разных штаммов позволяет говорить о том, что белки боковых фибрилл *Stf λ_2B8* и *gp61 $\phi 24B$* , вероятно, не участвуют в высокоаффинном связывании с *BamA*, что указывает на ведущую роль в распознавании конечного рецептора осевой фибриллы фага $\phi 24B$, образованной белком *gp56*.*

Ключевые слова: *STEC, Stx-фаги, О-антиген, rough-мутанты, фаговые гены, подовирусы, концентрирование и очистка вирусов, ультрацентрифугирование, протеомный анализ, крио-ЭМ, адсорбция фагов, RBP's.*

Большинство Stx-конвертирующих фагов, в частности, один из самых распространенных их представителей — вирус $\phi 24B$, относится к лямбдоидным колифагам и обладает мозаичными геномами [1]. Фаг $\phi 24B$ распознает высококонсервативный белок *BamA* [2], что объясняет его широкий спектр лизогенизации [3]. Однако механизмы преодоления О-антигенного барьера и белки, ответственные за адсорбцию, остаются пока не выясненными.

В ходе данной работы показали, что $\phi 24B$ эффективно инфицирует только rough-мутанты *E. coli*, лишенные О-антигена. Электрофорез ЛПС подтвердил потерю О-антигена у лизогенов. Эффективность лизогенизации rough-штаммов ($2,4 \times 10^{-3}$ КОЕ/БОЕ) была на

два порядка выше, чем у О-антиген-продуцирующих штаммов ($1,5 \times 10^{-5}$ КОЕ/БОЕ). Полногеномное секвенирование и комплементация плазмидой pWclH (рис. 1) исключили влияние профага на синтез О-антигена, подтвердив, что лизогены образуются из спонтанных rough-мутантов.

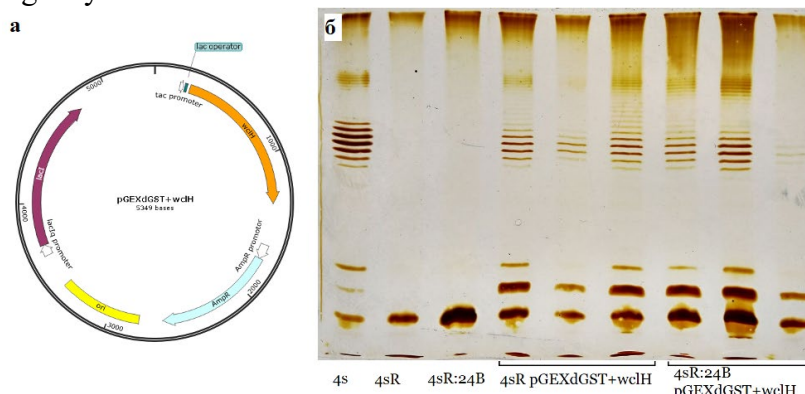


Рисунок 1. а) схема плазмидной комплементирующей конструкции pWclH; б) электрофореграмма ЛПС, подтверждающая комплементацию продукции О22-антигена плазмидой pWclH, в левую лунку в качестве положительного контроля нанесены ЛПС штамма 4s, содержащего О22-антиген; окрашивание нитратом серебра.

Исходя из биоинформатического анализа геном фага $\phi 24\Delta stx$ (GenBank: HM208303.1), выдвинуты гипотезы касательно белков, участвующих в процессе инфицирования клетки. Сравнение при помощи BLASTP белков $\phi 24\Delta$ с белками фага GP4, заражающего *Ralstonia solanacearum*, выявило гомологию некоторых структурных белков (24–33% идентичности), что подчеркивает эволюционное родство этих подовирусов и распространенность данного структурного модуля.

В ходе работы был оптимизирован и модифицирован полный цикл процедуры получения препаратов фага $\phi 24\Delta$, который позволил получить препараты фага со значением биологического титра $6,5 \times 10^{12}$ БОЕ/мл.

Полученные описанным выше способом препараты фага $\phi 24\Delta$ далее использовали для анализа структурных белков вируса, наиболее преобладающие из которых представлены главным белком капсида gr69 (44,9 кДа) и ранее не идентифицированным белком молекулярной массы ~35 кДа.

В результате масс-спектрометрического исследования полос присутствующий в большом количестве белок массой ~35 кДа был идентифицирован как N-концевая часть белка gr84. Таким образом, мы показали, что gr84 в процессированной форме, которая образуется за счет автопротеолиза [4], присутствует в вирионе. Результаты электрофореза показали, что в смеси белков из свежеприготовленного препарата содержится полипептид молекулярной массы около 70 кДа, что соответствует теоретически рассчитанной массе для полноразмерного белка gr84 (68,6 кДа) и практически отсутствует полоса, соответствующая процессированной форме массы ~35 кДа, в то время как в препарате более длительного хранения наблюдали обратную ситуацию — отсутствие полноразмерного белка, и наличие полосы массы ~35 кДа (рис. 2).

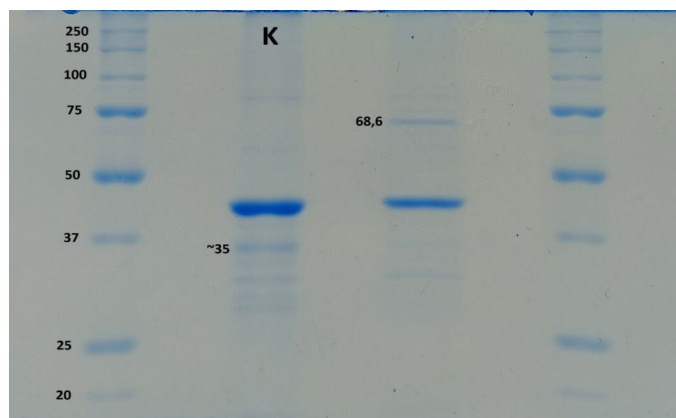


Рисунок 2. Электрофореграмма тотального белка из препарата длительного хранения («К») и свежеприготовленного препарата (правая часть), в боковые лунки нанесен белковый маркер. Окрашивание Coomassie Brilliant Blue G-250.

Для более детального анализа структуры вирионов с применением криоэлектронной микроскопии получили набор данных, на основании которых создана предварительная трехмерная реконструкция частиц фага $\phi 24B$.

Далее мы получили трех мутантов фага $\phi 24B$ с инактивированными генами 47, 61 и 84, соответственно. Не было выявлено значительной разницы в числе образовавшихся бляшек между полученными параллельно лизатами немутантного $\phi 24B$ и мутанта $\phi 24B\Delta 84$. В то же время, мы показали, что инактивация генов 61 и 47 приводит к полной потере вирусом инфекционности.

В целях изучения свойств фаговых RBPс получили разнообразные плазмидные генетические конструкции, однако белковые продукты экспрессии этих генов оказывались в тельцах включения. Для решения проблемы растворимости белка получили конструкции для коэкспрессии RBPс со вспомогательными белками pRSF-Duet(57+56) и pRSF-Duet(61+59).

Наконец, для исследования взаимодействия $gr61\phi 24B$ с VamA был получен рекомбинантный бактериофаг λ_{2B8} , имеющий осевую фибриллу фага λ и боковые фибриллы, сходные с боковыми фибриллами фага $\phi 24B$. Полученный модельный бактериофаг использовали для построения кривых адсорбции на штаммах с разными вариантами белка VamA (рис. 3). Данные кривые не отражают значительного различия в адсорбционной способности этого фага на штаммах с разными вариантами VamA.

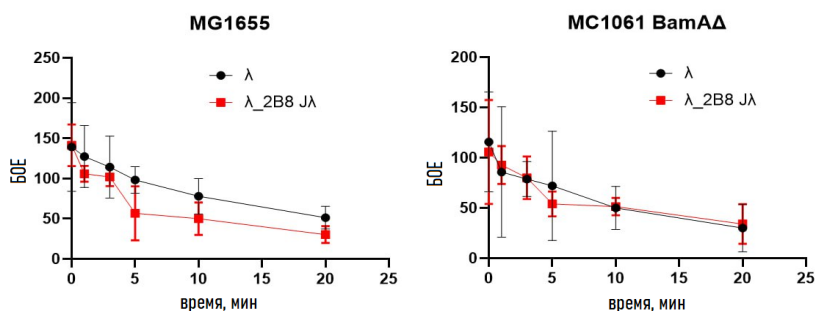


Рисунок 3. Кривые адсорбции фагов λ и $\lambda_{2B8J\lambda}$ на поверхности штаммов *E. coli* MG1655 и MC1061 VamAΔ; значения констант адсорбции для фага λ – $8,25 \times 10^{-11}$ мл/мин (MG1655) и $9,01 \times 10^{-11}$ мл/мин (MC1061 VamAΔ), для фага $\lambda_{2B8J\lambda}$ – $3,98 \times 10^{-10}$ мл/мин (MG1655) и $8,50 \times 10^{-11}$ (MC1061 VamAΔ).

Основные выводы

Бактериофаг ϕ 24В заражает широкий спектр rough-штаммов *E. coli*, при этом наличие полноразмерного О-антигена на поверхности использованных штаммов *in vitro* подавляет инфекцию этим фагом. Биоинформатический анализ генов и белков фагов ϕ 24В и λ _2В8 предсказывает множество интересных особенностей биологии этих лямбдоидных фагов. Благодаря оптимизации методики получения препаратов фага ϕ 24В впервые был исследован его протеом. Показано, что эстераза gr84 является структурным белком фага ϕ 24В, что означает возможное участие этого белка в процессе инфицирования клетки этим вирусом. Рекомбинантные RBPs фага ϕ 24В оказались нерастворимы, в связи с чем разработана новая система коэкспрессии RBPs с вспомогательными белками. На основании кривых адсорбции фага λ _2В8J λ на поверхности клеток *E. coli* с разными вариантами белка BamA мы предполагаем, что боковые фибриллы лямбдоидов ϕ 24В и λ _2В8 не способны к высокоаффинному связыванию бактериального белка BamA в составе внешней мембраны клетки.

Литература

1. Smith D. L. *et al.* Comparative genomics of Shiga toxin encoding bacteriophages // BMC genomics. 2012. Т. 13. С. 1–10.
2. Smith D. L. *et al.* Multilocus characterization scheme for shiga toxin-encoding bacteriophages // Appl Environ Microbiol. 2007. Т. 73. № 24. С. 8032–8040.
3. Golomidova A. K. *et al.* O antigen restricts lysogenization of non-O157 *Escherichia coli* strains by Stx-converting bacteriophage phi24B // Sci Rep. 2021. Т. 11. № 1. С. 3035.
4. 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.

Список публикаций по теме работы

Статьи

1. Кузнецов А.С., Моисеенко А.В., Куликов Е.Е., Летаров А.В. Изучение трехмерной структуры вириона Stx-конвертирующего бактериофага ϕ 24В методами кроэлектронной микроскопии //Микробиология – 2024. – Т. 93. – №. 3.
2. Bubenchikov M., Zhang R., Moiseenko A., Kuznetsov A., Letarov A., Sokolova O.S. Cryo-EM Reconstruction of Tail and Capsid of Stx Bacteriophage Phi24B //Microscopy and Microanalysis – 2024. – Т. 30, Issue Supplement_1
3. Ayala R., Street M., Moissenko A., Kulikov E., Kuznetsov A. Sokolova O.S., Wolf M., Letarov, A. Reconstruction of the entire RB43 bacteriophage by single particle cryo-EM //Microscopy and Microanalysis – 2023. – Т. 29, Issue Supplement_1
4. Golomidova A. K., Efimov A. D., Kulikov E. E., Kuznetsov A. S., Belalov I. S., Letarov A. V. O antigen restricts lysogenization of non-O157 *Escherichia coli* strains by Stx-converting bacteriophage phi24B //Scientific reports. – 2021. – Т. 11. – №. 1. – С. 1-9.

Тезисы докладов

1. Кузнецов А.С., Датская С.А., Моисеенко А.В., Летаров А.В. Потенциальные структуры и функции белков gr47, gr61 и gr84 Stx-фага ϕ 24В //Труды международной

конференции "Бактериофаги: от фундаментальных исследований к применению" — Новосибирск. — 2024. (устный доклад)

2. Барбашин Д.Д., Кузнецов А.С., Матюшкина Д.С., Летаров А.В. Получение рекомбинантных белков gp56, gp57, gp59, gp61 и gp84 бактериофага Ф24В //Биосистемы: организация, поведение, управление: Тезисы докладов 78-й Международной школы-конференции молодых ученых – Н. Новгород, Университет Лобачевского – 2025. (постерный доклад)

3. Кузнецов А.С., Моисеенко А.В., Матюшкина Д.С., Летаров А.В. Потенциальные роли белков gp84, gp61 и gp47 в инфекционном процессе бактериофага ф24В //Актуальные аспекты современной микробиологии: XIV молодежная школа-конференция с международным участием. Институт микробиологии им. С.Н. Виноградского, ФИЦ Биотехнологии РАН. Москва — Москва — 2024. (постерный доклад)

Alexander Sergeyevich Kuznetsov
RESEARCH CENTER OF BIOTECHNOLOGY RAS

BIOLOGICAL FEATURES OF LAMBDROID BACTERIOPHAGES ϕ 24B AND λ _2B8

Abstract. *Stx-converting bacteriophages, primarily lambdoid coliphages, confer toxicity to many Escherichia coli strains. Phage ϕ 24B in vitro infects rough (O antigen deficient) strains, while O-antigen-expressing hosts are lysogenized via spontaneous rough mutants. The O-antigen is likely to block adsorption by shielding the phage receptor. Genomic analysis identified adsorption-related proteins: axial fiber gp56, lateral fiber gp61, esterase gp84, and gp47 (homologous to T7's ejection protein). Evolutionary linkage was found between podoviruses ϕ 24B and GP4. An optimized purification protocol yielded high-titer ($\geq 10^{12}$ PFU/mL) ϕ 24B for proteomics and Cryo-EM. Functional assays on Δ 47/61/84 mutants and adsorption studies with λ _2B8J λ suggest gp56 (axial fiber), not lateral fibers, mediates high-affinity receptor binding to BamA.*

Keywords: *STEC, Stx phages, O antigen, rough mutants, phage genes, podoviruses, concentration and purification of viruses, ultracentrifugation, proteomic analysis, cryo-EM, phage adsorption, RBPs.*

Ламердонова Фатима Хасбияновна

аспирант ФИЦ Биотехнологии РАН 4 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)

Института фармации и биотехнологии (ИФиБ) Российского

университета дружбы народов имени Патриса Лумумбы



**КОЛИЧЕСТВЕННАЯ ЯМР-СПЕКТРОСКОПИЯ $^2\text{H}/^1\text{H}$ МЕТАБОЛИТОВ
РАСТЕНИЙ СЗ-ПУТИ ФОТОСИНТЕЗА НА ПРИМЕРЕ ВИНОГРАДА *VITIS*
VINIFERA L., ПРОИЗРАСТАЮЩЕГО В РАЗНЫХ ПРИРОДНО-
КЛИМАТИЧЕСКИХ УСЛОВИЯХ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ**

Аннотация. Работа посвящена изучению растительного метаболизма и изотопных эффектов легких элементов (углерода $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ и водорода $^2\text{H}/^1\text{H}$), происходящих при ассимиляции атмосферного углекислого газа в компонентах растений СЗ-пути фотосинтеза на примере винограда (*Vitis vinifera* L.), под влиянием внешних природно-климатических факторов. Полученные результаты впервые демонстрируют количественные зависимости между природно-климатическими характеристиками регионов выращивания в Российской Федерации и изотопным составом компонентов винограда и винодельческой продукции. Разработанные методы анализа $^2\text{H}(\text{D})$ -qNMR и прогностический подход к оценке происхождения вина обладают высокой прикладной ценностью для стандартизации контроля качества и подтверждения географической подлинности продукции в рамках нормативных требований Российской Федерации и Евразийского экономического союза.

Ключевые слова: изотопы, водород, дейтерий, внутриклеточная вода, углерод, органические кислоты, углеводы, виноградарство, виноделие, спектроскопия ядерного магнитного резонанса, масс-спектрометрия отношений стабильных изотопов.

Проведено комплексное исследование влияния природно-климатических условий на распределение стабильных изотопов водорода и углерода в винограде, выращенном в основных винодельческих регионах Российской Федерации. Объектом изучения стали красные и белые сорта винограда *Vitis vinifera* L., виноматериалы и модельные системы. Исследованы образцы из 4 регионов России и ряда зарубежных стран. Работа ориентирована на гипотезу о зависимости изотопного состава компонентов винограда от природно-климатических условий региона происхождения.

Основной метод исследования – количественная спектроскопия ядерного магнитного резонанса высокого разрешения ядер дейтерия ($^2\text{H}(\text{D})$ -qNMR) – применён к анализу внутриклеточной воды винограда и этанола, полученного в ходе ферментации виноградных метаболитов – глюкозы и фруктозы. Проведенные экспериментальные исследования

позволили получить новые количественные данные о распределении изотопа водорода – дейтерия $^2\text{H}(\text{D})$ в структурных группах молекул этанола, а также выявить взаимосвязь с изотопным составом внутриклеточной воды винограда, что в свою очередь создает основу для научно обоснованной идентификации продукции. Установлено, что уровень насыщения внутриклеточной воды винограда составил от 162,74 до 175,47 ppm (для Крыма, сезоны 2021-2024 гг.), от 159,86 до 172,03 ppm (Северной Осетии, Кабардино-Балкарской Республики и Ставропольского края, сезоны 2023-2024 гг.).

Полученные данные по содержанию дейтерия в воде виноматериалов позволяет провести корректировку принятой ранее минимальной границы по данному показателю в воде подлинной винодельческой продукции, которая составляла $(\text{D}/\text{H})_{\text{a}} \geq 157,0$ ppm. Новое значение для данного показателя согласно полученным результатам составляет $(\text{D}/\text{H})_{\text{a}} \geq 153,2$ ppm.

На основе сформированной в ходе исследований базы данных стало возможным установить диапазоны изменения значений изотопных показателей $(\text{D}/\text{H})_{\text{I}}$, $(\text{D}/\text{H})_{\text{II}}$ и R , характеризующих этанол виноградного происхождения для виноматериалов, изготовленных из отобранных образцов винограда из различных географических регионов России: Крым – $(\text{D}/\text{H})_{\text{I}} = 98,76\text{-}104,97$ ppm, $(\text{D}/\text{H})_{\text{II}} = 121,65\text{-}132,59$ ppm, $R = 2,41\text{-}2,64$; Ставропольский край, Северная Осетия, Кабардино-Балкарская Республика – $(\text{D}/\text{H})_{\text{I}} = 99,65\text{-}105,31$ ppm, $(\text{D}/\text{H})_{\text{II}} = 126,96\text{-}133,40$ ppm, $R = 2,43\text{-}2,62$.

Для изучения распределения изотопов углерода $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ применен метод масс-спектрометрии (IRMS/SIRA). Данным методом исследован изотопный состав углерода в углеводах и органических кислотах. Для винограда Крыма, выращенного в сезоны 2021-2024 гг., диапазон колебаний значений показателя $\delta^{13}\text{C}$ составил от -26,84 до -22,21 ‰ (для углеводов), от -26,21 до -21,82 ‰ (для органических кислот). В образцах винограда, отобранных в географических регионах Северной Осетии, Кабардино-Балкарской Республики и Ставропольского края (сезоны 2023-2024 гг.), проведенные исследования позволили впервые получить данные о диапазонах значений показателя $\delta^{13}\text{C}$, которые составили от -28,78 до -21,98 ‰ (для углеводов) и от -28,51 до -21,70 ‰ (для органических кислот).

Матрица экспериментальных данных работы была дополнена результатами анализа общих физико-химических показателей винограда и полученных виноматериалов, включая углеводы и органические кислоты, полученных в рамках комплексного исследования с применением методов рефрактометрии, титриметрии и высокоэффективной жидкостной хроматографии (HPLC).

Проведенные эксперименты с модельными системами позволили получить научные данные о механизме фракционирования дейтерия $^2\text{H}(\text{D})$ в зависимости от изотопного состава среды, а также разработать способ прогностической оценки изотопного состава в метильных и метиленовых группах молекул этанола. Математический анализ результатов исследования модельных систем, позволил разработать корреляционную зависимость между уровнем обогащения дейтерием $^2\text{H}(\text{D})$ водной среды, в которой осуществляется ферментация углеводов и распределением данного изотопа водорода в структурных группах молекул этанола как основного продукта брожения. Совокупность теоретических и экспериментальных результатов проведенных исследований позволила сформировать алгоритм идентификации винодельческой продукции.

Основные выводы

Работа представляет собой вклад в формирование научно обоснованной методологии оценки подлинности и географического происхождения винодельческой продукции с учетом аспектов изменений климата в регионах выращивания винограда. Результаты исследований имеют практическое значение для сферы подтверждения соответствия винодельческой продукции нормативным правовым требованиям, мониторинге качества.

Литература

1. International Organisation of Vine and Wine (OIV). Compendium of International Methods of Wine and Must Analysis. Edition 2025. Volume 1. Dijon: OIV Publications, 2025. – 1734 p.
2. Колеснов А. Ю., Ивлев В. А., Васильев В. Г. [и др.] Метод количественной спектроскопии ядерного магнитного резонанса qNMR для исследования воды винограда и винодельческой продукции // Виноградарство и виноделие. — 2022. — Т. 51. — С. 92–96.
3. Van Leeuwen C., Tregoeat 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.
4. 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.
5. Sun, D.-W. Modern Techniques for Food Authentication // Amsterdam, Boston, Heidelberg, London, New York, Oxford, Paris, San Diego, San Francisco, Sydney, Tokyo: Academic Press Elsevier, 2008.- P. 269-320.

Список публикаций по теме работы

Статьи

1. А.Ю.Колеснов, С.Р.Цимбалаев, Ф.Х.Ламердонова Применение высокоэффективной жидкостной хроматографии для исследования качества винодельческой продукции: современные методические подходы // Аналитика, 2021.- Т.11.- № 6.- С.458-465 (DOI: 10.22184/2227-572X.2021.11.6.458.465).
2. А.Колеснов, С.Цимбалаев, В.Ивлев, В.Васильев, Ф.Ламердонова Единый аналитический алгоритм идентификации компонентного состава винодельческой продукции // Вестник Алматинского технологического университета, 2021.- № 4.- С. 58-75 (DOI: 10.48184/2304-568X-2021-4-58-75).
3. А.Ю.Колеснов, В.А.Ивлев, В.Г.Васильев, С.Р.Цимбалаев, Ф.Х.Ламердонова, Р.А.Х.Нассер, Н.С.Аникина, Н.В.Гниломедова, С.Н.Червяк Метод количественной спектроскопии ядерного магнитного резонанса qNMR для исследования воды винограда и винодельческой продукции // Виноградарство и виноделие. Сборник научных трудов, 2022.- С.92-96 (DOI 10.35547/10.34919.2022.43.41.001).
4. Ф.Х.Ламердонова, Р.А.Х.Нассер, А.Ю.Колеснов, В.А.Ивлев, В.Г.Васильев, С.Р.Цимбалаев Методы целевого и нецелевого анализа в исследовании идентификационных показателей винодельческой продукции // Магараç. Виноградарство и виноделие, 2023.- Т. 25.- № 4.- С. 390-396 (DOI: 10.34919/IM.2023.93.68.010).
5. Ivlev V., Vasil'ev V., Kolesnov A., Tsimbalaev S., Sheremeta A., Nasser R., Lamerdonova F., Esparza C.A., Anikina N., Gnilomedova N., Gerzhikova V., Cherviak S. Methodological issues of grape and wine water evaluation by quantitative nuclear magnetic

resonance deuterium spectroscopy ($^2\text{H}(\text{D})$ -qNMR) // BIO Web of Conferences, 2023. – Vol. 68. – Article No. 02021. – 5 p. (DOI: 10.1051/bioconf/20236802021).

6. Ivlev V., Vasil'ev V., Kolesnov A., Tsimbalaev S., Esparza C.A., Nasser R., Sheremeta A., Lamerdonova F., Anikina N., Gnilomedova N. Quantitative nuclear magnetic resonance spectroscopy $^2\text{H}(\text{D})$ -qNMR in the study of deuterium distribution in intracellular water and fermentation products of grape carbohydrates using ethyl alcohol as an example // iVES Conference Series, 2024. – Article No. 268. – 6p. (DOI: 10.58233/qQ67CsQ3).

7. Хромов А.В., Корчагин В.В., Колеснов А.Ю., Ламердонова Ф.Х., Цимбалаев С.Р., Нассер Р.А.Х., Чупрыненко И.В., Ямалиев Е.Г. Оптические свойства L(+)-винной кислоты из винограда с учетом особенностей ее выделения и очистки // Виноградарство и виноделие. Сборник научных трудов, 2024.- Т. LIII/- С.73-75.

8. Fatima Lamerdonova, Vassily Ivlev, Vassily Vasil'ev, Alexander Kolesnov, Sergey Tsimbalaev, Cesar Augusto Esparza, Raudas Nasser, Anzhelika Sheremeta, Nadezhda Anikina, Nonna Gnilomedova Study of intramolecular distribution of hydrogen isotopes in ethanol depending on deuterium content of water and the origin of carbohydrates // iVES Conference Series, 2025. – Article No. ... – 6p. (в печати).

Тезисы докладов

1. А.В.Хромов, В.В.Корчагин, А.Ю.Колеснов, С.Р.Цимбалаев, Ф.Х.Ламердонова, И.В.Чупрыненко, Е.Г.Емалиев О проблеме титрования нерастворимых кальциевых солей многоосновных органических кислот на примере тартрата кальция. Сборник трудов конференции «Физико-химические методы в междисциплинарных экологических исследованиях. Всероссийская конференция и школа-конференция молодых ученых», Севастополь, 15-22.10.2023 г. // М.: Институт физической химии и электрохимии им. А.Н.Фрумкина РАН, 2023.- С. 74-75.

2. Ламердонова Ф.Х., Ивлев В.А., Васильев В.Г., Нассер Р.А., Цимбалаев С.Р., Колеснов А.Ю. Спектроскопия ядерного магнитного резонанса высокого разрешения в изучении изотопных эффектов растений на примере березы пушистой (*Betula pubescens*)/ «Химия и технология растительных веществ: Тезисы докладов XIII Международной научной конференции со школой молодых ученых, Сыктывкар, 2024 // Киров, 2024. – С. 114.

Lamerdonova Fatima Hasbiyanovna
RESEARCH CENTER OF BIOTECHNOLOGY RAS

QUANTITATIVE $^2\text{H}/^1\text{H}$ NMR SPECTROSCOPY OF METABOLITES IN C3 PHOTOSYNTHESIS PLANTS USING *VITIS VINIFERA* L. GRAPES GROWN UNDER DIFFERENT NATURAL AND CLIMATIC CONDITIONS OF THE RUSSIAN FEDERATION

Abstract. *The work is devoted to the study of plant metabolism and isotopic effects of light elements (carbon $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ and hydrogen $^2\text{H}/^1\text{H}$) occurring during the assimilation of atmospheric carbon dioxide in the components of C3 photosynthesis plants, using grapes (*Vitis vinifera* L.) as an example, under the influence of external climatic factors. The results obtained demonstrate for*

the first time quantitative relationships between the natural and climatic characteristics of growing regions in the Russian Federation and the isotopic composition of the components of grapes and wine products. The developed methods of $^2\text{H(D)}$ -qNMR analysis and the predictive approach to assessing the origin of wine have high applied value for standardizing quality control and confirming the geographical authenticity of products within the framework of the regulatory requirements of the Russian Federation and the Eurasian Economic Union.

Key words: *isotopes, hydrogen, deuterium, intracellular water, carbon, organic acids, carbohydrates, viticulture, winemaking, nuclear magnetic resonance spectroscopy, mass spectrometry of ratios of stable isotopes.*

Шабает Александр Викторович

аспирант ФИЦ Биотехнологии РАН 4 года обучения

профиль 1.5.4 Биохимия

e-mail: a.shabaev2011@yandex.ru

Научный руководитель

Федорова Татьяна Васильевна

кандидат технических наук, в.н.с., заведующая лабораторией

молекулярных основ биотрансформаций



БИОДЕСТРУКЦИОННЫЕ СТРАТЕГИИ ГРИБОВ БЕЛОЙ ГНИЛИ РАЗЛИЧНЫХ ЭКОЛОГИЧЕСКИХ НИШ

Аннотация. Проведена сравнительная характеристика биodeградационной и биосинтетической способности 4-х изолятов ксилотрофных базидиомицетов представителей порядков Polyporales (*Trametes hirsuta* и *Steccherinum ochraceum*), Russulales (*Peniophora lycii*) и Agaricales (*Crucibulum laeve*), вызывающих белую коррозийную гниль древесины, произрастающих в природе на растительных субстратах различной степени разрушенности. Проведен сравнительный анализ экзопротеомов *Trametes hirsuta*, *Steccherinum ochraceum*, *Peniophora lycii* и *Crucibulum laeve*; продемонстрирована разница в механизмах деструкции лигноцеллюлозы у базидиальных грибов белой гнили, относящихся к различным таксономическим и экологическим группам. Исследована биodeградационная способность 4-х WRF в отношении ксенобиотиков из группы эндокринных разрушителей – различных соединений эфиров фталевой кислоты (ЭФК). Показано, что среди изученных WRF наиболее эффективным деструктором лигноцеллюлозы и ЭФК является первичный раневой сапротроф порядка Polyporales – *Trametes hirsuta* LE-BIN 072, установлен механизм биodeструкции ксенобиотиков данным грибом.

Ключевые слова: базидиомицеты, грибы белой гнили, лигноцеллюлозный комплекс, биodeструкция лигноцеллюлозы.

Грибы белой гнили – это экофизиологическая группа грибов, обладающая способностью эффективно разрушать основные компоненты древесины, такие как целлюлоза, гемицеллюлоза и лигнин. Биodeструкция растительных полисахаридов осуществляется грибами белой гнили посредством секреции ряда окислительных и гидролитических ферментов – так называемого лигноцеллюлозного комплекса (ЛЦК), в результате работы которого образуются различные продукты деструкции лигноцеллюлозного субстрата. К настоящему моменту в ряде исследований было показано, что стратегия деструкции древесины, характерная для конкретных представителей грибов белой гнили коррелирует, как и с их таксономическим положением, так и экологической нишей, причем последнее оказывает большее влияние. Однако к настоящему моменту исследования биodeградационного потенциала и ЛЦК грибов белой гнили были ограничены небольшим числом представителей этой группы. Также, из-за широкой субстратной специфичности ферментов ЛЦК, вызывает большой интерес возможность их использования для биodeструкции ксенобиотиков (в частности эфиров фталевой кислоты).

Цель работы состояла в том, чтобы провести сравнительное исследование биodeградационного потенциала базидиальных грибов белой гнили, относящихся к различным таксономическим и экологическим группам; установить задействованный в процессах биodeградации лигноцеллюлозы и ксенобиотиков комплекс экзоферментов; изучить возможность практического использования грибов белой гнили разных таксономических и экологических групп в технологиях биоремедиации.

Было показано, что скорость роста грибов белой гнили на агаризованных средах с древесными опилками убывает в ряду *T. hirsuta* > *S. ochraceum* > *P. lycii* ≈ *C. laeve*. Линейная скорость роста грибных культур на лиственных опилках берёзы и ольхи выше, чем на хвойных опилках сосны. На агаризованных средах с отдельными компонентами лигноцеллюлозы грибы белой гнили показали дифференциальный рост – у *T. hirsuta* отмечена максимальная скорость роста на средах с карбоксиметилцеллюлозой (КМЦ) и ксиланами; у *S. ochraceum* – с ксиланами; у *P. lycii* и *C. laeve* – с пектином и крахмалом. Наиболее быстрый рост на всех средах демонстрировал первичный раневой ксилотроф *T. hirsuta*, линейная скорость роста которого составляла $28 \pm 0,7$ мм/сут на средах с добавлением ксиланов и КМЦ и $22 \pm 0,9$ мм/сут с лигнином, крахмалом и пектином. Скорость роста остальных грибов колебалась от 5 до 15 мм/сут в зависимости от состава среды.

Для всех грибных культур показана более высокая эффективность деструкции в отношении лиственных пород деревьев, по сравнению с хвойными. Лучше всех березовые опилки разрушал вторичный сапротроф *S. ochraceum* (убыль массы 31% после 60 суток роста). Наибольшая убыль массы опилок ольхи отмечена у первичного раневого ксилотрофа *T. hirsuta* – 23% после 60 суток роста. Сосновые опилки все грибы разрушали с одинаково низкой эффективностью – 10-14% убыли массы после 60-120 суток роста. Качественная и количественная оценка окислительной, целлюлазной и ксиланазной ферментативных активностей при культивировании грибов белой гнили на агаризованных и жидких средах с опилками показала, что в случае быстрорастущего штамма *T. hirsuta* 072 имело место наличие всех типов активностей, в то время как медленно растущие грибы *S. ochraceum* 3174, *P. lycii* 2142 и *C. laeve* 1700 характеризовались более низкими значениями целлюлазной и ксиланазной активностей и более высокой окислительной.

Сравнительный анализ экзопротеомов (секретомов) грибов белой гнили при культивировании на жидких средах с опилками показал, что разные виды грибов белой гнили имели сильно отличный друг от друга профиль лигноцеллюлолитических ферментов, в то время как тип древесного субстрата влиял на состав белков ЛЦК в меньшей степени. ЛЦК быстрорастущего первичного раневого ксилотрофа *T. hirsuta* 072 включал эндо- и экзоцеллюлазы семейств GH5, GH6 и GH7, гемицеллюлазы (сем. GH2, GH28 и CE1 CAZy-мов), лигнолитические пероксидазы (MnP, VP и Lip) и лакказы, а также ферменты вспомогательной активности, представленные целобиозодегидрогеназой (сем. AA3+AA8), глиоксаль-оксидазой GLOX (сем. AA5 CAZy-мов) и литической полисахаридмонооксигеназой ЛПМО (сем. X325). ЛЦК вторичного сапротрофа *S. ochraceum* 3174 характеризовался полным отсутствием целлюлаз, наличием гемицеллюлаз сем. GH1/GH5, GH27, GH28, GH125 и PL3 CAZy-мов, пероксидаз MnP и VP, многочисленных изоферментов лакказ, глиоксаль-оксидазы и ЛПМО (сем. X325). Состав ЛЦК облигатного сапротрофа *P. lycii* 2142 схож с таковым подстилочного сапротрофа *C. laeve* 1700. Отличительной особенностью которых от первичного и вторичного

ксилотрофов порядка Полипоровые является отсутствие в их секретах лигнолитических пероксидаз и наличие множественных изоферментов лакказ, а также белков GlcD суперсемейства – ФАД/ФМН-содержащие оксидоредуктазы (АА7 семейства), которые предположительно могут являться олигосахарид оксидазами. ЛЦК *P. lycii* и *C. laeve* включал также ЛПМО (сем. X325) и GMS-оксидоредуктазы АА3 семейства CAZy-мов.

Показано, что соединения ЭФК с более длинными и разветвленными углеводородными цепями (как-то ББФ, ДЭГФ и ДиБФ) лучше подвергаются биодеструкции дереворазрушающими сапротрофами *T. hirsuta*, *S. ochraceum* и *P. lycii*. ЭФК с более короткими углеводородными звеньями и менее гидрофобные (как-то ДБФ) эффективнее разрушает подстилочный сапротроф *C. laeve*. При этом быстрорастущий первичный раневой ксилотроф *T. hirsuta* является наиболее эффективным деструктором большинства ЭФК (ББФ, ДЭГФ и ДиБФ) – остаточное содержание менее 10% на 6-ые сутки культивирования. Показано, что наличие в ростовой среде соединений фталатов приводит к значительному увеличению в секретах *T. hirsuta* 072 содержания пероксидаз и лакказ, при этом в зависимости от соединения ЭФК изменяется их состав и соотношение. В присутствии ДЭГФ показана сильная индукция лигнин пероксидазы LiP9, ДиБФ – индукция пероксидаз MnP5, LiP9 VP2, наличие ББФ вызывает индукцию пероксидазы MnP7 и лакказы LacA, а ДБФ сильно индуцирует продукцию только лакказы LacA. В биодеструкции ЭФК и их метаболитов задействованы также внутриклеточные белки *T. hirsuta*, такие как эстеразы, НАДН:флавин оксидоредуктазы, короткоцепочечные алкогольдегидрогеназы, альдо-кеторедуктазы, арил-алкогольдегидрогеназы, альдегид дегидрогеназы, хинон монооксигеназы.

Основные выводы

Было показано, что быстрорастущий первичный раневой ксилотроф *T. hirsuta* является наиболее эффективным деструктором древесных опилок и большинства фталатов. ЛЦК первичного раневого ксилотрофа *T. hirsuta* сходен с ЛЦК медленнорастущего вторичного сапротрофа *S. ochraceum* и включает эндо- и экзоцеллюлазы, гемицеллюлазы, лигнолитические пероксидазы и лакказы, а также ряд ферментов вспомогательной активности. ЛЦК медленнорастущих облигатного сапротрофа *P. lycii* 2142 и подстилочного сапротрофа *C. laeve* 1700 сходны и включают в себя множественные изоферменты лакказ, а также белки GlcD суперсемейства – ФАД/ФМН-содержащие оксидоредуктазы, которые предположительно могут являться олигосахарид оксидазами, ЛПМО и GMS-оксидоредуктазы. В биодеструкции соединений фталатов участвуют различные лигнолитические пероксидазы и лакказа LacA гриба *T. hirsuta* 072, а также внутриклеточные белки.

Список публикаций по теме работы

Статьи

1. Shabaev A.V., Savinova O.S., Moiseenko K.V., Glazunova O.A., Fedorova T.V. Saprotrophic Wood Decay Ability and Plant Cell Wall Degrading Enzyme System of the White Rot Fungus *Crucibulum laeve*: Secretome, Metabolome and Genome Investigations. // J. Fungi – 2025. – Vol. 11, No. 21. Doi: 10.3390/jof11010021.
2. Shabaev A.V., Fedorova T.V. Influence of a Wood Substrate on the Profile of Volatile Organic Compounds Produced by White Rot Fungus *Trametes hirsuta* LE-BIN 072. // Applied

Biochemistry and Microbiology – 2024. – Vol. 60, No. 6. – P. 1240–1251. DOI: 10.1134/S0003683824605821.

3. Savinova O.S., Shabaev A.V., Fedorova T.V. Biodegradation of Phthalic Acid Esters by the White-Rot Fungus *Peniophora lycii*. // Microbiology – 2023. – Vol. 92, No. 3. – P. 427–433. DOI: 10.1134/S0026261723600222.

4. Savinova O.S., Shabaev A.V., Glazunova O.A., Eremin S.A., Fedorova T.V. Biodestruction of Phthalic Acid Esters by White Rot Fungi. // Applied Biochemistry and Microbiology – 2022. – Vol. 58, No. 5. – P. 598–612. DOI: 10.1134/S0003683822050143.

5. Savinova O.S., Shabaev A.V., Glazunova O.A., Moiseenko K.V., Fedorova T.V. Benzyl Butyl Phthalate and Diisobutyl Phthalate Biodegradation by White-rot Fungus *Trametes hirsuta*. // Applied Biochemistry and Microbiology – 2022. – Vol. 58, Suppl. 1. – P. S113–S125. DOI:10.1134/S0003683822100118

6. Shabaev A.V., Moiseenko K.V., Glazunova O.A., Savinova O.S., Fedorova T.V. Comparative Analysis of *Peniophora lycii* and *Trametes hirsuta* Exoproteomes Demonstrates “Shades of Gray” in the Concept of White-Rotting Fungi. // Int. J. Mol. Sci. – 2022. – Vol. 23, 10322. Doi:10.3390/ijms231810322.

Тезисы докладов

1. Шабаетв А.В., Савинова О.С. Биодеструкция диизобутилфталата (ДиБФ) и бутилбензил фталата (ББФ) грибом белой гнили *Trametes hirsuta* // Актуальные аспекты современной микробиологии: XIII молодежная школа-конференция с международ. участием: Ваш формат: Москва: 2022. – С. 271.

2. Фёдорова Т.В., Шабаетв А.В. Биодеградационная стратегия гриба белой гнили *Trametes hirsuta* 072 в отношении эндокринных разрушителей-эфиров фталевой кислоты // Актуальная биотехнология: 2023. – № 3. – С. 44–47.

3. Шабаетв А.В., Федорова Т.В. Механизм деградации лигноцеллюлозы грибом белой гнили *Crucibulum laeve* // Сборник материалов X Всероссийской Пущинской конференции «Биохимия, физиология и биосферная роль микроорганизмов»: тезисы: ГЕОС: Москва: 2023. – С. 81–82.

Shabaev Alexander Victorovitch RESEARCH CENTER OF BIOTECHNOLOGY RAS

BIODESTRUCTURAL STRATEGIES OF WHITE ROT FUNGI OF DIFFERENT ECOLOGICAL NICHES

Abstract. *The comparative characterisation of biodegradation and biosynthetic ability of 4 isolates of xylotrophic basidiomycetes from the orders Polyporales (*Trametes hirsuta* and *Steccherinum ochraceum*), Russulales (*Peniophora lycii*) and Agaricales (*Crucibulum laeve*), causing white rot of wood, growing in nature on plant substrates of various degrees of destruction, has been carried out. The comparative analysis of exoproteomes of *Trametes hirsuta*, *Steccherinum ochraceum*, *Peniophora lycii* and *Crucibulum laeve* was carried out; the difference in mechanisms of lignocellulose destruction in basidial white rot fungi belonging to different taxonomic and ecological groups was demonstrated. The biodegradation ability of 4 WRFs was investigated with respect to xenobiotics from the group of endocrine disruptors - various*

compounds of phthalic acid esters (PAE). It is shown that among the studied WRFs the most effective destructor of lignocellulose and PAE is the primary wound saprotroph of the order Polyporales - Trametes hirsuta LE-BIN 072, the mechanism of xenobiotics biodegradation by this fungus was established.

Key words: *basidiomycetes, white rot fungi, lignocellulose complex, lignocellulose biodegradation.*

Гололобова Александра Вадимовна

аспирант ФИЦ Биотехнологии РАН 3 года обучения научная

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



ИЗУЧЕНИЕ НОВЫХ МЕХАНИЗМОВ АЦЕТОГЕНЕЗА У ПЕРВЫХ ОБЛИГАТНО АВТОТРОФНЫХ АЦЕТОГЕНОВ

Аннотация. *Ацетогенные прокариоты изучаются уже более ста лет, однако и по сей день остается много неотвеченных вопросов, связанных с особенностями метаболизма этих микроорганизмов. Ранее нами были получены и охарактеризованы первые облигатно автотрофные ацетогенные бактерии *Aceticella autotrophica* и '*Acetitalea autotrophica*', а при помощи методов культивирования, геномики и протеомики было предположено функционирование у данных микроорганизмов новых механизмов ацетогенеза. За отчетный период при помощи молекулярных и биохимических методов были получены доказательства функционирования предложенных механизмов, а также дополнены сведения о культуральных свойствах новых ацетогенов.*

Ключевые слова: *ацетогенез, автотрофия, НАД(Ф)Н:полисульфид оксидоредуктаза, восстановительный глициновый путь, термофилы.*

Ацетогенные прокариоты – это физиологическая группа микроорганизмов, осуществляющих восстановление молекул углекислого газа до ацетата в ходе анаэробного дыхания [3]. Для подавляющего числа представителей данной группы характерна способность использовать в качестве доноров и акцепторов электронов широкий спектр соединений. До недавнего времени такая гибкость метаболизма ацетогенов считалась необходимым свойством, объясняющим их повсеместное распространение. В данном контексте полученные на предыдущих этапах работы чистые культуры первых облигатно автотрофных ацетогенных бактерий *Aceticella autotrophica* [1] и '*Acetitalea autotrophica*' вызвали большой интерес с точки зрения поиска скрытых метаболических возможностей данных бактерий, позволяющих им увеличивать эффективность запасаания энергии в ходе ацетогенеза. Исследования на 3 году обучения в аспирантуре были посвящены подробному изучению особенностей ацетогенеза выделенных ранее штаммов при помощи методов биохимии и молекулярной биологии.

Во время изучения физиологии *Ac. autotrophica* особое внимание привлекла способность микроорганизма элементную серу и полисульфид до сульфида, причем процесс сульфидогенеза всегда шел параллельно с ацетогенезом. Проведенные на предыдущих этапах работы геномные и протеомные исследования позволили обнаружить ген, кодирующий оксидоредуктазу неизвестной функции, гомологичную описанной ранее НАД(Ф)Н:полисульфид оксидоредуктазе (NSR) из *Thermotoga maritima* [2]. Важно отметить, что генов, кодирующих известные диссимиляционные мембрансвязанные серо-

и полисульфидредуктазы, обнаружено не было. На основе полученных данных был предложен механизм «облегченного ацетогенеза», когда энергетическую функцию пути Вуда-Льюнга частично берет на себя NSR, кодируемая геном-кандидатом и восстанавливающая серные соединения. Детектированный ген NSR был клонирован в экспрессионный вектор, затем при помощи бело-голубой селекции был произведен отбор трансформантов, из которых была выделена плазмида, использованная для трансформации экспрессионного штамма *E.coli*. Полученный после экспрессии бесклеточный экстракт был частично очищен в ходе Ni-аффинной хроматографии, а для полученного белкового препарата было показано наличие мажорного белка массой около 46 кДа, что соответствует теоретически рассчитанной массе NSR в 48 кДа. Активность NSR была измерена согласно ранее описанной методике с модификациями [2]. Было продемонстрировано, что NSR *Ac. autotrophica* может использовать в качестве донора электронов как НАДН, так и НАДФН. В качестве акцептора электронов данный фермент восстанавливал полисульфид и S⁰. Добавление КоА приводило к двукратному увеличению активности. Наибольшая активность NSR показана в присутствии НАДФН, полисульфида и КоА и составила 6,9 мкмоль НАДФН/мин/мг белка.

Проведенные на предыдущих этапах работы геномные и протеомные исследования '*At. autotrophica*' позволили предположить функционирование у данного микроорганизма нового типа ацетогенеза, при котором восстановительный модуль представлен реакциями восстановительного глицинового пути. Для подтверждения данной гипотезы в течение отчетного периода было проведено измерение активности ряда ферментов восстановительного глицинового пути. С использованием бесклеточного экстракта '*At. autotrophica*' были определены активности формиадегидрогеназы ($2,2 \pm 0,75$ мкмоль/мин/мг белка), формиаТГФ лигазы ($3,37 \pm 1,35$ мкмоль/мин/мг белка), глицинсинтазного комплекса ($57,21 \pm 10,86$ мкмоль/мин/мг белка) и сериндеаминазы ($0,94 \pm 0,31$ мкмоль/мин/мг белка).

Также за отчетный период был изучен рост исследуемых ацетогенов в виде колоний на плотной среде и установлены значения минимальных ингибирующих концентраций (МИК) для спектра антибиотиков. Для *Ac. autotrophica* оптимальным оказался рост на агарозе, для '*At. autotrophica*' - на агаре. К образованию большего количества колоний обеих культур приводило использование посевного материала на стадии поздней экспоненты. Наибольшее количество колоний образовывалось при соотношении газов H₂/CO₂ 1:1. Оптимальная температура роста колоний *Ac. autotrophica* составляла 50 °С, а для штамма '*At. autotrophica*' - 55 °С. Определение чувствительности клеток ацетогенов *Ac. autotrophica* и '*At. autotrophica*' к канамицину, тетрациклину, ампициллину, хлорамфениколу и эритромицину показало, что МИК каждого антибиотика для обоих микроорганизмов составляют 50 мкг/мл, за исключением эритромицина (МИК для *Ac. autotrophica* - 100 мкг/мл).

Основные выводы

1. Были осуществлены клонирование и гетерологическая экспрессия гена-кандидата, предположительно кодирующего NSR, в результате чего получен частично очищенный препарат NSR *Ac. autotrophica* с молекулярной массой 46 кДа.
2. Измерение активности NSR показало, что данный фермент способен восстанавливать серу и полисульфид, используя в качестве донора электронов НАД(Ф)Н,

что подтверждает гипотезу об участии данного белка в «облегченном» ацетогенезе *Ac.autotrophica*.

3. Для бесклеточного экстракта клеток '*At. autotrophica*' было успешно проведено измерение активностей ряда ферментов восстановительного глицинового пути, что подтверждает гипотезу о функционировании нового «глицинового» ацетогенеза у данного микроорганизма.

4. Для обоих исследуемых ацетогенов были определены оптимальные условия роста в виде колоний, а также установлены МИК для ряда антибиотиков, что имеет большое значение для потенциального использования первых облигатно автотрофных ацетогенов в биотехнологии.

Литература

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
2. 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.
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

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

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 // 4-й 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 запасаения 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.

5. Фролов Е.Н., Гололобова А.В., Лебединский А.В., Ельченинов А.Г. Ацетогенные микроорганизмы с новыми механизмами запасания энергии // 14-я Международная мультikonференция Биоинформатика регуляции и структуры геномов / системная биология (BGRS/SB-2024) (г. Новосибирск, 5 – 10 августа 2024 г.): тезисы докладов. – Новосибирск: ИЦиГ СО РАН. – 2024. – С. 1419 – 1423.

Gololobova Alexandra Vadimovna

RESEARCH CENTRE OF BIOTECHNOLOGY RAS

**STUDY OF NEW MECHANISMS OF ACETOGENESIS IN THE FIRST
OBLIGATE AUTOTROPHIC ACETOGENS**

Abstract. *Acetogenic prokaryotes have been studied for more than a hundred years, but to this day there are many unanswered questions related to the peculiarities of the metabolism of these microorganisms. Previously, we obtained and characterized the first obligately autotrophic acetogenic bacteria *Aceticella autotrophica* and '*Acetitalea autotrophica*', and with the help of cultivation methods, genomics, and proteomics, the functioning of new mechanisms of acetogenesis in these microorganisms was assumed. During the reporting period, evidence of the functioning of the proposed mechanisms was obtained using molecular and biochemical methods, as well as new information on the cultural properties of new acetogens.*

Keywords: *acetogenesis, autotrophy, NAD(P)H:polysulfide oxidoreductase, reductive glycine pathway, thermophiles.*

Работа выполнена при поддержке гранта РНФ 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 3 года обучения

научная специальность 1.5.6 Биотехнология

e-mail: Alexander_TheChemist_Kolosoff@mail.ru

Научный руководитель

Булаев Александр Генрихович

кандидат биологических наук,

заведующий лаборатории хемолитоавтотрофных микроорганизмов



СОВМЕСТНОЕ БИОВЫЩЕЛАЧИВАНИЕ ОТХОДОВ ОБОГАЩЕНИЯ И ПЕЧАТНЫХ ПЛАТ

Аннотация. Биологическая переработка печатных плат затруднена в виду токсичности материалов сырья для микроорганизмов, осуществляющих биовыщелачивание. Одним из решений данной проблемы является совместное выщелачивание минерального сырья, содержащего сульфидные минералы, и электронных отходов. В ходе экспериментов были исследованы процессы совместного выщелачивания хвостов флотации, содержащих 49% пирита, и измельченных печатных плат. Эксперимент проводили в периодическом и проточном режимах при постепенном увеличении содержания печатных плат в пульпе с использованием смешанной культуры ацидофильных микроорганизмов. Изучена динамика извлечения меди и никеля в обоих режимах.

Ключевые слова: биогидрометаллургия, пирит, хвосты флотации, электронные отходы, ацидофильные микроорганизмы.

Отходы электроники – перспективное вторичное сырье для получения цветных и благородных металлов из-за высокого содержания ценных компонентов[9]. Однако, переработка данного сырья зачастую затруднена из-за специфического состава. Например, биологическое выщелачивание данного сырья затруднено в виду токсичности компонентов для ацидофильных микроорганизмов – основной группы микроорганизмов, использующихся в биогидрометаллургических процессах[1, 7]. Основными биотехнологическими решениями данной проблемы являются двухстадийное выщелачивание [6] и совместное выщелачивание отходов электроники и сульфидных минералов [2,8]. В текущем году задачей работы было исследование процесса совместного выщелачивания сульфидных минералов (пиритных хвостов флотации сульфидной руды) и порошка печатных плат.

Биоокисление сульфидных минералов, в первую очередь, пирита, арсенопирита, халькопирита и сфалерита – широко распространенный подход, используемый в ходе биогидрометаллургической добычи благородных и цветных металлов по всему миру [3,4]. Образующиеся в процессе обогащения сульфидных руд хвосты флотации представляют серьезную технологическую проблему, так как бедные по содержанию цветных и благородных металлов хвосты экономически нецелесообразно перерабатывать методами чанового выщелачивания, а кучное выщелачивание затруднено [5]. Решением проблемы

переработки отходов обогащения может быть совместное использование электронных отходов.

В ходе экспериментов нами был использован образец лежалых пиритных хвостов флотации, полученных из медно-цинковой руды на промышленной обогатительной фабрике [10]. Анализ состава основных элементов показал общее содержание железа 29,5%, серы – 29,2%, причем большая часть серы (25,4 % от массы образца) находится в сульфидной форме. Также образец содержал 0,12% меди и 0,26% цинка. Рентгенодифракционный анализ минерального состава показал, что образец хвостов флотации состоит преимущественно из пирита (49%) и кварца (29%).

Образец был подвергнут обработке дистиллированной водой при постоянном перемешивании в лабораторном реакторе с мешалкой (2,5 л) в течение 24 часов при скорости перемешивания 600 об/мин для удаления остаточных количеств меди и цинка, содержащихся в оксидных минералах, которые могли бы повлиять на оценку эффективности выщелачивания меди из печатных плат. В высушенном и измельченном виде образец хвостов использовался в процессе биовыщелачивания с постоянной плотностью пульпы (Т : Ж) 5% или 50 г/л.

Образец отходов, одеваемых в процессе измельчения печатных плат системой очистки воздуха (тонкая фракция печатных плат), содержал 10,0 % Si, 8,0% Fe, 2,6% Cu, 2,0% Al, 1,7% Pb, 0,55 Sn.

Эксперимент проводился в лабораторных реакторах с мешалкой при поддержании рабочего объема 1 л, скорости перемешивания 500 об/мин, постоянной аэрации с расходом воздуха 3 л/мин и при температуре 35 °С. Питательная среда имела следующий состав (г/л): $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ –0,75, KCl–0,05, $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ –0,125 и K_2HPO_4 –0,125. В реакторы вносили навески высушенного измельченного образца хвостов флотации до плотности пульпы 5% (50 г/л) и доводили pH до значений 1,5-1,6 концентрированной серной кислотой. В часть реакторов вносили образец измельченных печатных плат, а реакторы, в которых процесс проходил без добавления электронных отходов, были приняты за контроль.

Реакторы инокулировали до концентрации клеток микроорганизмов $0,5\text{-}2,0 \times 10^7$ кл/мл. Первичный посевной материал представлял собой накопительную культуру ацидофильных микроорганизмов, поддерживаемых при постоянной аэрации и комнатной температуре на среде, в которой источником железа и серы предстает пирит. Последующая инокуляция реакторов проходила с использованием микробной суспензии, полученной в ходе данного эксперимента в соответствующих реакторах.

Эксперимент проводили в несколько этапов: в периодическом режиме при содержании печатных плат в пульпе 0,5% в 3 повторностях и в непрерывном режиме со скоростью потока $0,2 \text{ сут}^{-1}$ при начальной концентрации печатных плат 0,5% с постепенным увеличением концентрации печатных плат до 3,55%.

В непрерывном режиме выщелачивание проводилось следующим образом: из реактора 1, в пульпе которого содержались только хвосты флотации, отделялась жидкая фаза посредством фильтрации, которая отправлялась в реактор 2, содержащий пульпу печатных плат и хвостов флотации

В периодическом режиме выщелачивания в реакторах с измельченными печатными платами (0,5%) в первый (PCB1), второй (PCB2) и третий запуск (PCB3) параметры жидкой фазы пульпы изменялись относительно контроля (усредненные значения, полученные в реакторах с хвостами флотации без добавления плат) следующим образом (рис.1):

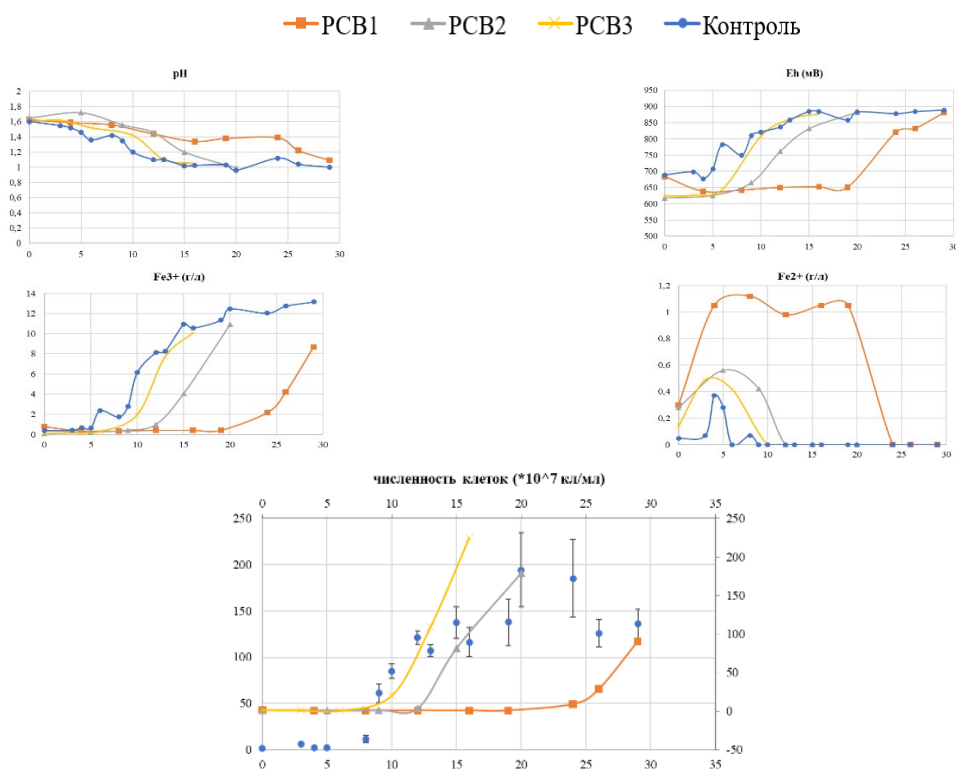


Рисунок 1 – Изменение pH, Eh, титра двухвалентного и трехвалентного железа, и численности клеток в реакторах в ходе эксперимента в периодическом режиме, где PCB1, PCB2 и PCB3 – данные, полученные в ходе культивирования в периодическом режиме в реакторах с печатными платами в 1, 2 и 3 повторности. На оси абсцисс отображено время от начала эксперимента (сут.)

По мере культивирования происходила постепенная адаптация культуры микроорганизмов, которая выражалась в постепенном приближении наблюдаемых параметров в реакторах с печатными платами к контрольным.

В ходе эксперимента в периодическом режиме не удалось выявить значимую зависимость скорости извлечения меди и никеля в раствор от адаптации культуры микроорганизмов, которое составило $80 \pm 5,6\%$ меди и $51 \pm 8,3\%$ никеля за 18 суток выщелачивания. По всей видимости, это связано с тем, что химическое взаимодействие протекает значительно быстрее, чем происходят биологические изменения.

В режиме с протоком, поддерживаемом на уровне $0,2 \text{ сут}^{-1}$, происходило постепенное увеличение актуальной концентрации печатных плат в среде выщелачивания за счет увеличения массы навесок, вносимых вместе с протоком жидкой фазы из контрольного реактора 1. Динамика изменения наблюдаемых параметров культивирования на фоне увеличения плотности пульпы печатных плат в ходе эксперимента выглядит следующим образом (рис. 4):



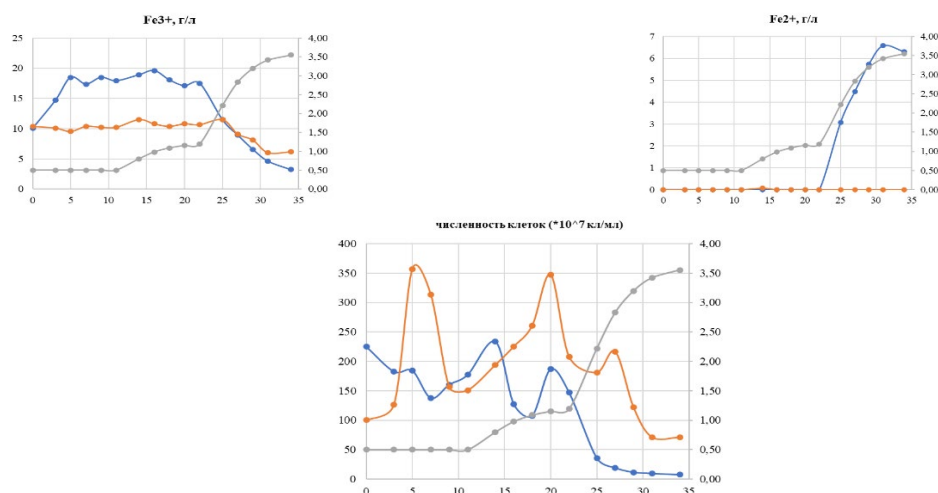


Рисунок 2 – Изменение параметров культивирования в проточном режиме. Плотность пульпы печатных плат (ПП РСВ%) отображена на вспомогательной вертикальной оси, по оси абсцисс – время от начала протока (сут.)

При этом динамика извлечения меди и никеля в ходе эксперимента была следующей (рис. 3):

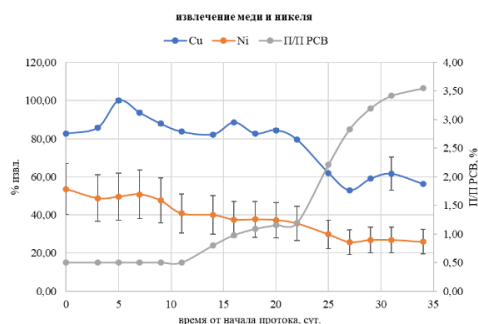


Рисунок 3 – Динамика извлечения цветных металлов в проточном режиме, при увеличении плотности пульпы печатных плат (ПП РСВ), отображенной на вспомогательной вертикальной оси.

Повышение содержания печатных плат в пульпе негативно отразилось на скорости выщелачивания меди и никеля. При этом наблюдается корреляция с наблюдаемым Eh в растворе выщелачивания, на который влияет скорость окисления двухвалентного железа микроорганизмами.

Основные выводы: В экспериментах показана возможность адаптации культуры к материалам печатных плат в случае совместного выщелачивания с хвостами флотации, при которой ингибирующее влияние плат на рост микроорганизмов и их способность окислять железо значительно снижается. В ходе выщелачивания в проточном режиме показано, что извлечение меди и никеля снижается со 100 и 50,8% до 57,5 и 26,4%, соответственно, при увеличении содержания печатных плат в пульпе с 0,5% до 3,55%.

Литература

1. Aachhera S. et al. E-Waste Recycling: A Comprehensive Review on Metal Recovery and the Factors Affecting Bioleaching //Biotechnology for Environmental Sustainability. – 2025. – С. 209-243.

2. Akbari S., Ahmadi A. Recovery of copper from a mixture of printed circuit boards (PCBs) and sulphidic tailings using bioleaching and solvent extraction processes // Chemical Engineering and Processing: Process Intensification – 2019 –T. 142. – C. 107584
3. Bulaev A. et al. Biooxidation of a Pyrite-Arsenopyrite Concentrate Under Stressful Conditions //Microorganisms. – 2024. – T. 12. – №. 12. – C. 2463.
4. Elkina Y. et al. Continuous bioleaching of arsenic-containing copper-zinc concentrate and shift of microbial population under various conditions //Minerals. – 2022. – T. 12. – №. 5. – C. 592.
5. Gerding J., Novoselov A. A., Morales J. Climate and pyrite: two factors to control the evolution of abandoned tailings in Northern Chile //Journal of Geochemical Exploration. – 2021. – T. 221. – C. 106686.
6. Maluleke M. D. et al. Bioleaching of printed circuit boards in a two-stage reactor system with enhanced ferric iron regeneration in a re-circulating packed-bed reactor from PCB leaching //Minerals Engineering. – 2024. – T. 218. – C. 109000.
7. Morell J. et al. Closed-loop bioleaching for mobile phones from the bioregeneration of the leaching agent to the recovery of metal: A review of main factors affecting each stage //Journal of Industrial and Engineering Chemistry. – 2025.
8. Tapia J. et al. Bioleaching of heavy metals from printed circuit boards with an acidophilic iron-oxidizing microbial consortium in stirred tank reactors //Bioengineering. – 2022. – T. 9. – №. 2. – C. 79.
9. Tipre D. R. et al. The brighter side of e-waste—a rich secondary source of metal //Environmental Science and Pollution Research. – 2021. – T. 28. – №. 9. – C. 10503-10518.
10. Valiyev K. et al. The Development of Innovated Complex Process for Treatment of Old Flotation Tailings of Copper-Zinc Sulfide Ore //Molecules. – 2024. – T. 29. – №. 7. – C. 1550.

Kolosoff Alexander Vladimirovich
RESEARCH CENTER OF BIOTECHNOLOGY RAS

JOINT LEACHING OF ENRICHMENT WASTE AND PRINTED CIRCUIT BOARDS

Abstract. *Biological processing of printed circuit boards is difficult due to the toxicity of raw materials for microorganisms engaged in bioleaching. One solution to this issue is the joint leaching of mineral raw materials containing sulfide minerals with electronic waste. During the experiments, we investigated the joint leaching process of flotation tailings containing 49% pyrite and crushed printed circuit boards. The experiment was conducted in batch and continuous modes, with a gradual increase in the amount of printed circuit board material in the mixture using a mixed culture of acidophilic microorganisms as inoculum. The dynamics of copper and nickel extraction under both conditions were studied.*

Keywords: *electronic waste, biohydrometallurgy, pyrite, flotation tailings, acidophilic microorganisms.*

Пахомова Мария Дмитриевна

аспирант ФИЦ Биотехнологии РАН 3 года обучения

научная специальность 1.5.4 Биохимия

e-mail: mari.pakhomova.99@mail.ru

Научный руководитель

Агафонов Михаил Олегович

доктор биологических наук,

руководитель группы

геномного редактирования промышленных
микроорганизмов



НАРУШЕНИЕ N-ГЛИКОЗИЛИРОВАНИЯ БЕЛКОВ У МУТАНТОВ *OGATAEA POLYMORPHA* С ДЕФЕКТНЫМ ФОСФОМАННОЗИЛИРОВАНИЕМ ПРИВОДИТ К УВЕЛИЧЕНИЮ УСТОЙЧИВОСТИ К ОРТОВАНАДАТУ

Аннотация. Ортованадат является токсичным соединением, поскольку из-за схожести с ортофосфатом способен ингибировать множество ферментов в клетке. Известно, что высокая устойчивость к ортованадату дрожжей *Ogataea polymorpha* обеспечивается регуляцией экспрессии транспортеров фосфата, связанной с фосфоманнозилрованием белков в секреторном пути, которое катализируется трансферазой маннозилфосфата *Abv1*. Однако было непонятно, связано ли снижение устойчивости к ортованадату у мутантов с нарушением гена *ABV1* непосредственно с фосфоманнозилрованием или другие модификации гликозидных цепей белков могут также влиять на регуляцию транспорта фосфата. Был проведен мутагенез штамма с нарушенным фосфоманнозилрованием и проведена селекция мутантов с повышенной устойчивостью к ортованадату. Среди полученных мутантов были выявлены штаммы с дефектами гликозилирования модельного гликопротеида. По комплементации одной из полученных мутаций был клонирован ген, кодирующий 1,2-маннозилтрансферазу аппарата Гольджи. Таким образом, было продемонстрировано, что гликозилирование белков в секреторном пути влияет на устойчивость клеток к ортованадату даже в отсутствие фосфоманнозилрования.

Ключевые слова: гликозилирование, фосфоманнозилрование, ортованадат, α -1,2-маннозилтрансфераза, *Ogataea polymorpha*.

Ортованадат-ион VO_4^{3-} — неорганический анион, являющийся токсичным аналогом фосфат-иона PO_4^{3-} . Благодаря структурному сходству ортованадат способен действовать как конкурентный ингибитор большого числа ферментов, использующих в качестве субстрата соединения, содержащие остаток фосфата, таких как протеин-тирозин-фосфатазы и Mg^{2+} -зависимой Na^+/K^+ -активируемой АТФазы [1]. Избежать пагубного воздействия ортованадата возможно, если предотвратить его захват клеткой из окружающей среды. Было показано, что мутанты диморфных дрожжей *Candida albicans* и мицелиального гриба *Neurospora crassa* с нарушением транспорта фосфатов демонстрировали повышенную устойчивость к ортованадату [2, 3]. У дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* появление устойчивости к ортованадату сопровождалось

изменениями в гликозилировании белков в аппарате Гольджи, однако механизм данной супрессии был неясен [4].

Некоторые виды дрожжей демонстрируют меньшую чувствительность к ортованадату, чем другие. По сравнению с *S. cerevisiae*, вид метилотрофных дрожжей *Ogataea polymorpha* гораздо более устойчив к этому соединению, в то время как его ближайший родственник *O. parapolyomorpha* — нет [5]. Было обнаружено, что инактивация гена *O. polymorpha ABV1*, кодирующего гомолог маннозилфосфаттрансферазы Mnn4 *S. cerevisiae*, приводит к возникновению гиперчувствительности к ортованадату [5]. Наиболее вероятно, что механизм действия Abv1 обусловлен его участием в регуляции экспрессии высокоаффинного транспортера фосфата Pho84 и низкоаффинного транспортера Pho87. Однако до сих пор неизвестно, принимают ли другие модификации N-гликозидных цепей *O. polymorpha* участие в формировании устойчивости к ортованадату. В геноме *O. polymorpha* также содержится открытая рамка считывания, кодирующая белок, демонстрирующий большую гомологию с Mnn4 *S. cerevisiae*, чем Abv1. Ранее ген *MNN4 O. polymorpha* не был охарактеризован и описан, также неизвестно, обладает ли кодируемый им белок фосфоманнозилтрансферазной активностью. Поэтому целью данного исследования стало изучение влияния на чувствительность к ортованадат-иону различных нарушений N-гликозилирования у мутанта *O. polymorpha* с инактивированным геном *ABV1*, а также потенциальной роли Mnn4 в формировании устойчивости к ортованадату.

Для изучения эффекта инактивации белка Mnn4 были получены мутанты *O. polymorpha mnn4-Δ* и *O. polymorpha abv1-Δ mnn4-Δ*. Ген *MNN4* не был жизненноважным, но его нарушение заметно ухудшало рост клеток. По интенсивности окрашивания альциановым синим мутант *O. polymorpha mnn4-Δ* не отличался от штамма дикого типа, однако двойной мутант *abv1-Δ mnn4-Δ* окрашивался чуть хуже, чем одинарный мутант *abv1-Δ*, который уже имел дефект связывания с этим красителем. Это могло указывать либо на существенно меньшую фосфоманнозилтрансферазную активность, обеспечиваемую экспрессией гена *MNN4*, по сравнению с геном *ABV1*, или на вовлеченность Mnn4 в фосфоманнозилирование определенной части белков, которые не так представлены в клеточной стенке. Сравнение белковых последовательностей гомологов Mnn4 *S. cerevisiae*, *O. polymorpha*, *Komagataella phaffii* и *Yarrowia lipolytica* показало, что Abv1 демонстрирует большее сходство с Mnn4B и Mnn4C *K. phaffii*, Mpo1 *Y. lipolytica*, в то время как Mnn4 *O. polymorpha* — с Pno1 и Mnn4A *K. phaffii*, инактивация которых не влияла на степень окрашивания альциановым синим. Для последовательностей всех белков было характерно наличие нуклеотидилтрансферазного LiCD домена [6].

На основе штамма *O. polymorpha*, несущего экспрессионную кассету глюкозооксидазы *Aspergillus niger* (GOX), были получены делеционные мутанты *abv1-Δ* и *abv1-Δ mnn4-Δ*. GOX была выбрана в качестве модельного гликопротеида у *O. polymorpha*, поскольку этот белок содержит несколько сайтов N-гликозилирования. Полученные штаммы мутагенизировали ультрафиолетовым светом, после чего были отобраны клоны с повышенной устойчивостью к ортованадату.

Ряд полученных мутантов отличался от исходного штамма по электрофоретической подвижности секретируемой GOX. Это указывало на изменение размера гликозидных цепей этого белка. Все такие мутанты обладали повышенной чувствительностью к присутствию детергента в среде, а большинство из них были не способны расти при повышенной температуре.

По комплементации повышенной чувствительности к SDS, вызываемой одной из полученных мутаций, был клонирован ген, направленная инактивация которого также приводила к увеличению устойчивости к ортованадату в штамме с нарушением гена *ABV1*, а также снижению связывания альцианового синего в штамме с аллелью *ABV1* дикого типа. На основании этих фенотипов клонированный ген был обозначен *ABV1* (Alcan blue staining, vanadate resistance), кодирующий 1,2-маннозилтрансферазу аппарата Гольджи. Таким образом, было продемонстрировано, что гликозилирование белков в секреторном пути влияет на устойчивость клеток к ортованадату даже в отсутствии фосфоманнозилирования. Анализ белковой последовательности *Abv2* выявил 37% сходство с α -1,2-маннозилтрансферазой *Mnn2 S. cerevisiae*.

Основные выводы. Дефекты N-гликозилирования белков в секреторном пути у мутантов *O. polymorpha* с нарушенным фосфоманнозилированием могут приводить к снижению чувствительности к ортованадату.

Литература

1. Stankiewicz P. J., Tracey A. S., Crans D. C. Inhibition of phosphate-metabolizing enzymes by oxovanadium (V) complexes //Metal ions in biological systems. – 1995. – Т. 31. – С. 287-324.
2. Mahanty S. K. et al. Vanadate-resistant mutants of *Candida albicans* show alterations in phosphate uptake //FEMS microbiology letters. – 1991. – Т. 84. – №. 2. – С. 163-166.
3. Bowman B. J. Vanadate uptake in *Neurospora crassa* occurs via phosphate transport system II //Journal of Bacteriology. – 1983. – Т. 153. – №. 1. – С. 286-291.
4. 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. – Т. 140. – №. 3. – С. 933-943.
5. Karginov A. V. et al. Dissection of differential vanadate sensitivity in two *Ogataea* species links protein glycosylation and phosphate transport regulation //Scientific Reports. – 2018. – Т. 8. – №. 1. – С. 16428.
6. Aravind L., Koonin E. V. The fukutin protein family–predicted enzymes modifying cell-surface molecules //Current biology. – 1999. – Т. 9. – №. 22. – С. R836-R837.

Список публикаций по теме работы

Статьи

1. Karginov A. V. et al. A Split-marker system for CRISPR-Cas9 genome editing in methylotrophic yeasts //International Journal of Molecular Sciences. – 2023. – Т. 24. – №. 9. – С. 8173.
2. Kulakova M. et al. High-Affinity Plasma Membrane Ca^{2+} Channel Cch1 Modulates Adaptation to Sodium Dodecyl Sulfate-Triggered Rise in Cytosolic Ca^{2+} Concentration in *Ogataea parapolymorpha* //International Journal of Molecular Sciences. – 2024. – Т. 25. – №. 21. – С. 11450.

Тезисы докладов

1. Кулакова М.В., Пахомова М.Д., Бидюк В.А., Агафонов М.О. Гиперчувствительность к додецилсульфату натрия при нарушении вакуолярной кальциевой АТФазы у дрожжей рода *Ogataea* связана с входом катионов кальция в цитозоль

из внешней среды // Конференция молодых ученых OpenBio-2024 (научоград Кольцово, 24 сентября - 27 сентября 2024 г.) – Кольцово. – 2024.

2. Пахомова М.Д., Кулакова М.В., Агафонов М.О. Нарушение N- и O-гликозилирования белков в секреторном пути *Ogataea parapolymorpha* оказывает влияние на гомеостаз кальция и фосфорилирование MAP-киназы Hog1 // III Международная конференция "Геномика, метагеномика и молекулярная биология микроорганизмов" (г. Москва, 23 ноября – 24 ноября 2024 г.) – Москва. – 2024. – С.77-79.

Pakhomova Maria Dmitrievna
RESEARCH CENTER OF BIOTECHNOLOGY RAS

**DISRUPTION OF PROTEIN N-GLYCOSYLATION IN *OGATAEA POLYMORPHA*
MUTANTS WITH DEFECTIVE PHOSPHOMANNOSYLATION LEADS TO
INCREASED RESISTANCE TO ORTHOVANADATE**

Abstract. *Orthovanadate is a toxic compound because, due to its similarity to orthophosphate, it is able to inhibit many enzymes in the cell. It is known that the high resistance to orthovanadate in yeast Ogataea polymorpha is provided by the regulation of the expression of phosphate transporters associated with phosphomannosylation of proteins in the secretory pathway, which is catalyzed by mannosyl phosphate transferase Abv1. However, it was unclear whether the decrease in orthovanadate resistance in mutants with a violation of the ABV1 gene was directly related to phosphomannosylation, or whether other modifications of protein glycoside chains could also affect the regulation of phosphate transport. Mutagenesis of a strain with impaired phosphomannosylation was performed and mutants with increased resistance to orthovanadate were selected. Among the obtained mutants, strains with defects in glycosylation of the model glycoprotein were identified. According to the complementation of one of the obtained mutations, a gene encoding 1,2-mannosyltransferase of the Golgi apparatus was cloned. Thus, it was demonstrated that protein glycosylation in the secretory pathway affects cell resistance to orthovanadate even in the absence of phosphomannosylation.*

Keywords: *glycosylation, phosphomannosylation, orthovanadate, α -1,2-mannosyltransferase, Ogataea polymorpha.*

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

Салтыкова Виктория Алексеевна

аспирант ФИЦ Биотехнологии РАН 3 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



КОНСТРУИРОВАНИЕ ГАЛОТОЛЕРАНТНЫХ МЕТАНОТРОФНЫХ АССОЦИАЦИЙ ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ БИОПРОТЕИНА

Аннотация. *Получение белка из метана с помощью метаноокисляющих бактериальных сообществ является перспективной биотехнологией. Исследования в рамках кандидатской диссертации ставят целью направленное формирование состава микробной метанотрофной ассоциации, которая будет обеспечивать стабильность процесса культивирования, высокие продукционные характеристики и биобезопасность получаемого продукта. Работа третьего года была направлена на изучение метанотрофных сообществ, способных к росту на средах, эквивалентных по составу морской воде.*

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

Метанотрофные бактерии, способные использовать метан в качестве единственного источника углерода, являются перспективным источником кормового белка. При непрерывном культивировании метанотрофных бактерий в нестерильных условиях в биореакторе спонтанно формируются микробные ассоциации, состоящие из метанотрофа-продуцента и бактерий-спутников [1, 9, 16,]. Одной из главных задач, выполняемых бактериями-спутниками, является утилизация продуктов метаболизма метанотрофов, таких как органические кислоты и метанол, что обеспечивает стабильность биотехнологического процесса [4].

В настоящее время все предприятия, применяющие технологию получения белка из метана, используют метанотрофные ассоциации, растущие на пресной воде [12]. Однако для регионов с ограниченным ресурсом пресной воды разработка биотехнологии производства белка на основе галотолерантных метанотрофов является особенно актуальной. В исследованиях третьего года была проанализирована метаноокисляющая ассоциация на основе галотолерантного метанотрофа *Methylomarinum* sp. Ch1-1, выделенного ранее сотрудниками лаборатории из образцов озера Эльтон (Волгоградская область) с содержанием солей 30 г/л [10].

Задачи третьего года работы: 1) проведение молекулярного анализа ассоциации, формирующейся при непрерывном культивировании нового потенциального штамма-продуцента *Methylomarinum* sp. Ch1-1 на средах, эквивалентных по составу морской воде; 2) поиск и выделение галотолерантных бактерий-спутников, способных ассимилировать метанол или органические кислоты; 3) анализ метаболических взаимосвязей метанотрофного продуцента и бактерий-спутников.

Культивирование галотолерантной ассоциации проводили на природном газе с содержанием метана 97,3% при 30 °С в ферментёрах с рабочим объёмом 1 л при геометрическом объеме 1.5 л со скоростью потока 0,2 ч⁻¹ на минеральной среде, эквивалентной морской воде. Для молекулярного анализа были отобраны аликвоты клеточных суспензий, ДНК из которых выделяли с использованием набора DNeasy Power Soil Kit (Qiagen). Исследование состава метанооксиляющей ассоциации осуществляли путем секвенирования ПЦР-амплифицированных фрагментов варибельного региона V3–V4 гена 16S рРНК с помощью технологии MiSeq (Illumina).

Штаммы бактерий-спутников выделяли методом предельных разведений на твёрдых средах: 1) LB с добавлением 30 г/л NaCl; 2) на минеральных средах с добавлением метанола 0,5% в качестве единственного источника углерода и витамина B12 20 мкг/л в качестве кофактора. Штаммы 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 [13]. Морфологические наблюдения выполняли с помощью микроскопа Zeiss Axioplan 2 и программного обеспечения Axiovision 4.2 (Zeiss).

Экстракцию геномной ДНК проводили по стандартному протоколу с использованием цетилтриметиламмония бромида (CTAB) 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. [3] и Busco 5.1.2 [8]. Аннотацию генома выполняли с помощью Prokka [7] и BlastKOALA [5].

По результатам молекулярного анализа галотолерантного сообщества на основе *Methylo Marinum* sp. Ch1-1 наиболее активное развитие среди гетеротрофных спутников наблюдалось для бактерий рода *Methylophaga* sp. (14,1 % от полученных фрагментов генов 16S рРНК) и *Thalassospira* sp. (10,9%).

Изолят *Thalassospira* sp., штамм ChS2, был выделен на среде LB с добавлением 30 г/л NaCl. Клетки штамма были представлены подвижными изогнутыми палочками длиной 0.8 – 2.3. Рост наблюдался в диапазоне температур от 4 до 40 °С (оптимум – 22 °С) и при концентрации NaCl 0.5-10% (оптимум – 2-4 %). Штамм *Thalassospira* sp. ChS2 использовал в качестве источника углерода N-ацетил-D-глюкозамин и лактат, а также некоторые сахара. Способность ассимилировать лактат обоснована наличием гена, кодирующем лактатдегидрогеназу. Также, вероятно, бактерии этого вида способны утилизировать продукты лизиса клеток метанотрофов, что позволяет им достичь высокой численной представленности в ассоциации.

Изолят *Methylophaga* sp., штамм ChS3, был выделен на минеральной среде с добавлением метанола при концентрации солей (г/л): (NH₄)₂SO₄ – 1,5; MgSO₄ – 2; MgCl₂ – 1; CaCl₂ – 0,4; KCl – 0,33; NaCl – 30. Штамм был ауксотрофом по витамину B12. Клетки штамма были представлены подвижными короткими палочками длиной 1 мкм и шириной 0.2 мкм. Рост наблюдался при температуре от 10 до 40 °С (оптимум – 30-37 °С) и при концентрации NaCl 1-10% (оптимум – 1-4 %). Штамм ChS3 способен к росту в широком диапазоне концентраций метанола до 7%, с оптимумом при 0.5%. Так как метанол является единственным универсальным источником углерода для всех представителей рода

Methylophaga, наиболее вероятно, что штамм ChS3 играет одну из ведущих ролей в утилизации этого метаболита в метанооксиляющем сообществе.

Среди минорных компонентов ассоциации были детектированы бактерии рода *Alloalcanivorax*. Клетки штамма ChS4 были представлены подвижными палочками 0.3 мкм в ширину и 1.5 мкм в длину. Рост наблюдали в диапазоне температур 15–40 °С (оптимум 30 °С) и концентрации NaCl 1–15% (оптимум 3–5%). В отличие от других выделенных бактерий-спутников штамм *Alloalcanivorax* sp. ChS4 был способен использовать ацетат в качестве единственного источника углерода, что делает его перспективным компонентом промышленной метанотрофной ассоциации. При проверке способности использовать C1-соединения рост на метане у этих бактерий не был обнаружен, но наблюдался на метаноле. Примечательно, что для представителей рода *Alloalcanivorax* ранее не сообщалась способность к метилотрофии [6]. При анализе генома нового штамма была обнаружена этанолдегидрогеназа, кодируемая *exaF* кластером. Как сообщалось ранее, мутанты метилотрофа *Methylobacterium extorquens* с делецией всех возможных этанолдегидрогеназ были способны к утилизации метанола на среде, содержащей лантан, при помощи ExaF-этанолдегидрогеназы, которая проявляет неспецифическое сродство к этому субстрату [2]. Однако же штамм ChS4 продемонстрировал свою способность к росту на метаноле вне зависимости от наличия или отсутствия лантана в составе среды.

Основные выводы:

1. Основными гетеротрофными компонентами галотолерантной ассоциации на основе *Methylobacterium* sp. Ch1-1 являются бактерии родов *Methylophaga* и *Thalassospira*.
2. Полученные штаммы *Methylophaga* sp. ChS3, *Alloalcanivorax* sp. ChS4 и *Thalassospira* sp. ChS2 являются перспективными компонентами для промышленной метанотрофной ассоциации, способными утилизировать основные продукты метаболизма метанотрофа, такие как метанол, ацетат и лактат.
3. Обнаружена способность штамма *Alloalcanivorax* sp. ChS4 использовать метанол в качестве источника углерода при помощи ExaF-этанолдегидрогеназы, которая проявляет частичное сродство к этому субстрату.

Литература

1. Bothe H., Møller Jensen K., Mergel A., Larsen J., Jørgensen C. 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. Good N. M., Vu H. N., Suriano C. J., Subuyuj G. A., Skovran E., Martinez-Gomez N. C.. Pyrroloquinoline quinone ethanol dehydrogenase in *Methylobacterium extorquens* AM1 extends lanthanide-dependent metabolism to multicarbon substrates // *Journal of Bacteriology*. – 2016. – V. 198. – № 22. – P. 3109–3118.
3. Gurevich A., Saveliev V., Vyahhi N., Tesler G. QUAST: quality assessment tool for genome assemblies // *Bioinformatics*. – 2013. – V. 29. – № 8. – P. 1072–1075.
4. Kalyuzhnaya M.G., Yang S., Rozova O.N., Smalley N.E., Clubb J., Lamb A., Nagana Gowda G.A., Raftery D., Fu Y., Bringel F., Vuilleumier S., Beck D.A.C., Trotsenko Y.A., Khmelenina V.N., Lidstrom M.E. Highly efficient methane biocatalysis revealed in a methanotrophic bacterium // *Nat. Commun.* – 2013. – V.4. – P.1–7.

5. 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.
6. Rahul K., Sasikala C., Tushar L., Debadrita R., Ramana C. V. *Alcanivorax xenomutans* sp. nov., a hydrocarbonoclastic bacterium isolated from a shrimp cultivation pond // International journal of systematic and evolutionary microbiology. – 2014. – V. 64. – №. Pt_10. – T. 3553-3558.
7. Seemann T. Prokka: rapid prokaryotic genome annotation // Bioinformatics. – 2014. – V. 30 – № 14. – P. 2068–2069.
8. 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.
9. 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.
10. Suleimanov R. Z., Oshkin I. Y., Danilova O. V., Suzina N. E., Dedysh S. N. *Methylo Marinum roseum* sp. nov., a novel halophilic methanotrophic bacterium from the hypersaline lake Elton // Microbiology. – 2024. – V. 93. – №. 6. – P. 724-729.
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. Wang J., Chen L., Xu J., Ma S., Liang X., Wei Z., Li D., Xue M. C1 gas protein: a potential protein substitute for advancing aquaculture sustainability // Reviews in Aquaculture. – 2023. – V. 15. – №. 3. – P. 1179-1197.
13. 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.
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.

Список публикаций по теме работы

Статьи

1. Saltykova V. A., Danilova O. V., Oshkin I. Y., Belova S. E., Suzina N. E., Pimenov N. V., Dedysh S. N. *Methyloraptor flagellatus* gen. nov., sp. nov., novel *Ancalomicrobiaceae*-affiliated facultatively methylotrophic bacteria that feed on methanotrophs of the genus *Methylococcus* // Systematic and Applied Microbiology. – 2025. – V. 48. – №. 1. – P. 126565.

Тезисы докладов

1. Салтыкова В.А., Данилова О.В., Ошкин И.Ю., Белова С.Э., Сузина Н.Е., Дедыш С.Н. Новая факультативная метилотрофная бактерия семейства *Ancalomicrobiaceae*, развивающаяся в ассоциации с *Methylococcus capsulatus* // Сборник конференции «Генетические технологии в микробиологии и микробное разнообразие». – 2024. – Москва. – С. 62-64. (постерный доклад)

2. Салтыкова В.А., Данилова О.В., Ошкин И.Ю., Белова С.Э., Дедыш С.Н. Уникальный тип межвидового взаимодействия в биореакторах: новые метилотрофные бактерии, атакующие метанотрофов рода *Methylococcus* // Сборник конференции «Ломоносов 2025». – 2025. – Москва. (устный доклад)

Saltykova Viktoria Alekseevna
FEDERAL RESEARCH CENTRE OF BIOTECHNOLOGY

**THE CONSTRUCTION OF HALOTOLERANT METHANOTROPHIC
ASSOCIATIONS FOR BIOPROTEIN PRODUCTION**

Abstract. *Obtaining protein from methane using methane-oxidizing bacterial communities is a promising biotechnology. The purpose of this PhD work is the targeted construction of the microbial methanotrophic consortium, which will provide the stability of the cultivation process, high production characteristics and the biosafety of the resulting product. The work of the third year was aimed at studying methanotrophic associations capable of growth in media equivalent to seawater.*

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

Синельников Алексей Владимирович

аспирант ФИЦ Биотехнологии РАН 3 года обучения

научная специальность 1.5.6 Биотехнология

e-mail: sinelnikov11@ya.ru

Научный руководитель

Николаев Юрий Александрович

доктор биологических наук,

зав. лабораторией выживаемости микроорганизмов



Перспективы использования молочнокислых бактерий для получения растительных функциональных пищевых продуктов

Аннотация. Растительные шроты, являющиеся побочными продуктами маслоэкстракционного производства, обладают большим потенциалом для разработки немолочных ферментированных продуктов. В результате проведенных исследований с использованием шрота семян тыквы получены лактоферментированные продукты, изучены их органолептические и физико-химические свойства. Экспериментальные продукты характеризовались отсутствием лактозы и холестерина, высоким содержанием белка, незаменимых аминокислот, ненасыщенных жирных кислот и молочнокислых бактерий.

Ключевые слова: лактобактерии, ферментация, функциональные свойства, растительные шроты, усвояемость.

В настоящее время существует высокая потребность в новых функциональных немолочных ферментированных продуктах. Растительные шроты, являющиеся побочными продуктами маслоэкстракционного производства, обладают большим потенциалом для их разработки.

Целью данного исследования было получение и изучение органолептических и физико-химических свойств лактоферментированных продуктов, полученных с использованием шрота семян тыквы.

Шрот семян тыквы благодаря своему ценному химическому составу, является отличной питательной средой для культивирования лактобактерий и производства немолочных лактоферментированных продуктов. В наших исследованиях питательной средой для культивирования лактобактерий и получения немолочных продуктов служил стерильный белковый экстракт шрота семян тыквы. Получение продукта включало измельчение шрота, извлечение белковых соединений, термическую обработку, инокуляцию культурой *Lacticaseibacillus rhamnosus*, ферментацию до образования плотного сгустка. Лактобактерии активно сбраживали растительный субстрат, с образованием плотного сгустка за 4-5 час роста, и подкислением субстрата с pH 8.0 до 6,0, количество клеток в ферментированном продукте достигало 10^9 КОЕ/см³. Экспериментальный продукт имел очень плотную, однородную консистенцию, без выделения сыворотки и расслоения сгустка, белого цвета, с кисломолочным вкусом и запахом. Белок продукта содержал 17 аминокислот, среди которых 8 незаменимых. В большем количестве присутствовали аспарагиновая и глутаминовая кислоты, аргинин, среди незаменимых аминокислот валин, лейцин и фенилаланин. По количеству белка и

суммы незаменимых аминокислот растительный продукт значительно превосходил кисломолочный из натурального молока. По сравнению со шротом тыквы в составе белка опытного продукта возросло количество незаменимых аминокислот в 1,33 раза.

Новый продукт содержал 8 жирных кислот, с преобладанием незаменимой линолевой кислоты на долю, которой приходилось 53.04 %. В довольно большом количестве – 19.54 % в продукте присутствовала жизненно необходимая олеиновая кислота. В результате микробной модификации шрота почти не изменилось соотношение насыщенных и ненасыщенных жирных кислот, незначительно возросло содержание линолевой и снизилось олеиновой и миристиновой жирных кислот.

Отсутствие лактозы и холестерина, высокое содержанию ненасыщенных жирных кислот, пищевых волокон и молочнокислых бактерий позволяет отнести тыквенный ферментированный продукт к изделиям функциональной направленности.

Список публикаций по теме работы

Тезисы докладов

1. Использование шрота семян подсолнечника для получения высокобелковых лакто-ферментированных напитков" для IX Международной научной конференции "СОВРЕМЕННОЕ СОСТОЯНИЕ, ПРОБЛЕМЫ И ПЕРСПЕКТИВЫ РАЗВИТИЯ АГРАРНОЙ НАУКИ" (PPDAS 2024)

2. Синельников А.В., Уланова Р.В. Новый ферментированный молочнокислыми бактериями растительный продукт // Конференция Innovations in life sciences. Белгородский государственный национальный исследовательский университет. 2023. С. 89-91(URL: <https://repository.rudn.ru/ru/recordsources/recordsource/15388/>)

Sinelnikov Alexey Vladimirovich
RESEARCH CENTER OF BIOTECHNOLOGY RAS

PROSPECTS OF USING LACTIC ACID BACTERIA TO PRODUCE PLANT FUNCTIONAL FOOD PRODUCTS

Abstract. *Vegetable meal products, which are by-products of oil extraction production, have great potential for the development of non-dairy fermented products. As a result of the conducted studies using pumpkin seed meal, lactofermented products were obtained, their organoleptic and physico-chemical properties were studied. The experimental products were characterized by the absence of lactose and cholesterol, high content of protein, essential amino acids, unsaturated fatty acids and lactic acid bacteria.*

Keywords: *lactobacilli, fermentation, functional properties, vegetable meal, digestibility.*

Степанова Наталия Вячеславовна

аспирант ФИЦ Биотехнологии РАН 3 года обучения

научная специальность 1.5.6 Биотехнология

e-mail: nv.stepanova@fbras.ru

Научный руководитель:

Смоликова Галина Николаевна

кандидат биологических наук, доцент

НОЦ по биоинженерии



СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ, СВЯЗАННЫХ С АКТИВНОСТЬЮ РУБИСКО В ЛИСТЬЯХ И ПЛОДАХ ГОРОХА (*PISUM SATIVUM* L.)

Аннотация. Проведен сравнительный анализ экспрессии генов, кодирующих белки-регуляторы активности РуБисКО, который является ключевым ферментом цикла Кальвина и отвечает за связывание CO_2 с рибулозо-1,5-бисфосфатом, в листьях, перикарпии, кожуре и семядолях гороха на стадии созревания семян. Выявлено, что экспрессия генов *Srп60a* и *Srп60b*, которые кодируют шаперонины, объединяющие в комплекс большие субъединицы РуБисКО, была выше в листьях и семядолях, чем в перикарпии и кожуре. Наиболее высокая экспрессия *RCA*, которая кодирует активазу РуБисКО, и *PRK*, которая кодирует фосфорибулокиназу, наблюдалась в листьях, и далее она снижалась в перикарпии, кожуре и семядолях по мере снижения интенсивности освещения.

Ключевые слова: *Pisum sativum* L., эмбриональный фотосинтез, интенсивность освещения, экспрессия генов, РуБисКО.

Фотосинтез — основополагающий процесс, от которого зависит жизнь на Земле. Благодаря фотосинтезу растения преобразуют энергию света в химическую энергию, необходимую для поддержания их метаболизма, и таким образом обеспечивают себя и другие (гетеротрофные) организмы органическими веществами [Stirbet et al., 2020; Björn et al., 2023]. У высших растений механизмы фотосинтеза хорошо изучены для листьев. Однако, в последние годы появились доказательства того, что способность осуществлять фотосинтетические реакции и таким образом ассимилировать дополнительное количество CO_2 доступна и другим зеленым частям растений, напр., черешкам листьев, стеблям, плодам и зеленым семенам [Смоликова и Медведев, 2016; Hu et al., 2019; Simkin et al., 2019; Henry et al., 2020; Shackira et al., 2022]. При этом механизмы протекания фотосинтетических реакций у нелистовых тканей могут отличаться в зависимости от их расположения на растении и доступности света [Lawson and Milliken, 2023]. Ключевым отличием нелистового фотосинтеза является способность использовать несколько источников CO_2 — атмосферный и выделяемый митохондриями при дыхании [Aschan and Pfanz, 2003; Hu et al., 2019].

Объектом нашего исследования являются формирующиеся семена растений с зеленым зародышем. Основным процессом, на который направлен метаболизм формирующихся семян, является накопление запасных питательных веществ [Allen et al., 2009; Allorement et al., 2015]. Для этого требуется сахароза и энергия, которые поступают из

материнского растения. Однако семена способны вырабатывать дополнительное количество АТФ и НАДФН в процессе т.н. эмбрионального фотосинтеза, несмотря на низкий уровень интенсивности света [Ruuska et al., 2004; Schwender et al., 2004].

Ранее нами было показано, что формирующиеся семена *P. sativum*, покрытые тканями перикарпия и кожуры, осуществляют фотохимические реакции при низком уровне красного света и практически полном отсутствии синего света [Смоликова и др., 2023]. Мы предположили, что это происходит благодаря тому, что к зародышу поступает достаточно высокое количество света в зеленой области спектра, который может компенсировать недостаток света в синей области (500–600 нм). Это было нами доказано в экспериментах с выращиванием растений гороха в модульной световой установке под красно-синими светодиодами и красно-синими светодиодами с добавлением зеленых светодиодов [Stepanova et al., 2024a]. Кроме того, нами было обнаружено, что зрелые семена, сформированные в присутствии зеленого света, имели более высокую всхожесть, содержали на 15% больше белка, а также отличались повышенным уровнем орнитина, триптофана, аргинина и аспарагиновой кислоты [Stepanova et al., 2024a]. Однако, требуется более глубокое изучение молекулярных механизмов, лежащих в основе фотозависимых синтетических процессов в формирующихся семенах.

Хорошо известно, что в процессе фиксации CO₂ задействована рибулозо-1,5-бисфосфаткарбоксилаза (РуБисКО), которая является ключевым ферментом цикла Кальвина [Stirbet et al., 2020; Amaral et al., 2024]. Предполагается, что для формирующих семян, по-видимому, достаточно только начальных этапов цикла Кальвина, связанных с фиксацией CO₂ и образованием восстановленных триоз, которые используются на синтез жирных кислот [Schwender et al., 2004]. При этом эффективность фиксации CO₂ зависит не только от количества фермента, но также от регуляции его активности [Gruber and Feiz, 2018; Amaral et al., 2024].

В данной работе мы изучили экспрессию ряда генов, ответственных за синтез белков, которые являются регуляторами активности РуБисКО, в листьях, перикарпии, коже и семядолях гороха на средней стадии созревания семян. К таким генам относятся *Cpn60α* и *Cpn60β* (кодируют шаперонины, которые объединяют в комплекс большие субъединицы РуБисКО), *RCA* (кодирует активазу РуБисКО) и *PRK* (кодирует фосфорибулокиназу). Выявлено, что *Cpn60α* и *Cpn60β* имели в семядолях такой же уровень экспрессии как в листьях, тогда как экспрессия *RCA* и *PRK* была значительно ниже [Stepanova et al., 2024b].

Дальнейшая работа будет направлена на сравнительный анализ экспрессии вышеуказанных генов в листьях и нелистовых тканях гороха, формирующихся при освещении красно-синими светодиодами и красно-синими светодиодами с добавлением зеленого света. Полученные данные позволят глубже понять молекулярные механизмы регуляции эмбрионального фотосинтеза в зависимости от спектрального состава света.

Основные выводы:

1. Экспрессия генов, которые являются регуляторами активности РуБисКО, наблюдалась как в листьях, так и в нелистовых тканях (перикарпии, коже и семядолях) растений *Pisum sativum* L.

2. Экспрессия *Cpn60α* и *Cpn60β*, которые кодируют шаперонины, объединяющие в комплекс большие субъединицы РуБисКО, была выше в листьях и семядолях, чем в перикарпии и кожуре плодов на средней стадии созревания семян.

3. Наиболее высокая экспрессия *RCA*, которая кодирует активазу РуБисКО, и *PRK*, которая кодирует фосфорибулокиназу, наблюдалась в листьях, и далее она снижалась в перикарпии, кожуре и семядолях по мере снижения интенсивности освещения.

Литература

1. Allen D. K., Ohlrogge J. B., Shachar-Hill Y. The role of light in soybean seed filling metabolism //The Plant Journal. – 2009. – Т. 58. – №. 2. – С. 220-234.
2. Alloreant G. et al. Adjustments of embryonic photosynthetic activity modulate seed fitness in *Arabidopsis Thaliana* //New Phytologist. – 2015. – Т. 205. – №. 2. – С. 707-719.
3. Amaral J., Lobo A. K. M., Carmo-Silva E. Regulation of Rubisco activity in crops //New Phytologist. – 2024. – Т. 241. – №. 1. – С. 35-51.
4. Aschan G., Pfanz H. Non-foliar photosynthesis—a strategy of additional carbon acquisition //Flora-Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants. – 2003. – Т. 198. – №. 2. – С. 81-97.
5. Björn L. O., Shevela D., Govindjee G. What is photosynthesis?—A broader and inclusive view //A closer look at photosynthesis. – 2023. – С. 1-22.
6. Gruber A., Feiz L. Rubisco assembly in the chloroplast //Frontiers in Molecular Biosciences. – 2018. – Т. 5. – С. 24.
7. Henry R. J., Furtado A., Rangan P. Pathways of photosynthesis in non-leaf tissues //Biology. – 2020. – Т. 9. – №. 12. – С. 438.
8. Hu L. et al. Photosynthetic characteristics of non-foliar organs in main C3 cereals //Physiologia Plantarum. – 2019. – Т. 166. – №. 1. – С. 226-239.
9. Lawson T., Milliken A. L. Photosynthesis—beyond the leaf //New Phytologist. – 2023. – Т. 238. – №. 1. – С. 55-61.
10. Ruuska S. A., Schwender J., Ohlrogge J. B. The capacity of green oilseeds to utilize photosynthesis to drive biosynthetic processes //Plant physiology. – 2004. – Т. 136. – №. 1. – С. 2700-2709.
11. Schwender J. et al. Rubisco without the Calvin cycle improves the carbon efficiency of developing green seeds //Nature. – 2004. – Т. 432. – №. 7018. – С. 779-782.
12. Shackira A. M. et al. Green seed photosynthesis: What is it? What do we know about it? Where to go? //Plant Physiology Reports. – 2022. – Т. 27. – №. 4. – С. 573-579.
13. Simkin A. J. et al. Photosynthesis in non-foliar tissues: implications for yield //The Plant Journal. – 2020. – Т. 101. – №. 4. – С. 1001-1015.
14. Stepanova N. et al. Green Light Drives Embryonic Photosynthesis and Protein Accumulation in Cotyledons of Developing Pea (*Pisum sativum* L.) Seeds //Agronomy. – 2024a. – Т. 14. – №. 10. – С. 2367.
15. Stepanova N. et al. Non-Foliar Photosynthesis in Pea (*Pisum sativum* L.) Plants: Beyond the Leaves to Inside the Seeds //Plants. – 2024b. – Т. 13. – №. 20. – С. 2945.
16. Stirbet A. et al. PART OF A SPECIAL ISSUE ON FUNCTIONAL-STRUCTURAL PLANT GROWTH MODELLING //ANNALS OF BOTANY. – 2020. – Т. 126. – №. 4. – С. 511-537.

17. Смоликова Г. Н., Медведев С. С. Фотосинтез в семенах хлороэмбриофитов // Физиология растений. – 2016. – Т. 63. – №. 1. – С. 3-3.

18. 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 // Вавиловский журнал генетики и селекции. – 2023. – Т. 27. – №. 8. – С. 980.

Список публикаций по теме:

Статьи

1. Stepanova N., Tarakhovskaya E., Soboleva A., Orlova A., Basnet A., Smolenskaya A., Frolova N., Bilova T., Kamionskaya A., Frolov A., Medvedev S., Smolikova G. Green Light Drives Embryonic Photosynthesis and Protein Accumulation in Cotyledons of Developing Pea (*Pisum sativum* L.) Seeds // Agronomy. – 2024. – Т. 14. – №. 10. – С. 2367.

2. Stepanova N., Zhilkina T., Kamionskaya A., Smolikova G. Non-Foliar Photosynthesis in Pea (*Pisum sativum* L.) Plants: Beyond the Leaves to Inside the Seeds // Plants. – 2024. – Т. 13. – №. 20. – С. 2945.

3. 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 // Вавиловский журнал генетики и селекции. – 2023. – Т. 27. – №. 8. – С. 980.

Тезисы докладов

1. Степанова Н.В., Жилкина Т.А., Камионская А.М., Смоликова Г.Н. Изучение экспрессии генов, кодирующих хлоропластные белки в тканях формирующихся плодов гороха (*Pisum sativum* L.) в связи с их фотохимической активностью // Материалы IV Международной научно-практической конференции «Геномика и современные биотехнологии в размножении, селекции и сохранении растений», Москва, 7–11 октября 2024 г., С. 145-146.

2. 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.

3. 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., С. 339.

4. 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., С. 336.

5. 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., С. 385.

6. 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.

7. 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.

Stepanova Natalia Vyacheslavovna
RESEARCH CENTER OF BIOTECHNOLOGY RAS

COMPARATIVE ANALYSIS OF THE EXPRESSION OF GENES ASSOCIATED WITH RUBISCO ACTIVITY IN THE LEAVES AND PODS OF PEA (*PISUM SATIVUM* L.)

Abstract. *A comparative analysis of the expression of genes encoding proteins that regulate the Rubisco activity, the key enzyme of the Calvin cycle responsible for the binding of CO₂ to ribulose-1,5-bisphosphate, was carried out in the leaves, pericarps, coats, and cotyledons of pea at the seed maturation stage. The expression of the Cpn60 α and Cpn60 β genes, which encode chaperonins that assemble the large subunits of Rubisco into a complex, was higher in the leaves and cotyledons than in the pericarps and coats. The highest expression of RCA, which encodes Rubisco activase, and PRK, which encodes phosphoribulokinase, was observed in the leaves and subsequently downregulated in the pericarps, coats, and cotyledons with decreasing light intensity.*

Keywords: *Pisum sativum* L., embryonic photosynthesis, light intensity, gene expression, RuBisCO.

Шевцов Андрей Вадимович

аспирант ФИЦ Биотехнологии РАН 3 года обучения
научная специальность 1.5.8 Математическая биология,
биоинформатика

e-mail: andreader@yandex.ru

Научный руководитель

Медведева Юлия Анатольевна

к.б.н., с.н.с. группы регуляторной транскриптомики и эпигеномики



Конвейер для масштабной идентификации аллель специфичной экспрессии по данным 5'-scRNA-seq на основе инструмента Nextflow

Аннотация. Объем и разнообразие доступных для анализа данных секвенирования данных постоянно растет. Эти данные обладают своими специфическими особенностями (такими как разреженность, техническая вариативность и высокая размерность), что создает сложность для анализа и необходимость комбинировать различные инструменты и методы. Создание скриптов для объединения различных инструментов в единый процесс часто плохо масштабируется на большое количество данных. Появляется проблемы с распараллеливанием процессов, использованием разных окружений. В этом исследовании мы собрали конвейер для определения аллель специфичной экспрессии по данным 5' секвенирования транскриптома единичных клеток (5'-scRNA-seq) на основе менеджера процессов NextFlow. Созданный конвейер позволяет распределять нагрузку по вычислительным ядрам на всех стадиях обработки, использовать данные на разных стадиях обработки. В дополнение мы создали контейнер, который позволяет запускать вычисление на разных машинах. Для проверки работоспособности мы протестировали конвейер на данных экспрессии генов мононуклеаров крови от 50 доноров с разделением на типы клеток.

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

Аллель-специфическая экспрессия представляет собой событие, когда один аллель в гене экспрессируется больше, чем другой [1]. Однонуклеотидные замены, в районе которых происходит такое событие, могут быть причиной изменения связывания транскрипционного фактора в данном участке и как следствие изменения уровня экспрессии. Поиск аллель специфичных событий позволяет определить возможные регуляторные мутации, приводящие к изменению фенотипа.

Изначально для поиска аллель специфичной экспрессии использовалось секвенирование образцов, полученных из значительного числа клеток, без разделения на отдельные типы клеток (bulk sequencing). Однако, разные типы клеток имеют разные специфические профили экспрессии, это ухудшает сигнал и затрудняет поиск важных регуляторных эффектов. Секвенирование единичных клеток (scRNA seq) позволяет выявлять клеточные типы и анализировать клетко-специфичные эффекты. Секвенирование с 5' конца (5'-RNAseq)- это альтернатива популярному 3'-RNAseq методу, которая

дополнительно дает возможность определения цис – регуляторных элементов (CRE) которые обычно располагаются как раз на 5' конце транскрипта [2].

Поиск аллель специфичной экспрессии — это многостадийный процесс, для которого требуется использовать несколько инструментов, каждый имеет свои зависимости и особенности запуска. Самое простое решение для организации этих инструментов это написание `bash` скриптов с последовательным запуском. Такое решение позволяет достаточно быстро запустить процессы, но оно не эффективно переносится на новые данные и слабо адаптировано для множественного запуска. Nextflow- менеджер процессов, который позволяет избежать большого количества проблем с организацией инструментов, улучшает логирование процессов. В данной работе мы подготовили NextFlow [3] конвейер для массового анализа 5'-RNAseq и определения аллель специфичной экспрессии на основе этих данных.

Данный конвейер принимает на вход предобработанные данные в форматах FASTA, FASTq, BAM. Пользователь также может дополнительно использовать метаданные для получения результатов по интересующим группам, содержащимся в данных.

На первом этапе (SPLIT FASTQ) предполагается, что файлы нескольких образцов (например, несколько пациентов) делятся на группы, представленные во входных метаданных. Такое разделение позволяет обрабатывать данные в больше потоков. Данная стадия реализована с помощью скрипта на python. По умолчанию на этой стадии каждый процесс занимает 1 ядро CPU и 4 GPU оперативной памяти.

На следующем этапе происходит обрезка адаптеров с ридов и выравнивание из на референсный геном методом HISAT2 [4]. Выравнивание проводится при каждом запуске для консистентности алгоритма выравнивания с последующей стадией коррекции выравнивания альтернативных аллелей методом WASP (на стадии подсчета каунтов аллелей). Выровненные данные фильтруются по качеству. Дубликаты ридов удаляются инструментом `umi_tools dedup`. Определение однонуклеотидных замен осуществляется методом `bcftools mpileup`. При определении вариантов данные объединяются по образцам и делятся по геномным позициям (по хромосомам) для ускорения вычислений. Полученные варианты фильтруются (качество генотипирования ≥ 50 , количество ридов на аллель ≥ 5). Далее выравнивание ридов в альтернативных позициях корректируется методом WASP [5]. Поиск аллель – специфичных вариантов осуществляется с помощью MIXALIME (MIXture models for ALlelic IMbalance Estimation in high-throughput sequencing data) [6]. Полная схема обработки данных показана на рисунке 1.

Дополнительно в процессе работы конвейера выдается несколько отчетов для проверки промежуточных результатов: качество выравнивания (`multiqc`), оценка оптимизированных параметров модели MIXALIME (график тестирования модели), и график зависимости доли аннотированных аллель- специфичных вариантов от порога значимости.

Для возможности использования конвейера на разных вычислительных кластерах мы создали Docker [7] контейнер с зависимостями для необходимых библиотек.

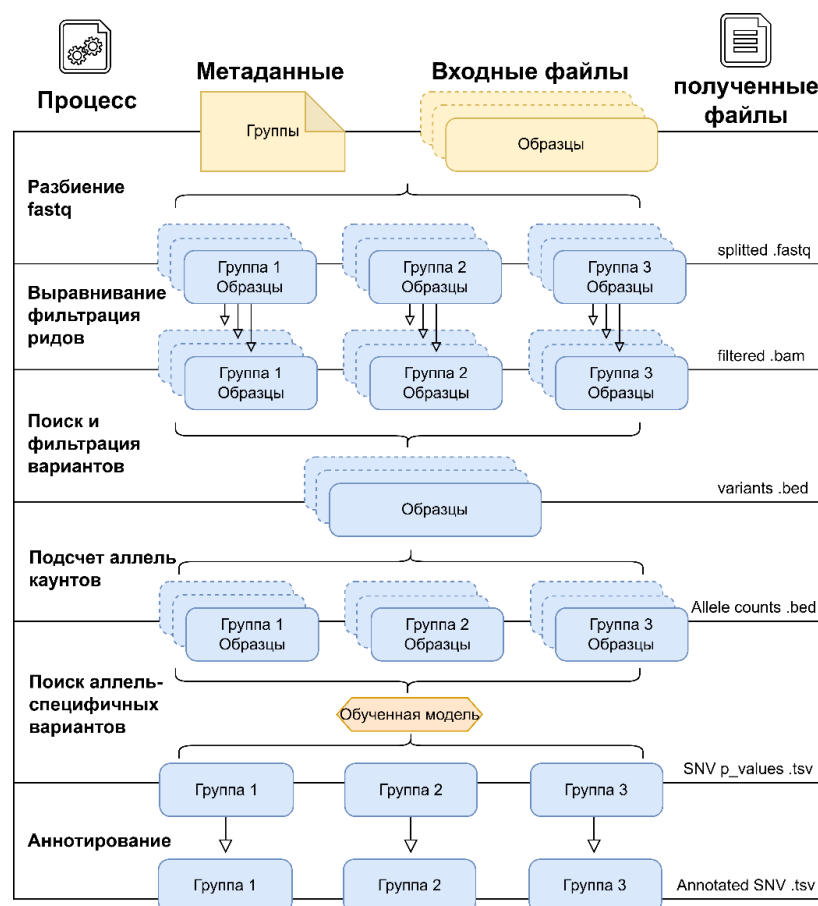


Рисунок 1. Схема работы конвейера для получения аллель- специфичной экспрессии по данным 5`-scRNA-seq. Желтым указаны данные для подачи в конвейер. Синим указана структура движения данных внутри конвейера. Оранжевый шестиугольник- модель MIXALIME с оптимизированными параметрами. Слева указано название процесса в справа – тип данных получаемый на каждом шаге обработки.

Основные выводы:

Создан конвейер для массовой обработки данных 5`-RNAseq с целью автоматического выявления событий аллель специфичной экспрессии. На каждой стадии, определено оптимальное разделение данных для параллельной обработки. Конвейер адаптирован к разным входным данным и разным вычислительным кластерам за счет контейнеризации виртуального окружения и конфигурирования. Работоспособность конвейера проверена на корпусе данных из 50 доноров.

Литература:

1. Liu, Zhi, Xiao Dong, and Yixue Li. 2018. "A Genome-Wide Study of Allele-Specific Expression in Colorectal Cancer." *Frontiers in Genetics* 9 (November):414764.
2. Li, Yun, Zheng Huang, Zhaojun Zhang, Qifei Wang, Fengxian Li, Shufang Wang, Xin Ji, Shaokun Shu, Xiangdong Fang, and Lan Jiang. 2023. "FIPRESKI: Droplet Microfluidics Based Combinatorial Indexing for Massive-Scale 5'-End Single-Cell RNA Sequencing." *Genome Biology* 24 (1): 1–32.

3. Di Tommaso, Paolo, Maria Chatzou, Evan W. Floden, Pablo Prieto Barja, Emilio Palumbo, and Cedric Notredame. 2017. “Nextflow Enables Reproducible Computational Workflows.” *Nature Biotechnology* 35 (4): 316–19.
4. Kim, Daehwan, Joseph M. Paggi, Chanhee Park, Christopher Bennett, and Steven L. Salzberg. 2019. “Graph-Based Genome Alignment and Genotyping with HISAT2 and HISAT-Genotype.” *Nature Biotechnology* 37 (8): 907–15.
5. Geijn, Bryce van de, Graham McVicker, Yoav Gilad, and Jonathan K. Pritchard. 2015. “WASP: Allele-Specific Software for Robust Molecular Quantitative Trait Locus Discovery.” *Nature Methods* 12 (11): 1061–63.
6. 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>
7. Ratliff, Simeon. 2025. “Docker: Accelerated Container Application Development.” Docker. Simeon Ratliff. April 9, 2025. <https://www.docker.com/>.

Shevtsov Andrey Vadimovich
RESEARCH CENTER OF BIOTECHNOLOGY RAS

A NEXTFLOW-BASED PIPELINE FOR ALLELE SPECIFIC EXPRESSION DETECTION FROM 5' SINGLE-CELL RNA-SEQ DATA

Abstract. *The amount of single-cell RNA sequencing data grows quickly as researchers use it to answer biological questions. Sequencing data is often complex and imperfect because of sparsity, batch effects, and high dimensionality. To address these issues, many different analysis tools appear. Organizing these tools with simple bash scripts does not scale well and is hard to reproduce. Workflow managers like Nextflow help resolving these problems. Here, we present a Nextflow-based pipeline for detecting allelic imbalance in 5' scRNA-seq data. Our pipeline processes data in parallel and uses DOCKER container to run on different types of computers (e.g. SLURM). We test our pipeline with a public dataset of 50 patients. We believe our pipeline can help researchers work with large single-cell studies and supports collaborative projects.*

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

Багаева Дарья Игорьевна

аспирант ФИЦ Биотехнологии РАН 2 года обучения

научная специальность 1.5.4 Биохимия

e-mail: багаева115@mail.ru

Научный руководитель

Шлеева Маргарита Олеговна

доктор биологических наук

в.н.с., зав. лабораторией биохимии стрессов микроорганизмов



РОЛЬ MSMEG_0614 В ОБЕСПЕЧЕНИИ выживаемости и устойчивости к окислительному стрессу покоящихся клеток *Mycobacterium smegmatis*

Аннотация. Ранее нами был найден уникальный путь метаболизма порфиринов у микобактерий, включающий метилирование копропорфирина III с образованием тетраметилового эфира копропорфирина III (ТМК). Установлено, что ТМК накапливается в клеточной стенке микобактерий при переходе в покоящееся состояние, и фермент MSMEG_0614, обладающий активностью метилтрансферазы, играет ключевую роль в его синтезе.

Для выяснения влияния этого фермента и образующегося ТМК на физиологические процессы в микобактериях, особенно в состоянии покоя, нами был сконструирован мутантный штамм *M. smegmatis* с делецией гена MSMEG_0614 (Δ 0614). Сравнительный анализ показал, что в клетках штамма Δ 0614 наблюдается значительное снижение содержания ТМК по мере перехода бактерий в позднюю стационарную фазу роста, а также в состояние покоя по сравнению со штаммом дикого типа (WT).

Для оценки влияния дефицита ТМК в мембранах микобактерий на устойчивость к внешним воздействиям была проведена фотодинамическая инактивация (ФДИ) покоящихся клеток штаммов Δ 0614 и WT с использованием света с длиной волны 565 нм. После воздействия светом определяли жизнеспособность штаммов. В результате, штамм Δ 0614 продемонстрировал повышенную чувствительность к ФДИ по сравнению с WT. Полученные результаты свидетельствуют о важной роли ТМК в адаптации микобактерий к состоянию покоя и обеспечении устойчивости к внешним воздействиям, включая ФДИ. Необходимы дальнейшие исследования для выяснения молекулярных механизмов, посредством которых ТМК стабилизирует мембраны и обеспечивает устойчивость к стрессу. Изучение этих механизмов может открыть новые возможности для разработки стратегий повышения эффективности ФДТ против персистирующих форм микобактерий.

Ключевые слова: микобактерии, тетраметиловый эфир копропорфирина III, метилтрансферазы, ФДИ.

Ранее обнаруженный нами уникальный путь метаболизма порфиринов у микобактерий, включающий метилирование копропорфирина III с образованием тетраметилового эфира копропорфирина III (ТМК), представляет интерес для понимания адаптации микобактерий к покоящемуся состоянию [1]. ТМК накапливается в клеточной

стенке микобактерий при переходе в покоящееся состояние, и фермент MSMEG_0614 (метилтрансфераза) отвечает за его синтез [2].

Работа направлена на исследование влияния делеции гена MSMEG_0614 и связанного с ней изменения уровня ТМК на физиологию и устойчивость *M. smegmatis* к фотодинамической инактивации (ФДИ).

Для реализации поставленной цели нами был сконструирован мутантный штамм *M. smegmatis* с делецией гена MSMEG_0614 (Δ 0614) и проведена оценка содержания ТМК в штамме Δ 0614 и диком типе (WT) как в активно-растущих, так и в покоящихся клетках. При культивировании мутантного и контрольного штаммов в среде Сотона с начальным pH 6.0, штамм с делецией гена MSMEG_0614 демонстрировал значительное снижение уровня ТМК, хотя метаболит все еще обнаруживался, особенно в период активного роста. Было обнаружено, что в клетках Δ 0614 содержание ТМК снижается по мере перехода бактерий в позднее стационарное состояние в 3,5 раза, а в покоящемся состоянии в 45 раз, по сравнению с диким типом. В фазе покоя (70 дней) уровни ТМК в клетках штамма Δ 0614 снизились до неопределяемых значений. Судя по всему, помимо метилтрансферазы MSMEG_0614, в логарифмической фазе и, возможно, в ранней стационарной фазе активна другая трансфераза. Активность MSMEG_0614 становится очевидной в течение продолжительной стационарной фазы.

Для выявления потенциальных метилтрансфераз, способных компенсировать отсутствие MSMEG_0614, был проведен поиск гомологов MSMEG_0614 в геноме *M. smegmatis* с использованием программы BLAST. В результате анализа были идентифицированы следующие метилтрансферазы, демонстрирующие значительное сходство с MSMEG_0614:

- MSMEG_1480 (53,74% идентичности, покрытие 71%)
- MSMEG_1888 (47,91% идентичности, покрытие 70%)
- MSMEG_0093 (45,95% идентичности, покрытие 99%)
- MSMEG_1482 (44,95% идентичности, покрытие 92%)
- MSMEG_1479 (44,86% идентичности, покрытие 94%)
- MSMEG_0095 (44,75% идентичности, покрытие 94%)
- MSMEG_1481 (44,48% идентичности, покрытие 92%)

Важно отметить, что эти же гены были независимо определены как гомологи MSMEG_0614 по данным веб-портала Rock lab (<https://pebble.rockefeller.edu/genes/MC2-155/MSMEG0614/>).

В дальнейшем планируется экспериментально исследовать способность этих гомологичных метилтрансфераз катализировать метилирование копропорфина.

Роль MSMEG_0614 и ТМК в фоточувствительности была изучена с использованием покоящихся форм *M. smegmatis*. Покоящиеся клетки дикого типа, накапливающие ТМК даже без добавления 5-АЛК (5-аминолевулиновой кислоты), сравнивали со штаммом с делецией гена метилтрансферазы MSMEG_0614 (с пониженным содержанием ТМК) и комплементированным штаммом. Для оценки фоточувствительности штаммы Δ 0614 и WT подвергали воздействию света с длиной волны 565 нм (плотность мощности 180 мВт/см²) в течение 30 мин. Влияние ФДИ на жизнеспособность клеток *M. smegmatis* оценивали путем подсчета количества колониеобразующих единиц (КОЕ, кл/мл) после высева на плотную питательную среду МПБ. Анализ показал, что штамм Δ 0614 (с делецией гена

MSMEG_0614) проявляет значительно более высокую фоточувствительность к облучению светом с длиной волны 565 нм по сравнению с контрольным штаммом дикого типа.

В частности, жизнеспособность штамма Δ0614 после облучения снижалась на 3,5 десятичных порядка по сравнению с необлученными клетками этого же штамма. В то же время, жизнеспособность штамма дикого типа снизилась лишь приблизительно на 2 десятичных порядка, что соответствует уменьшению количества жизнеспособных клеток примерно в 100 раз. Несмотря на первоначальное предположение о снижении фоточувствительности мутантного штамма Δ0614, основанное на снижении уровня ТМК, результаты экспериментов показали обратное – штамм Δ0614 демонстрировал повышенную чувствительность к фотодинамической инактивации по сравнению со штаммом дикого типа. Данный неожиданный результат указывает на сложную и пока не до конца понятую роль ТМК в адаптации и выживании *M. smegmatis* при воздействии светового стресса.

Основные выводы:

1. Установлено, что ген MSMEG_0614 является основным фактором, определяющим уровень ТМК в покоящихся клетках и в поздней стационарной фазе роста *M. smegmatis*. В логарифмической фазе роста, несмотря на отсутствие MSMEG_0614, наблюдается синтез ТМК, что позволяет предположить существование альтернативных метилтрансфераз, активных на ранних этапах роста культуры.

2. Делеция гена MSMEG_0614 повышает чувствительность покоящихся форм *M. smegmatis* к фотодинамической инактивации, что, вероятно, связано с нарушением метаболизма порфиринов и снижением устойчивости клеточных мембран к окислительному стрессу, вызванному ФДИ.

Делеция гена MSMEG_0614, приводящая к снижению уровня ТМК, делает *M. smegmatis* более уязвимым к ФДИ, что указывает на защитную роль ТМК, предположительно связанную со стабилизацией мембран. Требуется дальнейшие исследования для подтверждения этой гипотезы и разработки новых терапевтических стратегий.

Литература

12. Nikitushkin V.D., Shleeva M.O., Zinin A.I. et al. The main pigment of the dormant *Mycobacterium smegmatis* is porphyrin // FEMS Microbiology Letters. – 2016. – v. 363. fnw206.

13. 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.

Список публикаций по теме работы

Статьи

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.

Bagaeva Daria Igorevna
RESEARCH CENTER OF BIOTECHNOLOGY RAS

**THE ROLE OF MSMEG_0614 IN ENSURING THE SURVIVAL AND
RESISTANCE TO OXIDATIVE STRESS OF RESTING *MYCOBACTERIUM*
SMEGMATIS CELLS**

Abstract. *Previously, we discovered a unique porphyrin metabolism pathway in mycobacteria, involving the methylation of coproporphyrin III to form coproporphyrin III tetramethyl ester (TMC). It was found that TMC accumulates in the mycobacterial cell wall during transition into a dormant state, and the enzyme MSMEG_0614, possessing methyltransferase activity, plays a key role in its synthesis.*

*To investigate the influence of this enzyme and the resulting TMC on physiological processes in mycobacteria, especially during dormancy, we constructed a mutant strain of *M. smegmatis* with a deletion of the MSMEG_0614 gene (Δ 0614). Comparative analysis revealed that the Δ 0614 strain cells exhibited a significant reduction in TMC content as the bacteria transitioned into the late stationary growth phase, as well as during the dormant state, compared to the wild-type (WT) strain.*

To assess the impact of TMC deficiency in mycobacterial membranes on resistance to external stressors, we performed photodynamic inactivation (PDI) of dormant cells of the Δ 0614 and WT strains using light with a wavelength of 565 nm. Cell viability was determined after light exposure. As a result, the Δ 0614 strain demonstrated increased sensitivity to PDI compared to the WT strain. These results suggest an important role for TMC in the adaptation of mycobacteria to the dormant state and in providing resistance to external stressors, including PDI. Further research is needed to elucidate the molecular mechanisms by which TMC stabilizes membranes and provides stress resistance. Studying these mechanisms may open up new opportunities for developing strategies to improve the efficacy of photodynamic therapy (PDT) against persistent forms of mycobacteria.

Keywords: *mycobacteria, coproporphyrin III tetramethyl ester, methyltransferases, PDI.*

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

Володина Вероника Николаевна

аспирант ФИЦ Биотехнологии РАН 2 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



СРАВНЕНИЕ ТОКСИЧЕСКОЙ МОДЕЛИ РАССЕЯННОГО СКЛЕРОЗА НА МЫШАХ С РАЗЛИЧНЫМ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИМ СТАТУСОМ (SPF И NON-SPF)

Аннотация. Рассеянный склероз до сих пор остается малоизученным заболеванием, приводящим к ранней инвалидизации и существенному снижению качества жизни. Ранее основная роль в развитии этого заболевания отводилась аутоиммунным и генетическим механизмам, но на данный момент идет переосмысление патогенеза демиелинизации. Современные исследования показали, что аутоиммунная причина не является основной. В частности, особое место в скорости развития и выраженности клинических признаков занимает микробиологический статус животного. Токсическую модель РС на животных получают с помощью токсических демиелинизирующих агентов, в частности купризона. Купризон относится к классу полидентатных соединений, способных связывать как медь, так и другие металлы. Ранее нами было показано на мышах C57Black/6 с SPF (Specific pathogen free)-статусом, длительное поступление купризона с кормом приводило к появлению признаков демиелинизации, что подтверждалось МРТ, клиническими и поведенческими тестами, а также гистологическими исследованиями [1]. В данном исследовании токсическую модель получали на той же линии, но не обладающих статусом SPF. Результаты, полученные в ходе эксперимента, отличались от полученных нами ранее. На МР-сканах обнаруживались новые очаги повреждения в области миндалевидного тела, мозолистого тела, что сопровождалось новыми клиническими и поведенческими особенностями, а именно: нарушенной реакцией на стресс, отсутствием ожидаемого снижения дистальных моторных функций, катаплексия и «генерализованная паническая атака». Наличие или отсутствие SPF-статуса у животных имеет принципиальное значение при получении модели РС. Необходима стандартизация и валидация такой модели для получения воспроизводимых результатов и для проведения доклинических исследований.

Ключевые слова: МРТ, купризоновая модель, мышинная модель, рассеянный склероз, микробиом кишечника.

Целью исследования является выбор оптимальной для исследования рассеянного склероза мышинной модели, в частности, изучение развития МРТ-признаков демиелинизации при индукции модели купризоном у животных, различающихся по микробиологическому статусу.

В эксперименте использовались 12-недельные самки мышей линии C57Black/6 из питомника «Андреевка». Всего в эксперименте было исследовано 50 мышей. В данном

питомнике животные не сертифицированы как SPF. Животные подвергали 14 дневному карантину. Далее в ходе эксперимента мыши в течение 90 дней получали корм с добавкой купризона из расчета 400 мг добавки на 100 г корма. Корм обновлялся 1 раз в 2 дня. Мышей оценивали по клиническим, поведенческим признакам, а также инструментальными методами (МРТ).

МРТ-сканы получали на 1 Т МРТ-системе (Аспект Имиджинг, Израиль) для мелких лабораторных животных. (ссылка на наши тезисы). Режимы сканирования были T2w FSE (T2-weighted fast spin echo) и T1wGRE (T1-weighted gradient echo). Параметры режима T2w FSE: TR / TE 3000/69,1, FOV 25x25, матрица 168x168, ETL 12, NEX 10, количество срезов 13; режима T1wGRE TR / TE = 320/ 13,7 мс, NEX 10, FOV 25x25 мм, матрица 256x256, количество срезов 15. Сканирование животных производилось под газовой анестезией (изофлюран), в среднем 1 с=раз в 7-10 дней для контрастирования использовался препарат гадолиния «Гадовист» (Байер АГ (Германия)). В качестве способа введения контраста использовали подкожное введение (в холку) в связи с ранее выявленными частыми случаями некроза хвоста при введении в хвостовую латеральную вену. Полученные сканы анализировали в программе ImageJ Fiji.

В качестве поведенческих тестов использовали тест открытого поля, производимый сотрудниками вивария.

Далее мышей подвергали эвтаназии для получения гистохимических срезов головного мозга, а также для выявления РНК и белковых маркеров патогенеза. Для изъятия головного мозга мышей усыпляли севофлюраном, далее производили вскрытие, совмещенное и транскардиальной перфузией. Перфузия заключалась во введении с помощью насоса в левый желудочек сердца ледяного PBS до просветления печени. Затем поступление PBS останавливали и начинали вводить 10% раствор формалина до полной ригидности мышечной системы. Мозг извлекали и помещали на сутки в 4% раствор параформальдегида или 10% формалина, затем в 10% и 30% растворы сахарозы соответственно, для криопротекции. Далее замораживали для получения криосрезов и гистологического окрашивания.

В ходе изучения купризоновой модели рассеянного склероза нами было выявлено, что у мышей линии C57/BL SPF и обычной линии C57/BL клинические проявления и степень их выраженности различна. Линия SPF имела более однородные симптомы, относительно одинаковой тяжести, что соответствовало 1,5–2 баллам по шкале клинических признаков рассеянного склероза. У животных, без статуса SPF и содержащихся в обычном виварии, симптоматика различалась от животного к животному. В ходе наблюдений были выделены 2 группы, каждая с похожими клиническими проявлениями. Первая группа характеризовалась нарушенной реакцией на стресс, что также было сопряжено с патологическим очагом в области миндалевидного тела, а также повреждении мозолистого тела, выявленных при МР-сканировании (рис. 1а). Вторая группа имела только повреждение мозолистого тела, видимые на снимках МРТ, но признаков повреждения миндалевидного тела не было ни в клиническом проявлении, ни при инструментальных методах анализа (МРТ) (рис. 1в).

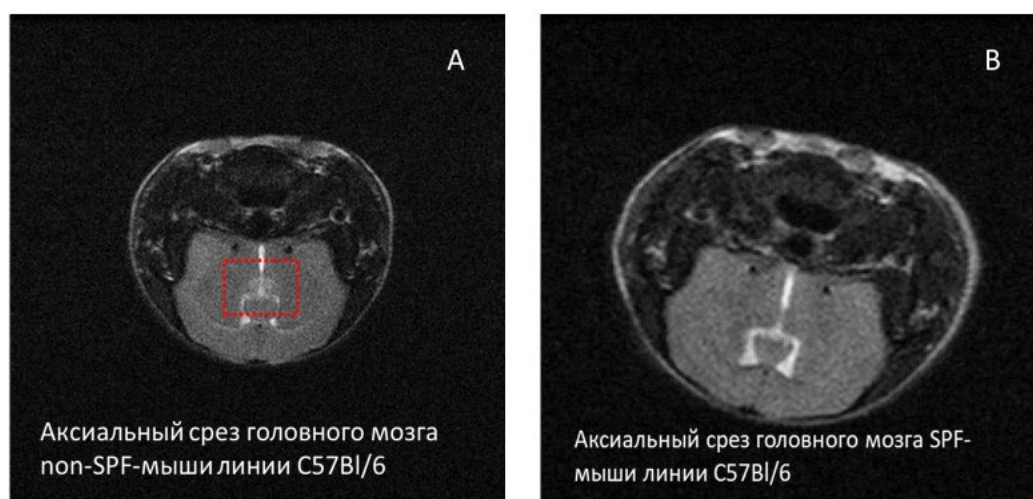


Рисунок 1 – снимки МРТ головного мозга мышей non-SPF (А) и SPF (В). На рисунке слева видно присутствие овального очага накопления контраста.

Особо стоит отметить, что мыши, имеющие т. н. «дикий» тип микрофлоры, на момент приема купризона отличались большей агрессивностью. Наблюдались случаи каннибализма: около 10 мышей пали в результате агрессии сородичей. Предположительно это связано с патологическим очагом, затрагивающим миндалевидное тело. К функциям, осуществляющимся миндалевидным телом, относятся такие поведенческие реакции как агрессия, способность к обучению. В ходе поведенческих тестов была отмечена сниженная мотивация к обучению, а в тестах открытого поля наблюдалось хаотичное поведение.

Стоит особое внимание уделить таким отличиям, как катаплексия и «генерализованная паническая атака» у мышей, не обладающих статусом SPF. Другой особенностью, характеризующей иное течение развития поражений при применении купризона, является поведение животного при выходе из наркоза. Нами была отмечена выраженная спастичность мышц при пробуждении - гипертонус, а также временный полный паралич тазовых конечностей. Так как животные получали купризон перорально, имели одинаковый возраст, вес, состоянию здоровья, полу и породе, мы предположили, что в патогенезе утилизации купризона и патогенезе развития экспериментальной демиелинизации важное значение имеет микробиологический статус, в том числе микрофлора кишечника.

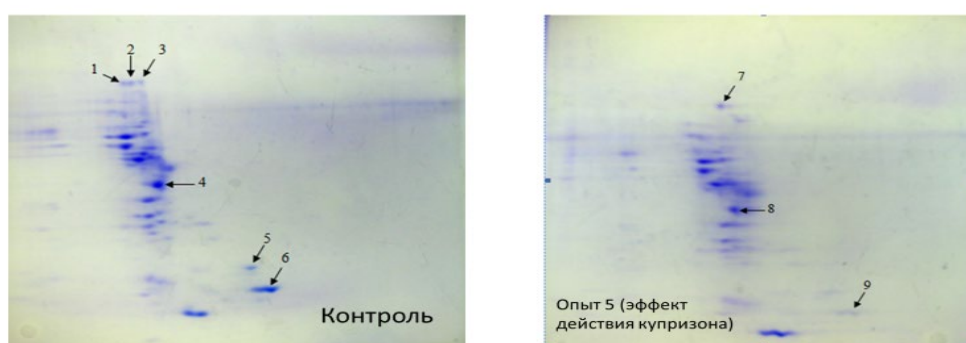


Рисунок 2 – 2 D-форез белков, полученных из лизатов ткани головного мозга контрольной (слева) и экспериментальной (справа) мыши, получавшей купризон.

По результатам двумерного электрофореза (2D-ЭФ), включающего анализ электрофоретической подвижности и изоэлектрического фокусирования полного спектра белков, выделенных из головного мозга животных, были выявлены различия в экспрессии 18 белков. Предварительный результат представлен на рис.2.

Основные выводы

Результаты, полученные на мышах с «дикой микрофлорой», отличались от полученных нами ранее на мышах той же линии SPF, свободной от патогенной микрофлоры. На МР-сканах обнаруживались новые очаги повреждения в области миндалевидного тела, мозолистого тела, что сопровождалось новыми клиническими и поведенческими признаками, а именно: нарушенной реакцией на стресс, отсутствием ожидаемого снижения дистальных моторных функций, катаплексией и состоянием, которое описывается в некоторых источниках как «генерализованная паническая атака». Изучение белкового спектра, выделенного из клеток головного мозга мышей, продемонстрировало различия в экспрессии как минимум 18 белков.

Наличие или отсутствие SPF-статуса у животных имеет принципиальное значение при получении модели РС. Необходима стандартизация и валидация такой модели для получения воспроизводимых результатов, в том числе для проведения доклинических исследований.

Особую благодарность выражаем Ковалеву Леониду Ивановичу за помощь в осуществлении 2D – электрофореза белков.

Литература

1. Jangi S. et al. Alterations of the human gut microbiome in multiple sclerosis //Nature communications. – 2016. – Т. 7. – №. 1. – С. 12015.
2. Preiningerova J. L. et al. Multiple sclerosis and microbiome //Biomolecules. – 2022. – Т. 12. – №. 3. – С. 433.
3. Moles L. et al. Gut microbiota changes in experimental autoimmune encephalomyelitis and cuprizone mice models //ACS Chemical Neuroscience. – 2021. – Т. 12. – №. 5. – С. 893-905.
4. Wang X. et al. (R)-ketamine ameliorates demyelination and facilitates remyelination in cuprizone-treated mice: a role of gut–microbiota–brain axis //Neurobiology of Disease. – 2022. – Т. 165. – С. 105635.

Список публикаций по теме работы

Тезисы

1. ХОЛОЭКСПО 2024 : XXI Международная конференция по голографии и прикладным оптическим технологиям (Казань, 9–13 сентября 2024 года) : тезисы докладов / Общество с ограниченной ответственностью «Холоэкспо наука и практика». — Москва : Издательство МГТУ им. Н.Э. Баумана, 2024. — С.333-334.
2. Володина В.Н., Зайцев П.Е., Струкова В.А. [и др.]. ПОЛУЧЕНИЕ ТОКСИЧЕСКОЙ МОДЕЛИ РАССЕЯННОГО СКЛЕРОЗА НА МЫШАХ И ИЗУЧЕНИЕ ТЕРАПЕВТИЧЕСКОГО ЭФФЕКТА ВИНДЕБУРНОЛА НА ОСНОВЕ МРТ-МОНИТОРИНГА. В сб.: Сборник научных трудов Всероссийской конференции с международным участием «Биомедицинская химия: наука и практика»; 2024: С. 33-33.

**COMPARISON OF A TOXIC MODEL OF MULTIPLE SCLEROSIS IN MICE
WITH DIFFERENT MICROBIOLOGICAL STATUS (SPF AND NON-SPF)**

Abstract. *Multiple sclerosis is still a poorly understood disease that leads to early disability and a significant decrease in the quality of life. Previously, autoimmune and genetic mechanisms played a major role in the development of this disease, but at the moment there is a rethinking of the pathogenesis of demyelination. Modern research has shown that the autoimmune cause is not the main one. In particular, the microbiological status of the animal occupies a special place in the rate of development and severity of clinical signs. A toxic model of MS in animals is obtained using toxic demyelinating agents, in particular cuprizone. Cuprizone belongs to the class of polydentate compounds capable of binding both copper and other metals. Previously, we showed in C57Black/6 mice with SPF (Specific pathogen free) status that prolonged intake of cuprizone with food led to signs of demyelination, which was confirmed by MRI, clinical and behavioral tests, as well as histological studies [1]. In this study, a toxic model was obtained on the same line, but without SPF status. The results obtained during the experiment differed from those obtained earlier. MR scans revealed new lesions in the amygdala and corpus callosum, which were accompanied by new clinical and behavioral features, namely: impaired stress response, lack of an expected decrease in distal motor functions, cataplexy, and "generalized panic attack." The presence or absence of SPF status in animals is of fundamental importance in obtaining the MS model. Standardization and validation of such a model is necessary to obtain reproducible results and to conduct preclinical studies.*

Keywords: *MRI, cuprizone model, mouse model, multiple sclerosis, gut microbiome.*

Ефремова Анастасия Дмитриевна

аспирант ФИЦ Биотехнологии РАН II 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 5'-НУКЛЕОТИДАЗЫ ИЗ *LIMOSILACTOBACILLUS REUTERI*

Аннотация. Неуклонно растёт резистентность патогенных бактерий к антибиотикам, борьба с которой определяет необходимость разработки новых антибактериальных белковых препаратов. Данное исследование направлено на изучение основных свойств и особенностей пространственных структур некоторых ферментов лактобактерий для потенциальной разработки лекарственных препаратов на их основе. Объектом настоящего исследования является фермент 5'-нуклеотидаза, выбор которого обусловлен его секрецией бактериями *Limosilactobacillus reuteri* при совместном культивировании с патогенным штаммом *Klebsiella* [1].

Ключевые слова: 5'-нуклеотидаза, *Limosilactobacillus reuteri*, патогенные бактерии, пробиотики, антимикробная активность, мультирезистентность.

В настоящее время существует широкий спектр бактерий, патогенность которых повышается благодаря их способности адаптироваться к действию антибиотиков. В 2020 году Всемирная организация здравоохранения подчеркнула важность разработки новых фармацевтических препаратов для борьбы с бактериями с множественной лекарственной устойчивостью [2]. Годом позднее было показано, что некоторые штаммы молочнокислых бактерий ингибируют рост и устойчивость *K. pneumoniae*, выделяя при этом белки с потенциальной антимикробной активностью, включающих в себя нуклеотидазу (MBU5982646.1) [1].

Целью данного исследования является получение бифункциональной металлофосфатазы (5'-нуклеотидазы) лактобактерий и изучение её структурно-функциональных взаимосвязей. 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 [3-5]. Благодаря тому, что этот вид микроорганизмов является частью нормальной микрофлоры желудочно-кишечного тракта и влагалища человека, потенциальное применение ферментов из этих бактерий в терапевтических целях не будет провоцировать против себя иммунный ответ. И хотя *Limosilactobacillus reuteri* хорошо известна своими пробиотическими свойствами, информация о ее белках в современной научной литературе пока ограничена.

Основные выводы. Проведен биоинформационный анализ нуклеотидаз из различных источников. По базам данных найдена последовательность гена, кодирующего 5'-нуклеотидазу (бифункциональную металлофосфатазу) в *Limosilactobacillus reuteri*. Проведено конструирование праймеров для клонирования полноразмерного варианта гена в двух вариантах: с последовательностями, кодирующими шесть дополнительных остатков гистидина на N и на C конце. Анализ последовательности нуклеотидазы выявил наличие на N-конце сигнального пептида. Далее нами были получены еще две конструкции, содержащие целевой ген без участка, кодирующего сигнальный пептид и содержащие последовательности, кодирующие остатки гистидинов на N и на C конце белка. Таким образом, всего нами получены четыре генетические конструкции. Клонирование генов проводили в плазмиду pET24a для последующей экспрессии в штамм *Escherichia coli* BL21(DE3)pLysS. В результате культивирования штаммов-продуцентов рекомбинантных нуклеотидаз нами были получены белковые препараты в растворимой форме. Очистку белков проводили с помощью металл-хелатной хроматографии, наличие 5'-нуклеотидазы подтверждено с помощью MALDI. В данный момент проводится оптимизация экспрессии для получения фермента без сигнальных пептидов для дальнейшей очистки, изучения субстратной специфичности и антимикробной активности.

Литература

1. O.S. Savinova, O.A. Glazunova, K.V. Moiseenko, A.V. Begunova, I.V. Rozhkova, T.V. Fedorova, Exoproteome analysis of antagonistic interactions between the probiotic bacteria *Limosilactobacillus reuteri* Ir1 and *Lactocaseibacillus rhamnosus* f and multidrug resistant strain of *Klebsiella pneumonia*, *Int. J. Mol. Sci.* 22 (2021) 10999, doi.org/10.3390/ijms222010999
2. World Health Organization [Электронный ресурс]. URL: <https://www.who.int/> (дата обращения: 8.05.2024).
3. 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;
4. 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;
5. Reis J.A., Paula A.T., Casarotti S.N., Penna A.L.B. Lactic Acid Bacteria Antimicrobial Compounds: Characteristics and Applications. *Food Eng. Rev.* 2012;4:124–140. doi: 10.1007/s12393-012-9051-2.

Efremova Anastasia Dmitrievna

RESEARCH CENTER OF BIOTECHNOLOGY RAS

PRODUCTION OF 5'-NUCLEOTIDASE FROM *LIMOSILACTOBACILLUS REUTERI*

Abstract. The 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. This determines the need to develop new antibacterial protein drugs that can help in the fight against antibiotic resistance. This study aims to investigate the functional significance and domain space structure features of some enzymes in probiotic strains of *Lactobacillus* for potential regulation and development of alternatives to existing therapies against bacterial

infections. In particular, the enzyme 5'-nucleotidase is the current subject of study, the choice of which is due to its production by Limosilactobacillus reuteri bacteria when co-cultured with a pathogenic Klebsiella strain.

Keywords: *5'-nucleotidase, Limosilactobacillus reuteri, pathogenic bacteria, probiotics, antimicrobial activity, multidrug resistance.*

*Работа поддержана грантом РФФ № 23–64–10029,
<https://rscf.ru/project/23-64-10029/>*

Зайцев Пётр Евгеньевич

аспирант ФИЦ Биотехнологии РАН 2 года обучения

научная специальность 1.5.4 Биохимия

e-mail: pez2000@yandex.ru

Научный руководитель

Жердева Виктория Вячеславовна

кандидат биологических наук, с.н.с.

зав. лабораторией молекулярного имиджинга



ДИФФЕРЕНЦИАЦИЯ РЫХЛОЙ И ПЛОТНОЙ СОЕДИНИТЕЛЬНОЙ ТКАНИ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МРТ В АУТОПТАТАХ, СОДЕРЖАЩИХ УГЛЕРОД- УГЛЕРОДНЫЕ СКАФФОЛДЫ

Аннотация. Оценка тканевых эффектов при имплантации материалов медицинского назначения имеет важное значение для прогнозирования персональных рисков возникновения реакции отторжения импланта. Применяемые способы тестирования материалов *in vitro* не могут учесть ряд особенностей живого организма. В связи с этим разработка методов оценки биосовместимости имплантируемых материалов и изучение тканевых реакций *in vivo* являются актуальными задачами. Целью данной работы является подборка прижизненных МРТ-маркеров для анализа фиброзной капсулы, формирующейся вокруг имплантируемого материала и определяющей дальнейшую судьбу импланта. Мышам линии BDF1 имплантировали углерод-углеродные композиты (скаффолды) и производили оценку результатов имплантации в течение 10-12 недель методом МРТ как прижизненно, так и в аутоптатах. Показателем эффективности биоинтеграции было выбрано соотношение рыхлой и плотной соединительной ткани в фиброзной капсуле. Был предложен алгоритм на основе МРТ и метода проекций максимальной интенсивности для количественной оценки показателя. Показано, что данный алгоритм может быть применен для дифференциации рыхлой и плотной соединительной ткани как в аутоптатах, так и имеет перспективы использования для оценки биоинтеграции имплантируемых композитных материалов *in vivo*.

Ключевые слова: углерод–углеродные композиты, имплантация, МРТ, биоинтеграция, соединительно-тканная капсула, плотная соединительная ткань, рыхлая соединительная ткань.

Разработка инструментальных подходов для оценки прижизненных процессов, связанных с биосовместимостью потенциальных имплантируемых материалов, вызывает растущий интерес среди исследователей, так как неоднократно показано, что *in vitro* тесты лишь только в малой степени отражают процессы, происходящие в организме *in vivo*. Ранее мы использовали МРТ для оценки фиброзной инкапсуляции отдельных видов имплантируемых материалов [1,2].

Целью этого исследования было использование ранее предложенных подходов для оценки тканевых эффектов в ответ на имплантированные мышам BD1 углерод-углеродные композитные материалы с разными типами нанесения покрытия и использование оптимизированных алгоритмов для использования их в МРТ-гистологической валидации.

МРТ аутоптатов проводили на МРТ-системе (Аспект Имиджинг, Израиль) в режимах: (T1-weighted gradient echo) (TR / TE = 60/ 2,4 мс, FA 30, NEX 20, FOV 40x40 мм, матрица 120x180, количество срезов 15). T2wFSE (T2-fast spin echo) TR / TE 4000/38,3, FOV 40x40, матрица 120x180, ETL 5, NEX 8, количество срезов 15), том числе с жироподавлением (предимпульс инверсии TI =100 мс). МРТ *in vivo* проводили в режиме

T1w и T1w-TI. Сканы, полученные в режиме жироподавления, были проанализированы методом максимальной интенсивности проекций (МИП) [1]. Для разделения ткани с высоким содержанием коллагена (плотная соединительная ткань) и низким содержанием коллагена (рыхлая соединительная ткань) был использован метод на основе линейной разделимости. Углеродные скаффолды без покрытия и покрытые гидроксиапатитом методами электрофорезного и детонационного напыления имплантировали подопытным мышам линии BDF1 (n=6). Вживление было проведено подкожно в нижнюю дорзальную область. МРТ исследование проводили 1 раз в 7-10 дней. Значения площади рыхлой и плотной ткани вычислялись согласно полученным ранее константам. Для получения данных использовалась программа imageJ Fiji.

Аутопаты были проанализированы в режиме T1wGRE с жироподавлением [1], далее была произведена оценка распределения МР-сигнала с применением метода МИП. Для стандартизации показателей выбрано пограничное значение, разделяющее рыхлую и плотную ткани. Было выбрано значение интенсивности, где два вида ткани имеют наименьшее количество точек пересечения с разделяющим их значением (40-100 для рыхлой и 101-254 для плотной). На представленном аутопате в режиме T1wGRE (Рис.1А) сохраняется светлый фон, что затрудняет фиксацию рыхлой соединительной ткани, так же тенденция сохраняется при анализе изображений, полученных *in vivo*. На скане, сделанном в режиме инверсии сигнала (Рис.1Б), отчетливо видны ярко-белые дистальные участки плотной соединительной ткани и серые участки рыхлой соединительной ткани. Для удобства визуального восприятия к изображению был применен фильтр fire (Рис.1В). Для визуализации в режиме fire была создана шкала интенсивности (Рис.1Г). Метод показывает соотношение рыхлой и плотной ткани (Рис. 2).

Метод был применен к образцам *in vivo*, без покрытия и с покрытием, вокруг которых в течении месяца наблюдали формирование фиброзной капсулы (Рис3).

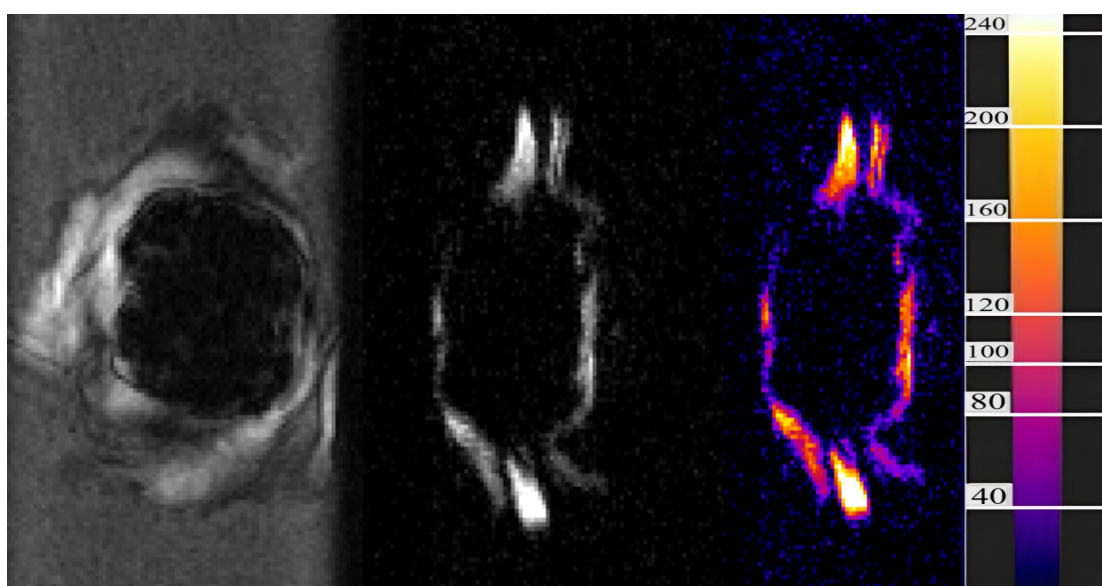


Рисунок 1 – анализ МРТ скана 12-недельного скаффолда с покрытием гидроксиапатита по методу МИП. А – T1wGRE центральный срез; Б – центральный срез в режиме жироподавления; В - центральный срез в режиме жироподавления в цветообработке fire; Г – шкала интенсивности рыхлой и плотной ткани в режиме цветообработки fire

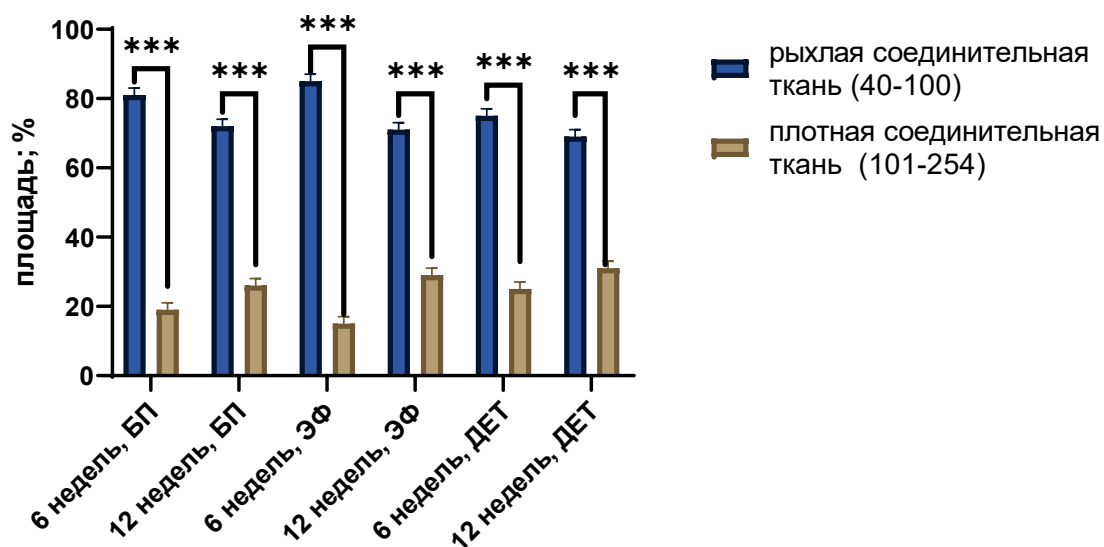


Рисунок 2 – Соотношение рыхлой и плотной ткани в составе фиброзной капсулы вокруг скаффолда. БП – без покрытия, ЭФ – покрытие методом электрофореза, ДЕТ – покрытие методом детонации

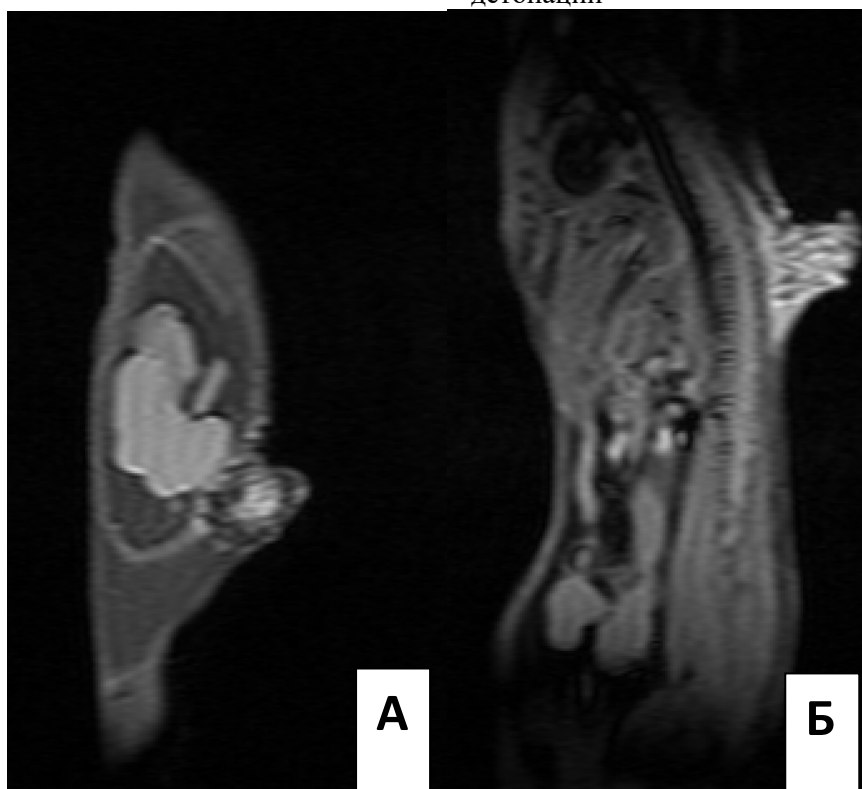


Рисунок 3 – 4-недельные образцы in vivo. А – образец без покрытия; Б – образец с покрытием

Основные выводы

Разработан метод разграничения, эффективный для режима МРТ T1w с жироподавлением. Предложенный алгоритм может быть применен для дифференциации рыхлой и плотной соединительной ткани как в аутоптатах, так и имеет перспективы для оценки биоинтеграции имплантируемых композитных материалов in vivo. Дальнейшие исследования ориентированы на разработку методов оценки заселения скаффолдов клетками in vitro и разработку методов оценки биоинтеграции скаффолдов in vivo, а также использование композитных материалов с улучшенными для биоинтеграции свойствами.

Литература

1. Skriabin, A.S.; Tsygankov, P.A.; Vesnin, V.R.; Shakurov, A.V.; Skriabina, E.S.; Sviridova, I.K.; Sergeeva, N.S.; Kirsanova, V.A.; Akhmedova, S.A.; Zherdeva, V.V.; et al. Electrophoretic Deposition of Calcium Phosphates on Carbon–Carbon Composite Implants: Morphology, Phase/Chemical Composition and Biological Reactions. *Int. J. Mol. Sci.* 2024, 25, 3375.

Список публикаций по теме работы

Статьи

1. Zherdeva, V.V.; Zaitsev, P.E.; Skriabin, A.S.; Shakurov, A.V.; Vesnin, V.R.; Skriabina, E.S.; Tsygankov, P.A.; Sviridova, I.K.; Sergeeva, N.S.; Kirsanova, V.A.; et al. Towards MRI Study of Biointegration of Carbon-Carbon Composites with Ca-P Coatings. *Nanomaterials* 2025, 15, 492. <https://doi.org/10.3390/nano15070492>

Тезисы докладов

1. ХОЛОЭКСПО 2024: XXI Международная конференция по голографии и прикладным оптическим технологиям (Казань, 9–13 сентября 2024 года) : тезисы докладов / Общество с ограниченной ответственностью «Холоэкспо наука и практика». — Москва: Издательство МГТУ им. Н.Э. Баумана, 2024. с. 330-332 (постерный доклад).

Zaitsev Petr Evgenievich

RESEARCH CENTER OF THE BIOTECHNOLOGY RAS

DIFFERENTIATION OF LOOSE AND DENSE CONNECTIVE TISSUE USING MRI IN AUTOPSIES CONTAINING CARBON-CARBON SCAFFOLDS

Abstract. *Evaluation of tissue effects during implantation of medical materials is crucial for predicting the risk of implant rejection. The methods used for in vitro testing of materials cannot take into account a number of living organism conditions. In connection with these developed methods, evaluation of biocompatibility of implanted materials and study of in vivo effects are urgent tasks.*

The aim of this work is to select intravital MRI markers for analysis of the fibrous capsule formed around the implanted material and determination of the further fate of the implant. BDF1 mice were implanted with carbon-carbon composites (scaffolds) and the results of implantation were assessed for 10-12 weeks by MRI both intravitaly and in autopsies. The location of loose and dense connective tissue in the fibrous capsule was chosen as an indicator of biointegration efficiency. An algorithm based on MRI and the maximum width projection method for quantitative assessment of the indicator is proposed. It has been shown that this method can be used to differentiate loose and dense connective tissue both in autopsy specimens and has potential for use in assessing the biointegration of implantable composite materials in vivo.

Keywords: *carbon–carbon composites, implantation, MRI, biontegration, connective tissue capsule, dense connective tissue, loose connective tissue.*

Игнатенко Александр Викторович

аспирант ФИЦ Биотехнологии РАН 2 года обучения

научная специальность 1.5.11 Микробиология

E-mail: ignatenko5aiav@gmail.com

Научный руководитель

Хижняк Татьяна Владимировна

доктор биологических наук,

г.н.с., зав. лаб. экологии и геохимической

деятельности микроорганизмов



БИОЛОГИЧЕСКОЕ ВОССТАНОВЛЕНИЕ ХРОМАТА ГАЛОАЛКАЛОФИЛЬНЫМИ БАКТЕРИЯМИ

Аннотация. В данной работе представлены результаты исследования новых штаммов бактерий хроматредукторов, выделенных из осадков соленых щелочных озер Кулундинской степи (Алтайский Край, Россия). Для штамма *Salisediminibacterium* MB1000, выделенного в 2023 г., в дополнение к ранее представленным результатам, получены данные по мультисубстратному тестированию и диссимиляторной нитратредукции. Подготовлена публикация с описанием штамма MB1000 в качестве нового вида рода *Salisediminibacterium*. Продолжены работы по масштабированию процесса хроматредукции в лабораторных биореакторах с использованием штамма *Salisediminibacterium* MB1000. В период 2024 – 2025 гг. из накопительной культуры с ацетатом и хроматом выделено и идентифицировано по гену *16S rPHK* еще два новых штамма хроматредукторов: *Salisediminibacterium* CrAc3 и *Salipaludibacillus* CrAc4.

Ключевые слова: хроматредукторы, биотехнологии, биореактор, щелочные среды.

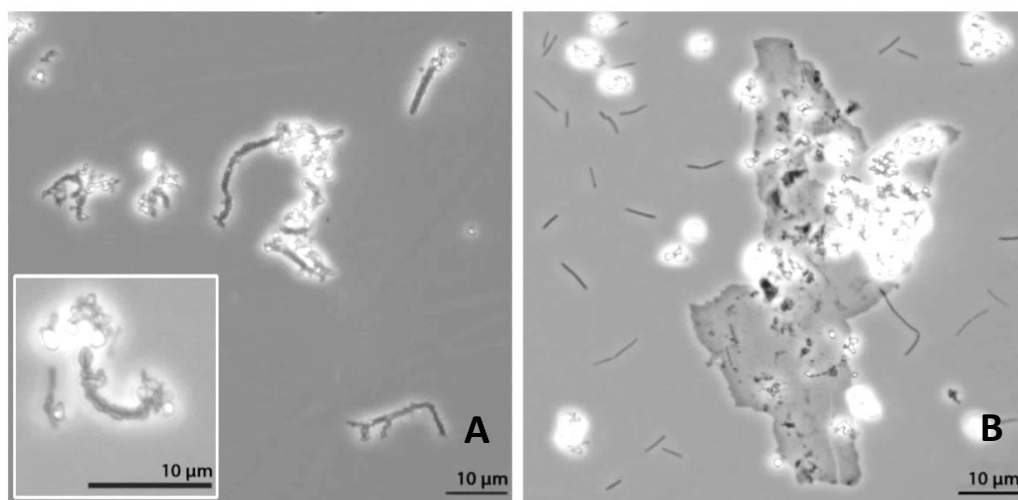
Хром – поливалентный тяжелый металл, широко используемый в промышленности. Ежегодно в окружающую среду поступает до ~2630*10³ т хромсодержащих отходов [1]. Преобладающая в отходах шестивалентная форма хрома обладает мутагенным и канцерогенным действием на живые организмы [2]. Проблему очистки загрязненных 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 хромовосстанавливающих бактерий, однако большинство из них нейтрофилы и не способны переносить условиях с повышенным pH и соленостью, характерные, например, для стоков гальванических производств [5, 6].

В 2023 г. нами был выделен штамм *Salisediminibacterium* MB1000, способный расти в анаэробных условиях, используя Cr(VI) в качестве акцептора электронов. Были определены филогенетическое положение и основные экофизиологические параметры культивирования, необходимые для устойчивого роста культуры на среде с Cr(VI) [2, 7]. Результаты мультисубстратного тестирования доноров электронов показали, что в

анаэробных условиях штамм MB1000 способен расти на глюкозе, глицерине, сахарозе, фруктозе, формиате, дрожжевом экстракте, пептоне, пирувате, крахмале и лактате в присутствии хромата в качестве акцептора. Помимо Cr(VI) выделенный штамм MB1000 способен использовать в качестве акцептора электронов нитрат, арсенат, селенит, элементный селен, серу, теллурид, ДМСО и кислород.

Отдельное внимание было уделено вопросу образования минерального осадка после восстановления Cr(VI) культурой *Salisediminibacterium* MB1000. Установлено, что основной формой, в которой выпадает Cr(III), является Cr(OH)₃. Исследование роста культуры на средах с разным соотношением Na₂CO₃, NaHCO₃ и NaCl, показало, что в средах с минимальным содержанием карбоната в процессе восстановления хромата часть осадка выпадала внеклеточно, а часть плотно сорбировалась на поверхности клеток (рис. 1A). При этом наблюдалось замедление темпов роста культуры и ее угнетение, вплоть до остановки роста и процесса восстановления Cr(VI). При увеличении доли карбонатов в среде весь образованный осадок выпадал внеклеточно (рис. 1B), замедления роста и восстановления хрома не происходило. В случае замены Na₂CO₃ и NaHCO₃ на Na₂SO₄, наблюдался схожий эффект - при замещении карбонатных солей сульфатом более чем на 75% наблюдается осаждение Cr(III) на поверхности клеток и полностью блокируется накопление биомассы и восстановление Cr(VI) при замещении на 90% и более.

Исследование диссимиляторной нитратредукции штаммом *Salisediminibacterium* MB1000 показало, что при отсутствии восстановителей, снижающих окислительно-восстановительный потенциал среды, восстановление нитрата останавливается на нитрите. Достаточным условием для протекания второй реакции восстановления нитрита до аммония оказалось введение в состав среды цистеина в количестве 0,25 мМ. В этом случае наблюдалось поэтапное восстановление нитрата сначала до нитрита (5 мМ NaNO₃, 2 сут), и далее до аммония (4 сут). При этом происходит накопление аммония в среде (с 1,8 мМ на начало эксперимента, до 5,5 мМ на 5 сутки роста).



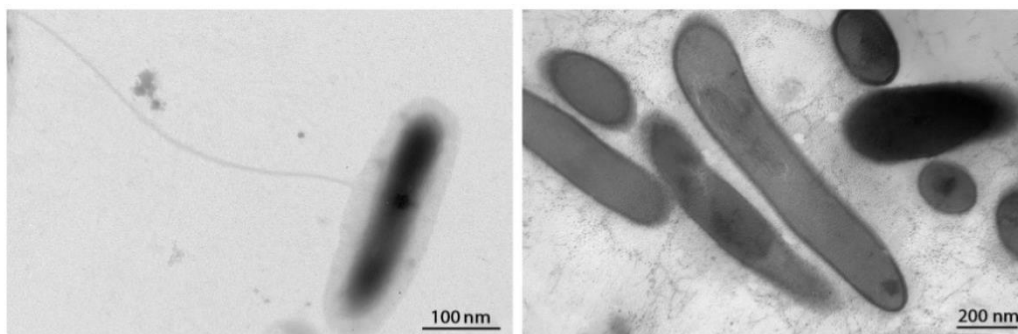


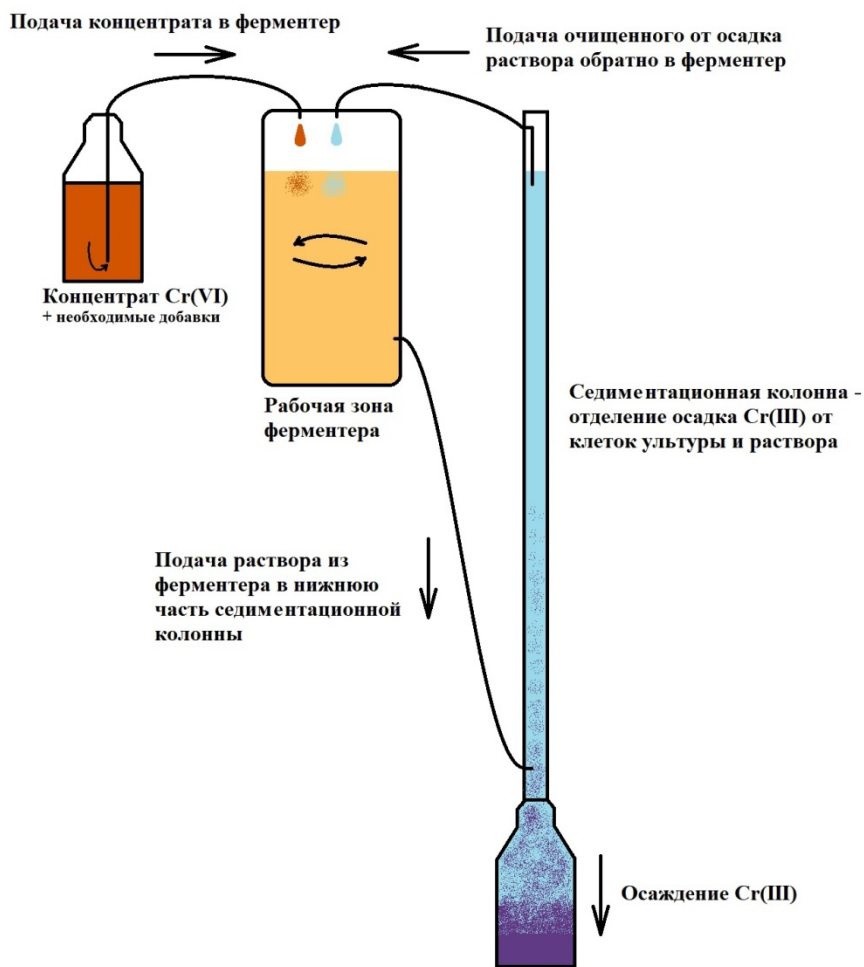
Рис. 1. Морфология клеток штамма MB1000 при восстановлении хромата.
 А) Осадок и клетки штамма MB1000 на среде с малой долей карбонатов (фазовый контраст, x1000); В) биопленка, осадок и клетки в среде с высоким содержанием карбонатов; С) клетка со жгутиком (x40000); D) срезы клеток (x60000)

Из отобранных летом 2024 г. осадков карбонатных и хлоридных соленых озер Кулундинской степи были выделены еще 2 штамма бактерий, способных восстанавливать хромат в анаэробных условиях. Результаты секвенирования гена 16S рРНК показывают, что штамм CrAc4 относится к роду *Salipaludibacillus*, а штамм CrAc3 к роду *Salisediminibacterium* и очень близок штамму MB1000. Однако, несмотря на 98% сходство нуклеотидных участков (около 500 п.н.), данные штаммы имеют различия – штамм MB1000 не способен расти на ацетате, в отличие от штаммов CrAc3 и CrAc4.

Проведенные ранее попытки масштабировать процесс хроматредукции в лабораторных биореакторах с использованием штамма *Salisediminibacterium* MB1000, показали возможность дальнейшей работы в этом направлении [2]. За отчетный период была разработана принципиальная схема биореакторной установки (рис. 2). Проработаны

теоретические режимы работы установки, с учетом предыдущих исследований. Проведены стендовые испытания собранной лабораторной установки без посева культуры.

Рис. 2. Принципиальная схема биореакторной установки для очистки концентрата,



содержащего Cr(VI)

Основные выводы

За отчетный период в ходе проведенных исследований установлен список возможных доноров и акцепторов электронов для штамма *Salisediminibacterium* MB1000. Показано, что состав среды значительно влияет на процесс восстановления хромата, вплоть до остановки роста культуры. Подготовлена статья с описанием штамма MB1000. Выделены два новых штамма хроматовосстанавливающих бактерий CrAc3 и CrAc4, растущих на ацетате. Подготовлена теоретическая и материальная база для запуска лабораторной биореакторной установки по очистке модельных щелочных растворов от токсичного хромата.

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. Игнатенко А.В., Хижняк Т.В. Бактериальное восстановление хроматов. Возможность применения новых штаммов в системах биоочистки // 2024. Труды Кольского научного центра РАН. Серия: Технические науки. Т. 15, № 1. С. 189–195

3. 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
4. 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.
5. 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.
6. 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.
7. 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.
8. 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

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.
2. Игнатенко А.В., Хижняк Т.В. Бактериальное восстановление хроматов. Возможность применения новых штаммов в системах биоочистки // 2024. Труды Кольского научного центра РАН. Серия: Технические науки. Т. 15, № 1. С. 189–195.

Тезисы докладов

1. Игнатенко А.В. Бактериальное восстановление хроматов. Возможность применения новых штаммов в системах биоочистки. XVIII Всероссийская научно-техническая конференция молодых 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).
2. Игнатенко А.В. Новый галоалкалофильный штамм *Salisediminibacterium* MB1000, способный эффективно восстанавливать хромат. XIV Молодежная школа-конференция с международным участием «Актуальные аспекты современной микробиологии» (устный доклад, диплом 1 степени за лучший доклад).

Ignatenko Alexandr Victorovich
RESEARCH CENTER OF BIOTECHNOLOGY RAS

BIOLOGICAL REDUCTION OF CHROMATE BY HALOALKALIPHILIC BACTERIA

Abstract. *This paper presents the results of the study of new strains of chromate-reducing bacteria isolated from sediments of saline alkaline lakes in the Kulunda Steppe (Altai Krai, Russia). Multisubstrate testing and dissimilatory nitrate reduction data were obtained for Salisediminibacterium MB1000 strain isolated in 2023, in addition to previously reported results. A publication describing strain MB1000 as a new species of the genus Salisediminibacterium was prepared. Work continued on scaling up the chromatreduction process in laboratory bioreactors using Salisediminibacterium strain MB1000. In the period 2024-2025, two more new strains of chromate reducers were isolated from the enrichment culture with acetate and chromate and identified by 16S rRNA gene: Salisediminibacterium CrAc3 and Salipaludibacillus CrAc4.*

Keywords: *chromate reducing bacteria, biotechnology, bioreactor, alkaline media.*

Клюшин Георгий Сергеевич

аспирант ФИЦ Биотехнологии РАН 2 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



ЭЛЕКТРОКАТАЛИТИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ЭКСТРЕМОФИЛЬНЫХ ЖЕЛЕЗОРЕДУКТОРОВ И ВЫДЕЛЕНИЕ НОВЫХ ЭЛЕКТРОАКТИВНЫХ БАКТЕРИЙ

Аннотация. Электроактивность встречается у многих микроорганизмов, но продукция электрического тока у разных электроактивных микроорганизмов может на порядки отличаться. 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 микробной трансформации железа. За 2 год определили, что оптимальный потенциал отдачи электронов на электрод для *Carboxydotherrnus ferrireducens* составляет +30мВ, а для *Geoalkalibacter ferrihydriticus* -20мВ. Выявлено влияние микроэлементного состава ферригидрита на рост железовосстанавливающих и электрогенных термофилов. Получены устойчивые накопительные культуры термофильного потенциального электросинтрофа *Sulfurihydrogenibium rodmanii* и мезофильного железоредуктора *Geoanaerobacter*.

Ключевые слова: электромикробиология, электроактивность, электроген, электротроф, экстремофил, трансформация минералов железа.

Основными направлениями исследований в области электромикробиологии традиционно является поиск наиболее активного электрогена и электротрофа, а также расширение знаний о разнообразии электроактивных микроорганизмов [1]. В контексте данных задач все больше в электромикробиологии оформляется тренд по изучению электроактивности экстремофильных микроорганизмов, поскольку некоторые из них обладают более высокой электроактивностью по сравнению даже с модельными видами (*Geobacter sulfurreducens*, *Shewanella oneidensis* и *Shewanella putrefaciens*).

Особый интерес также представляет изучение экологических функций электроактивных микроорганизмов. Наиболее явным и значимым природным процессом, осуществляемым электроактивными микроорганизмами является минералообразование. Имеется немало исследований о трансформации минералов железа электрогенами и электротрофами посредством их восстановления или окисления [2]. Однако до сих пор крайне мало подробных научных работ о характеристиках и особенностях минералов, образованных разными по строению, физиологии и таксономическому положению электроактивными микроорганизмами. Также не проводилось научных исследований по сравнительной характеристике отдельных минералов, образованных разными по

активности электрогенами и электротрофами. В связи с этим, вплоть до настоящего времени мало изучена роль экстремофильных микроорганизмов в процессах минералообразования и не оценен их вклад в данный глобальный процесс.

На основании всего вышесказанного целью настоящего диссертационного исследования является определение вклада электрокаталитической активности экстремофильных микроорганизмов в процессы биоминерализации железа в различных осадочных экосистемах.

С целью определения оптимального электрохимического потенциала для отдачи электронов на электрод электрогенами была произведена циклическая вольтамперометрия (CVA) 2х культур экстремофильных железоредукторов: термофила *Carboxydotherrmus ferrireducens* и мезофила галоалкалофила *Geoalkalibacter ferrihydriticus*, способных восстанавливать синтезированный ферригидрит до магнетита. Культивирование проводили в двухкамерных электрохимических Н-ячейках с электродами из углеволокна. Для выращивания культур использовали оптимальные для них анаэробные среды: для *C. ferrireducens* среду Пфеннига (pH = 6.5, источник углерода: глицерин - 3 г/л, T = +70°C), а для *G. ferrihydriticus* среду "Хадын" (pH = 8.8, источник углерода: ацетат - 10 mM, T = +25°C). Ячейки собирали в анаэробном боксе. Перед засевом в ячейку магнетит отделяли от суспензии клеток магнитом. Для каждой культуры использовали 2 Н-ячейки: рабочую (с живой культурой) и контрольную (без внесения культуры в случае или с убитой стерилизацией культурой).

При работе с культурой *C. ferrireducens* биопленку на поверхности электрода выращивали при разомкнутой цепи в условиях стимуляции гомоацетогенеза с 600 мкМ магнетита. После достижения высокой численности планктонных клеток (10^7 кл/мл) в среде наблюдали пики электроактивности: положительный при потенциале +30 мВ и отрицательный при -150мВ, которые были только в рабочей ячейке. Таким образом, можно утверждать, что лучшим потенциалом для генерации электрического тока клетками *C. ferrireducens* является +30 мВ относительно хлорсеребряного электрода.

При работе с *G. ferrihydriticus* для обеспечения достаточного количества биомассы культуры в Н-ячейке сначала добавляли дополнительный акцептор электронов - ЭДТА-Fe(III), а затем задавали потенциал -100 мВ против хлорсеребряного электрода сравнения на аноде согласно литературным данным. Таким образом, культуру *G. ferrihydriticus* выращивали в режиме потенциостатирования. В ходе роста культуры в потенциостатическом режиме также произошел экспоненциальный рост силы тока, вырабатываемый рабочей ячейкой. После достижения большой численности клеток (10^6 кл/мл) в начале первого цикла CVA в рабочей ячейке возникал четкий пик с вершиной при силе тока 18 мА и потенциале -20мВ, в контрольной ячейке подобного пика не было, что указывает на его биологическую природу. Таким образом, в ходе CVA удалось установить, что оптимальным потенциалом для выработки тока культурой *G. ferrihydriticus* является - 20 мВ относительно хлорсеребряного электрода. Выявленный оптимум передачи электронов *G. ferrihydriticus* на электрод в диапазоне потенциалов 0 – -50 мВ оказался до этого неизвестным. Благодаря добавлению комплекса ЭДТА-Fe(III) методом спектроскопии электрохимического импеданса удалось установить возможность его использования культурой в качестве редокс-медиатора электрокаталитической активности, что до этого было неизвестно.

Также на 2 курсе аспирантуры начата работа по микробиологическому описанию чистой культуры рода *Thermincola sp. GK1*, выделенной в прошлом году из анода осадочного МТЭ и вероятно (сравнение последовательности нуклеотидов по участку v4 16S рРНК через базу данных NCBI BLAST) относящейся к новому виду. Интересная

особенность данной культуры заключается в характере проведения железоредукции: облигатное сопряжение железоредукции с СО-трофией. Необлигатное сопряжение железоредукции с СО-трофией было ранее описано у *Carboxydocella*. Помимо этого проводится биоинформатический анализ генома *Thermincola sp. GK1*. В начале года оказался недоступен высокочистый фармакопейный реактив (FeCl_3) для синтеза ферригидрита. В связи с этим, мы проверили на использование для культивирования все доступные реактивы (8 штук) различной чистоты, с различным содержанием примесей, в том числе редкоземельных и тяжелых металлов. Использование этих реактивов FeCl_3 для приготовления ферригидрита привело к тому, что рост культуры на проверенном уже ацетате и железоредукция стали наблюдаться только в 1-2 повторностях из 3х в одном и том же пересеве, чего раньше не было. Мы предполагаем, что это происходит из-за повышенного содержания некоторого токсичного компонента в новых реактивах, возможно тяжелого металла. Мы уже определили лучший из 8 доступных в реактивов FeCl_3 для синтеза ферригидрита, но теперь работаем над выявлением влияния токсичного компонента на формирование ферригидрита методами мессбауровского анализа и определения токсичности микроэлементного состава приготовленных сред методом ICP-MS.

Проверка целого перечня отечественных и зарубежных реактивов FeCl_3 на токсический компонент может иметь не только практическую, но и фундаментальную значимость. Если удастся подтвердить, что рост культур ингибируется из-за повышенного содержания некоторого определенного тяжелого металла, то это позволит выявить дополнительные ограничения на возможность проведения микробной железоредукции в природных экосистемах и этот фактор необходимо будет учитывать при планировании получения накопительных и чистых культур железоредукторов для проведения подобных исследований.

За 2 курс аспирантуры получили высоко очищенную (>98% от состава бактериального сообщества) накопительную культуру термофильного потенциального электросинтрофа *Sulfurihydrogenibium rodmanii*, накопление которого отмечалось ранее на электродах осадочного МТЭ в горячем источнике Солнечный на Камчатке. Также была получена высоко очищенная накопительная культура (>90% от состава бактериального сообщества) мезофильного железоредуктора рода *Geoanaerobacter*, способного восстанавливать ферригидрит сначала до магнетита, а потом далее до сидерита и предположительно являющимся новым видом.

Основные выводы. В ходе работ 2 года диссертационного исследования удалось определить, что оптимальный потенциал генерации электрического тока для *C. ferrireducens* составляет +30 мВ, а для *G. ferrihydriticus* -20 мВ. Выявленные оптимум переноса электронов на электрод для *G. ferrihydriticus* оказался ранее не описанным, кроме того была показана возможность использования данной культурой комплекса ЭДТА-Fe(III) в качестве редокс-медиатора электрокаталитической активности в данном оптимальном диапазоне потенциалов. На 2 курсе диссертационного исследования начато микробиологическое описание термофильного железоредуктора *Thermincola*, предположительно относящаяся к новому виду, проводится проверка реактивов FeCl_3 на наличие токсичных примесей в практических целях и для поиска дополнительных факторов ограничения микробной железоредукции. Получены устойчивые накопительные культуры термофильного потенциального электросинтрофа *Sulfurihydrogenibium rodmanii* и мезофильного железоредуктора *Geoanaerobacter*.

Литература

1. Logan B.E., Rossi R., Ragab A., Saikaly P.E. Electroactive microorganisms in bioelectrochemical systems // J. Nature Reviews Microbiology. – 2019. – Vol.17. – P. 307-319.
2. Lovley D.R., Holmes D.E. Electromicrobiology: the ecophysiology of phylogenetically diverse electroactive microorganisms // J. Nature Reviews Microbiology. – 2021. – P. 1-15.

Список публикаций по теме работы

Статьи

1. Ключин Г.С., Гогов А.С., Колоский А.Е., Строева А.Р., Елизаров И.М., Ключкина А.А., Гавилов С.Н. Очистка нефтезагрязненной почвы с низким выходом CO₂ в осадочном микробном топливном элементе // Микробиология. 2025. Т. 94. № 2. С.111-131.

Klyushin George Sergeevich

ELECTROCATALYTIC PROPERTIES OF EXTREMOPHILIC IRON REDUCERS AND ISOLATION OF NEW ELECTROACTIVE BACTERIA

Abstract. *Electroactivity is found in many microorganisms, but the production of electric current in different electroactive microorganisms can differ by orders of magnitude. New perspectives are opened when searching for electroactive bacteria among extremophiles. At the same time, the role and contribution of electroactive prokaryotes to natural processes are poorly understood. This thesis aims to search for new electroactive bacteria among extremophiles and identify their contribution to the microbial transformation of iron. In year 2, we determined that the optimum electron return potential to the electrode for Carboxydotherrnus ferrireducens is +30mV and for Geoalkalibacter ferrihydriticus is -20mV. Microbiological characterization of the thermophilic iron-reducing genus Thermincola continues. Stable accumulative cultures of the thermophilic potential electrosyntrophic Sulfurihydrogenibium rodmanii and the mesophilic iron reducer Geoanaerobacter were obtained.*

Keywords: *electromicrobiology, electroactivity, electrogen, electrotroph, extremophile, transformation of iron minerals.*

Лайкова Александра Алексеевна

аспирант ФИЦ Биотехнологии РАН 2 года обучения

научная специальность 1.5.11 Микробиология

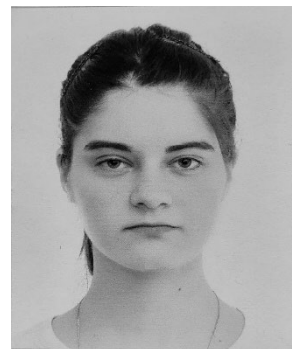
e-mail: laykova2011@yandex.ru

Научный руководитель

Литти Юрий Владимирович

кандидат биологических наук

с.н.с., заведующий лабораторией микробиологии антропогенных
мест обитания



ИССЛЕДОВАНИЕ МЕХАНИЗМОВ СТИМУЛЯЦИИ ПРОДУКЦИИ БИОВОДОРОДА В ХОДЕ ТЕМНОВОЙ ФЕРМЕНТАЦИИ ЗА СЧЕТ ВНЕСЕНИЯ ИОНОВ Fe^{2+} И Ni^{2+}

Аннотация. Работа посвящена изучению механизмов влияния различных концентраций растворимых металлосодержащих соединений Fe^{2+} и Ni^{2+} на характеристики темновой ферментации молочной сыворотки чистой культурой *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* SP-H2 с помощью комплекса микробиологических и электрохимических методов. Внесение 12,5 мг/л Fe^{2+} привело к увеличению выхода водорода на 30,3% и гидрогеназной активности на 90,0%. Результаты работы позволят предположить пути использования металлов в H_2 -продуцирующем микробном метаболизме в сочетании с их внутриклеточным накоплением. С помощью геномного анализа были идентифицированы ключевые субъединицы H_2 -выделяющих групп [NiFe]- и [FeFe]-гидрогеназ. В дальнейших исследованиях планируется оценить влияние оптимальных концентраций Fe^{2+} и Ni^{2+} на экспрессию генов соответствующих гидрогеназ и клеточных транспортных систем.

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

Производство водорода как безопасного возобновляемого вида топлива привлекает все большее внимание за счет высокого содержания энергии (122 кДж/г), а также образования водяного пара в качестве единственного побочного продукта при сгорании. Темновая ферментация (ТФ) представляет собой многообещающий биологический процесс, в ходе которого из органических отходов вырабатывается безуглеродное биотопливо — водород [3]. Несмотря на значительные достижения в области оптимизации ТФ, все еще существует множество аспектов, которые препятствуют промышленному внедрению эффективных технологий производства биоводорода, в частности поиск и применение чистых культур микроорганизмов, способных к продукции H_2 . *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* SP-H2 — это недавно выделенный H_2 -продуцирующий штамм, способный к ферментации широкого спектра субстратов. Одним из известных способов стимуляции ТФ является внесение металлосодержащих добавок, что приводит к изменению метаболических путей, электрохимических характеристик, стимуляции активности [FeFe]- и [NiFe]-гидрогеназ и экспрессии целевых генов [4]. В предыдущих исследованиях для штамма *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* SP-

H₂ был показан феномен повышения выработки биоводорода в сочетании с внутриклеточным накоплением металлов, однако точные механизмы стимуляции и их вклад в клеточный метаболизм не были изучены. Актуальным является дальнейшее выяснение путей продукции водорода посредством анализа выхода водорода, динамики активности гидрогеназ, электроактивности и способности к аккумуляции металлов. Цель работы заключается в исследовании механизмов влияния ионов металлов (Fe²⁺, Ni²⁺) и их концентраций (0–100 мг/л) на параметры ТФ молочной сыворотки штаммом *T. thermosaccharolyticum* SP-H2.

Согласно результатам анализа параметров ТФ, внесение определенных концентраций добавок оказало положительное влияние на продукцию биоводорода. В частности, внесение 12,5 мг/л двухвалентного железа в среду культивирования улучшило выход водорода до 30,3% по сравнению с контролем (0 мг/л). Наибольшее значение выхода водорода составило более 160 мл H₂/г ХПК. При добавлении 50 мг/л Ni²⁺ наблюдалось увеличение выхода водорода на 16,0%. Наблюдаемое увеличение гидрогеназной активности составило до 97,4% и 90,0% при добавлении Ni²⁺ и Fe²⁺, соответственно, по сравнению с контролем без внесения ионов металлов, что подтверждает участие обоих классов биметаллических гидрогеназ в процессе ТФ. Для проб, характеризующихся наиболее значительным улучшением выхода водорода (в особенности, с добавлением 12,5 и 25 мг/л Fe²⁺), было показано преобладание ацетата и бутирата среди продуктов метаболизма, наименьший уровень продукции восстановленных соединений (изопропанола и этанола), а также постепенное ингибирование образования пропионата, что указывает на сдвиг путей ферментации в сторону стимуляции продукции H₂ [5]. Электрохимическая емкость биомассы в конце экспоненциальной фазы продукции H₂ составила 5,157 мФ для проб с 25 мг/л Fe²⁺ и 4,96 мФ для 50 мг/л Ni²⁺ (на 60,1% и 54,0% выше чем в контроле, соответственно), что указывает на увеличение проводимости и способности к переносу электронов [2]. Кроме того, была показана возможность использования культуры *T. thermosaccharolyticum* SP-H2 в микробном топливном элементе (МТЭ) в качестве биокатализатора. Значение генерируемого потенциала составило 180±4 мВ.

Динамика внутриклеточного накопления как железа, так и никеля, исследованная при помощи метода сканирующей электронной микроскопии в сочетании с энергодисперсионной рентгеновской спектроскопией (SEM-EDS), в большинстве случаев демонстрирует увеличение содержания металлов в клетке в ходе эксперимента, а затем постепенное снижение к концу инкубации, коррелирующее со снижением образования водорода. В случае никеля наибольшее накопление происходит при внесении оптимальной концентрации 50 мг/л (до 3,0 масс.% спустя примерно 40 ч инкубации). При внесении 100 мг/л Fe²⁺ накопление железа достигало 4,3 масс.%, однако в случае наиболее эффективной стимулирующей концентрации (12,5 мг/л), содержание металла составило около 1,4 масс.%. Тем не менее, было показано постепенное разрушение клеток и деградация биомассы, что, вероятно, связано с чрезмерным накоплением металлов и их токсичным влиянием на микроорганизмы. Анализ динамики концентраций растворимых соединений железа в среде показывает преобладание ионов Fe³⁺ (до 30,5 мг/л), что, вероятно, связано с процессами окисления железа, а также вероятным транспортом ионов Fe²⁺ в микробные клетки.

С помощью геномного анализа штамма *T. thermosaccharolyticum* SP-H2 были идентифицированы гены субъединиц H₂-продуцирующих гидрогеназ, включая [NiFe]-

гидрогеназы группы 4е (*echE*) и [FeFe]-гидрогеназы групп А3 (*hydA*, *hydB*, *hydC*) и С (*hfsB*), а также гены созревания и сборки данных ферментов (*hydF*, *hydG*, *hypB*, *hypD*), характерные для изучаемого микроорганизма [1]. Предполагается также оценить экспрессию генов транспортных систем с целью проверки гипотезы транспорта металлов в клетки. Дальнейшей перспективой исследования является изучение экспрессии генов в динамике с целью более глубокого понимания молекулярных механизмов использования металлов клетками на разных этапах процесса, влияния на параметры ТФ, электрохимические показатели и гидрогеназную активность. Полученные результаты представляют научную ценность с точки зрения получения новых данных о метаболических аспектах ассимиляции добавок и их роли во внутриклеточных процессах, связанных с продукцией водорода.

Основные выводы:

1. Внесение металлосодержащих добавок приводило к стимуляции выхода водорода до 30,3% по сравнению с контролем;
2. Содержание металлов в клетках *T. thermosaccharolyticum* увеличивалось в начале эксперимента и снижалось до 53,5% в присутствии 100 мг/л Fe²⁺ и до 30,4% в присутствии 50 мг/л Ni²⁺ к концу культивирования;
3. Активность гидрогеназ увеличилась до 90,6% и 97,9% по сравнению с контролем в случае добавления 12,5 мг/л Fe²⁺ и 50 мг/л Ni²⁺ соответственно, что указывает на стимуляцию активности [FeFe]- и [NiFe]-гидрогеназ;
4. Электрохимическая емкость биомассы увеличивалась до 60,1% по сравнению с контролем при внесении 25 мг/л Fe²⁺.

Литература

1. De Souza L. C., Herring C. D., Lynd L. R. Genetic investigation of hydrogenases in *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* suggests that redox balance via hydrogen cycling enables high ethanol yield //Applied and Environmental Microbiology. – 2025. – С. e01109-24.
2. Lv Y., Feng Q., Li X., Zhao Y., Pan H., Peng G., & Zhou Y. Analysis of the contribution of different electron transfer pathways for hydrogen production in a bioelectrochemically assisted dark fermentation system //International Journal of Hydrogen Energy. – 2024. – Т. 72. – С. 967-975.
3. Mai J., Hu B. B., Zhu M. J. Metabolic division of labor between *Acetivibrio thermocellus* DSM 1313 and *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* MJ1 enhanced hydrogen production from lignocellulose //Bioresource Technology. – 2023. – Т. 390. – С. 129871.
4. Moura A. G. L., Rabelo C. A. B. D. S., Okino C. H., Maintinguer S. I., Silva E. L., Varesche M. B. A. Enhancement of *Clostridium butyricum* hydrogen production by iron and nickel nanoparticles: Effects on *hydA* expression //International Journal of Hydrogen Energy. – 2020. – Т. 45. – №. 53. – С. 28447-28461.
5. Sarangi P. K., Nanda S. Biohydrogen production through dark fermentation //Chemical Engineering & Technology. – 2020. – Т. 43. – №. 4. – С. 601-612.

Список публикаций по теме работы

Статьи

1. Laikova A., Zhuravleva E., Shekhurdina S., Ivanenko A., Biryuchkova P., Loiko N., Kryukov E., Kovalev A., Kovalev D., Litt Y. The intracellular accumulation of iron coincides with enhanced biohydrogen production by *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* // Chemical Engineering Journal. – 2024. – T. 497. – C. 154961.

Тезисы докладов

1. A. Laikova, E. Zhuravleva, S. Shekhurdina, A. Ivanenko, E. Andreev, N. Loiko, A. Kovalev, D. Kovalev, V. Fedina, S. Alferov, Y. Litt. Deeper insights into the mechanisms of Fe^{2+} and Ni^{2+} enhancement of biohydrogen production by *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum*. International Conference Innovations in Biotechnology for Sustainability (New Delhi, India, 23-25 November 2024) – 347 с. (постерный доклад).

Laikova Alexandra Alexeevna
RESEARCH CENTER OF BIOTECHNOLOGY RAS

INSIGHTS INTO THE MECHANISMS OF Fe^{2+} AND Ni^{2+} STIMULATION OF DARK FERMENTATIVE BIOHYDROGEN PRODUCTION

Abstract. *The research is devoted to the mechanisms of influence of different concentrations of soluble metal-containing compounds Fe^{2+} and Ni^{2+} on the characteristics of dark fermentation of cheese whey by a pure culture of *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* SP-H2 using a set of microbiological and electrochemical methods. The introduction of 12.5 mg/l Fe^{2+} led to an increase in hydrogen yield by 30.3% and hydrogenase activity by 90.0%. The results obtained will allow us to propose the pathways of metal utilization in H_2 -producing microbial metabolism in combination with their intracellular accumulation. Using genomic analysis, key subunits of H_2 -releasing groups of [NiFe]- and [FeFe]-hydrogenases were identified. In further studies, it is planned to evaluate the effect of optimal concentrations of Fe^{2+} and Ni^{2+} on the expression of genes encoding the corresponding hydrogenases and cellular transport systems for metal ions.*

Keywords: *biohydrogen, dark fermentation, hydrogenase activity, metal additives, microbial fuel cell, *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum*.*

Рассомахина Наталья Вадимовна

аспирант ФИЦ Биотехнологии РАН 2 года обучения

научная специальность 1.5.4 Биохимия

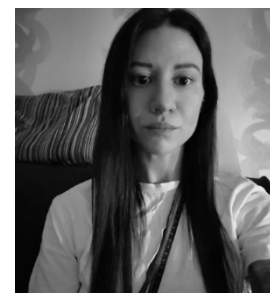
e-mail natalia.rassomahina@ya.ru

Научный руководитель

Жердева Виктория Вячеславовна

кандидат биологических наук,

зав. лабораторией молекулярного имиджинга



АНАЛИЗ ФЕНОТИПИЧЕСКИХ И ГЕНОТИПИЧЕСКИХ ОТЛИЧИЙ В СУБКЛОНАХ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК, ПОЛУЧЕННЫХ МЕТОДОМ ЛЕНТИВИРУСНОЙ ТРАНСДУКЦИИ

Аннотация. При трансформации опухолевых клеточных линий важным вопросом является сохранение свойств исходной клеточной линии. Для прижизненного мониторинга ряда молекулярных процессов прибегают к введению генов репортерных белков. В качестве таких белков часто используют флуоресцентные цветные белки, при трансфекции(трансдукции) клеток генами этих белков этом не удается достигнуть 100% эффективности. Для этого прибегают к селекции и клонированию с целью получения высокофлуоресцирующих популяций клеток, что необходимо для получения флуоресцентных изображений при прижизненном наблюдении туморогенеза. В работе были изучены фенотипические особенности и туморогенный потенциал субклонов линии аденокарциномы гортани человека Her2-TagRFP, трансдуцированной ранее геном флуоресцентного белка TagRFP. Показано, что высокая копияность трансгена влияет на экспрессию ключевых генов цитоскелета (актин и тубулин), снижает уровень пролиферативной активности и изменяет уровень метаболической активности митохондриальных оксидоредуктаз, демонстрируя также снижение туморогенности полученных клонов в мышцах линии nude. Был сделан предварительный вывод, что случайные встройки лентивирусной кассеты могут влиять на экспрессию ключевых генов (генов «домашнего хозяйства»), что продемонстрировано на полученных клонах опухолевых клеток с высоким уровнем экспрессии целевого белка. Полученные субклоны опухолевых клеток-трансдуктантов отличаются от исходной гетерогенной культуры не только по уровню флуоресценции белка TagRFP в клетках, но также и по метаболическим, пролиферативным и туморогенным свойствам.

Ключевые слова: лентивирусная трансдукция, клоны опухолевых клеток, флуоресцентные белки, тубулин, актин, молекулярная визуализация, канцерогенез.

Очевидно, что при имплантации *in vivo* гетерогенных клеточных субпопуляций уровень экспрессии репортерного белка (трансгена) непосредственно влияет на процесс визуализации. Неоднородность распределения, равно как и избыточность экспрессии могут негативно влиять на качество визуализируемых объектов и давать высокую вариативность данных. В связи с этим сталкиваются с дилеммой отбора высокофлуоресцирующих популяций клеток или продолжения работы с гетерогенной флуоресцирующей культурой, которая быстро вырождается. Для получения высококопийной вставки используют лентивирусные кассеты, но, как показывает ряд исследований, интеграция лентивирусных векторов в геном соматических клеток, сопряжена с воздействием на гены [1, 2]. Отбор флуоресцирующих субклонов еще в большей степени подвергает дополнительной

эволюции фенотип и генотип раковых клеток, которые и без того подвержены множественным трансформациям на уровне мРНК и белков.

Ранее в одной из работ мы использовали гетерогенные флуоресцентные линии Hep2-TagRFP для формирования подкожных ксенографтов *in vivo* [3]. В ходе исследования отмечено, что длительное пассирование гетерогенных субклонов приводило к истощению флуоресцирующих клеток в популяции, в связи с чем необходимо было получить субклоны на основе исходной гетерогенной линии.

В рамках данного исследования поставлены задачи изучить уровни экспрессии трансгена (флуоресцирующего белка TagRFP) в клетках Hep2-TagRFP и ее субклонах, описать их морфологию, и сравнить фенотипические и генотипические свойства с исходной гетерогенной клеточной культурой

Изучение характеристик получаемых субклонов важно как для исследований на клеточном уровне, так и для исследований туморогенеза в опухолевых животных ксенографтах.

Линия аденокарциномы гортани Hep2-TagRFP была получена с использованием лентивирусной трансдукции. Последующее клонирование и селекция позволили отобрать два субклона 2B10 и 2F11, стабильно экспрессирующих флуоресцентный белок TagRFP. Анализ клеточного цикла, определение митотического индекса, МТТ-тест, реал-тайм ПЦР, анализ туморогенного потенциала применили для оценки жизнеспособности, скорости пролиферации, способности к инвазии отобранных изогенных клонов и гетерогенной контрольной линии.

Для оценки влияния лентивирусной трансдукции на экспрессию генов цитоскелета и флуоресцентного белка в гетерогенной культуре Hep2-TagRFP и субклонах 2F11 и 2B10 был проведен анализ ключевых характеристик транскрипции. В качестве гена эндогенного контроля выбран ген GAPDH, уровень экспрессии которого оставался стабильным во всех образцах. Уровень экспрессии генов ACTB и TUBB3, которые отвечают за формирование цитоскелета в клетке, выявил отличительные черты между субклонами. Клоны 2F11 и 2B10 демонстрировали существенное снижение наработки транскриптов актина и тубулина по сравнению с гетерогенной клеточной линией Hep2-TagRFP (рис.1). Полученные данные объясняют выявленные морфологические особенности клеток, в частности, очаговый плотный рост колоний, сопровождающийся характерным изменением клеточных полигональных форм на более округлые.

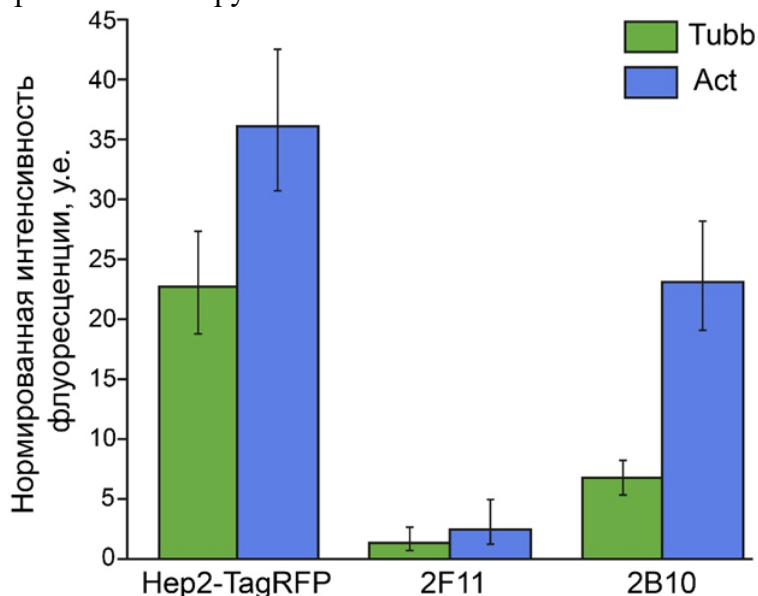


Рисунок 1. Эффективность амплификации актина (Act) и тубулина (Tubb) с нормировкой на GAPDH в количественной ПЦР с использованием Sybr Green. Образцы 2F11, Hep2-TagRFP, 2B10.

Анализ распределения событий в фазах клеточного цикла позволяет оценить жизнеспособность и скорость пролиферации клеток. Для всех трёх линий (исходная материнская, два субклона 2B10 и 2F11) были получены данные распределения событий в периоде 0-36 часов (рис. 1).

Также были произведены расчеты интенсивности деления МИ (митотического индекса) всех трёх образцов. Было отмечено снижение МИ к 36 часам для клонов 2B10 (0,79 %) и 2F11 (0,69 %) в отличие от гетерогенной популяции Hep2-TagRFP, для которой МИ во всем временном интервале не опускался ниже 2%, что позволяет отнести полученные субклоны к низкоделящимся клеткам.

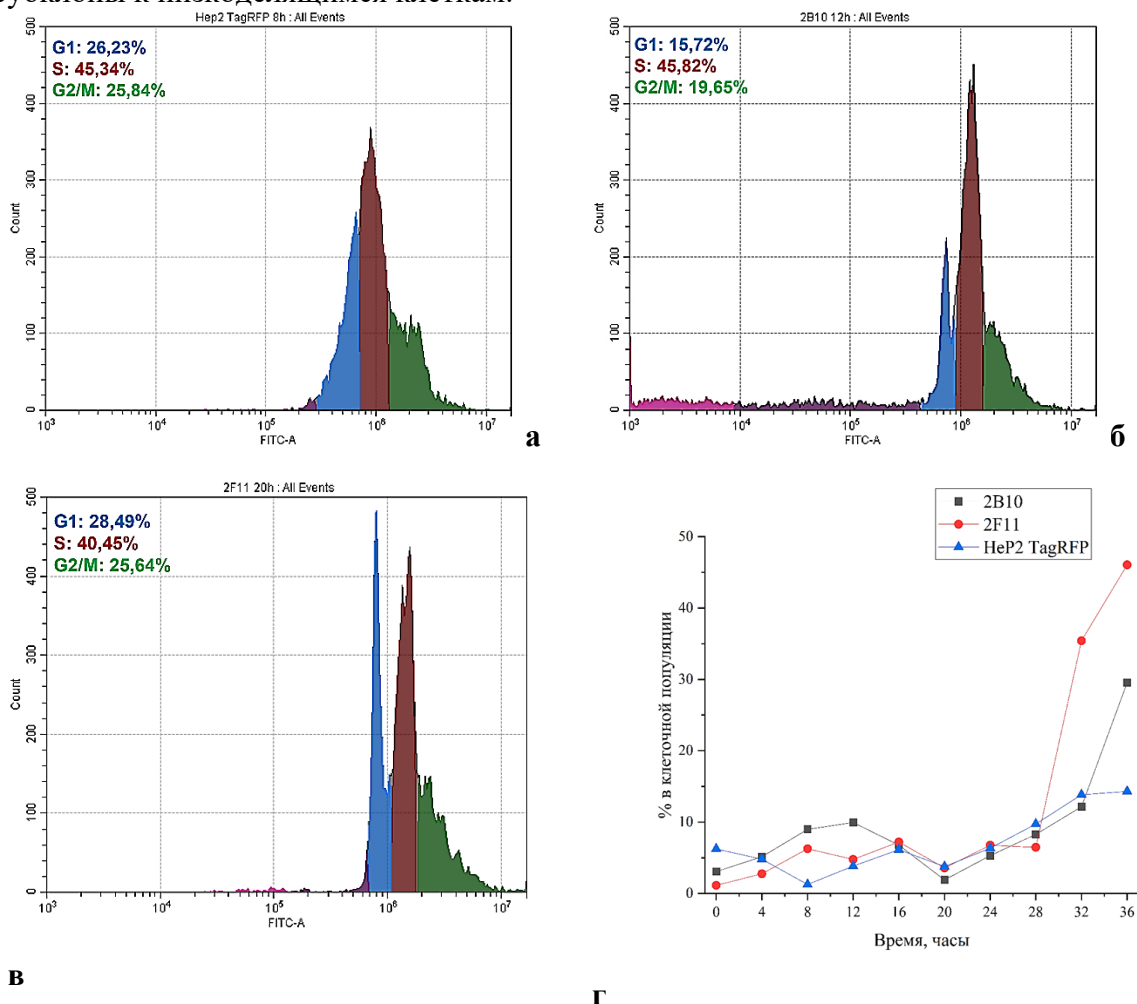


Рисунок 2. Гистограммы распределения клеток в начальной точке фазы митоз для клеток Hep2-TagRFP 8 часов (а), 2B10 12 часов (б), 2F11 20 часов (в) и изменения процентного соотношения популяции апоптотических клеток с течением времени для трёх линий 2B10 (черный), 2F11 (красный), Hep2-TagRFP (синий) (г)

Также полученные субклоны демонстрировали изменение метаболической активности митохондриальных оксидоредуктаз Hep2-TagRFP, 2B10, 2F11 с 1-е по 7-е сутки роста, а предварительная оценка туморогенности полученных субклонов продемонстрировала снижение туморогенного потенциала 2B10 и 2F11 по сравнению с исходной линией Hep2-TagRFP.

Основные выводы

1. Методом лентивирусной трансдукции получены изогенные клеточные клоны, отличающиеся по морфологии от исходной клеточной линии более плотной упаковкой

клеточного монослоя, редуцированием их площади, изменением формы клеток, а также снижением пролиферативного потенциала.

2. При переходе от гетерогенной культуры Hep2-TagRFP к клонам 2B10 и 2F11, в особенности у 2F11, наблюдается закономерное изменение таких характеристик, как: снижение пролиферативного индекса, удлинение клеточного цикла, снижение наработки транскриптов актина и тубулина (*ACTB* и *TUBB3*) и снижение туморогенности в мышах *nude*.

Полученные в данной работе результаты могут быть обусловлены как возможными хромосомными перестройками, которые происходят в опухолевых культурах в процессе их длительного культивирования, так и проблемой сайт-специфичной интеграции, гиперэкспрессией/неравномерной экспрессией трансгена, индуцирующей преждевременное старение и гибель изогенных клонов.

Литература

1. Mátrai, J., Chuah, M. K., & VandenDriessche, T. Recent advances in lentiviral vector development and applications. *Molecular therapy*, 2010; 18(3), 477-490. DOI 10.1038/mt.2009.319.
2. Bandopadhyay, R., Haque, I., Singh, D., & Mukhopadhyay, K. Levels and stability of expression of transgenes. *Transgenic crop plants: principles and development*, 2010; 145-186.
3. Zherdeva, V., Kazachkina, N. I., Shcheslavskiy, V., & Savitsky, A. P. Long-term fluorescence lifetime imaging of a genetically encoded sensor for caspase-3 activity in mouse tumor xenografts. *Journal of biomedical optics*, 2018; 23(3), 035002-035002. DOI 10.1117/1.JBO.23.3.035002.

Список публикаций по теме работы

Статьи

1. Жердева В.В., Рассомакина Н.В., Юркова А.Ю., Монахова М.В., Гук Е.А., Апухтина У.А., Малошенок Л.Г. Снижение экспрессии генов цитоскелета в опухолевых клетках при лентивирусной трансдукции. *Молекулярная генетика, микробиология и вирусология*. 2025;43(1):30-37.

Rassomakina Natalia Vadimovna
RESEARCH CENTRE OF BIOTECHNOLOGY RAS

ANALYSIS OF PHENOTYPIC AND GENOTYPIC DIFFERENCES IN THE SUBCLONES OF TUMOR CELLS OBTAINED AS A RESULT OF LENTIVIRUS TRANSDUCTION

Abstract. *During the transformation of tumor cell lines, an important issue is the preservation of the properties of the original cell line. For real-time monitoring of various molecular processes, reporter protein genes are often introduced. Fluorescent proteins are commonly used as such reporters; however, transfection or transduction of cells with the corresponding genes rarely achieves 100% efficiency. To address this, selection and cloning are employed to obtain highly fluorescent cell populations, which are essential for in vivo imaging during tumorigenesis studies. In this study, phenotypic characteristics and tumorigenic potential were examined in subclones of the human laryngeal adenocarcinoma cell line Hep2-TagRFP, which had previously been transduced with the gene encoding the fluorescent protein TagRFP. It was shown that high transgene copy number affects the expression of key cytoskeletal genes (actin and tubulin), reduces proliferative activity, and alters the metabolic activity of mitochondrial*

oxidoreductases. Additionally, a decrease in tumorigenicity was observed in nude mice injected with these clones.

Key words: *lentiviral transduction, transgene, tumor cell clones, fluorescent proteins, tubulin, actin, encoded fluorescent sensors, cancer imaging.*

Шашин Денис Максимович

аспирант ФИЦ Биотехнологии РАН 2 года обучения

научная специальность 1.5.4 Биохимия

e-mail dmshashin@Gmail.com

Научный руководитель

Шлеева Маргарита Олеговна

доктор биологических наук,

в.н.с., зав. лабораторией биохимии стрессов микроорганизмов



ИДЕНТИФИКАЦИЯ БЕЛКОВ МИКОБАКТЕРИЙ, УЧАСТВУЮЩИХ В ЭКСКРЕЦИИ ПОРФИРИНОВ, КАК МИШЕНЕЙ ДЛЯ УВЕЛИЧЕНИЯ ЭФФЕКТИВНОСТИ АФДТ

Аннотация. Фотодинамическая терапия (ФДТ) – это один из перспективных методов борьбы с бактериальными инфекциями, который может поражать различные формы бактерий, в том числе устойчивые к антибиотикам. ФДТ обусловлена воздействием света на фоточувствительные молекулы, что приводит к образованию активных форм кислорода, которые неспецифично повреждают многочисленные мишени в клетке и приводят к её гибели. Возбудитель туберкулёза – *Mycobacterium tuberculosis* способен накапливать фоточувствительные молекулы – порфирины. Однако, эти пигменты способны транспортироваться из микобактериальной клетки, что может снижать эффективность ФДТ. Методом протеомного анализа мы провели поиск белка-транспортёра порфиринов в условиях стимуляции их синтеза. Нами был обнаружен ряд белков, потенциально значимых для экскреции порфиринов в микобактериях.

Ключевые слова: порфирины, туберкулёз, покоящиеся формы, антибактериальная фотодинамическая терапия, транспорт порфиринов, протеом

Активное распространение антибиотико-резистентных штаммов патогенных бактерий вынуждает искать новые подходы в лечении инфекционных заболеваний бактериальной этиологии. Одним из таких новых подходов является фотодинамическая терапия (ФДТ). Механизм ФДТ основывается на действии света определённой длины волны на фоточувствительные молекулы, что приводит к образованию активных форм кислорода (АФК). Эти радикалы способны неспецифически повреждать широкий спектр мишеней в клетке, что позволяет ФДТ обходить различные механизмы защиты бактерий и не позволять бактериям быстро адаптироваться к этому воздействию [1]. Это особенно важно при терапии туберкулёза – инфекционного заболевания, возбудителем которого является *Mycobacterium tuberculosis*. Среди микобактерий широко распространены штаммы с антибиотикорезистентностью [2], а также они способны образовывать покоящиеся формы. Метаболизм покоящихся форм кардинально замедлен, что делает их устойчивыми к действию большинства антибиотиков. Такие бактерии приводят к развитию латентной формы туберкулёза человека, носителями которой является около четверти населения земли [3].

Ранее было обнаружено, что микобактерии, при переходе в покоящееся состояние накапливают большое количество внутриклеточных порфиринов [4]. Эти молекулы фоточувствительны, что делает *Mycobacterium tuberculosis* хорошей мишенью для ФДТ.

Одной из ключевых целей настоящего исследования является разработка стратегий для индукции синтеза и накопления эндогенных порфиринов непосредственно внутри микобактериальных клеток.

Поскольку транспорт порфиринов из бактериальных клеток в окружающую среду может снижать эффективность аФДТ, мы сосредоточили усилия на изучении этих механизмов. В качестве модельного организма был выбран *Mycolicibacterium smegmatis* (*M. smegmatis*) – быстрорастущий и непатогенный микроорганизм, широко используемый в качестве модельной системы для изучения физиологии и биохимии микобактерий, включая *Mycobacterium tuberculosis*. *M. smegmatis*, подобно туберкулезной палочке, способен накапливать порфирины при переходе в состояние покоя, что делает его релевантной моделью для изучения синтеза и транспорта этих молекул.

Для стимуляции синтеза порфиринов в активно растущей культуре *M. smegmatis* в культуральную среду добавляли 5-аминолевулиновую кислоту (5-АЛК), которая является ключевым предшественником в биосинтезе порфиринов. Через 24 часа после добавления 5-АЛК наблюдалась значительная экскреция порфиринов в культуральную среду, что свидетельствует об активном транспорте этих молекул из бактериальных клеток. В этот момент времени культура была отобрана, подвергнута гомогенизации для разрушения клеточной стенки и выделения внутриклеточного содержимого. Затем была выделена мембранная фракция белков бактерий. Эта мембранная фракция была подвергнута протеомному анализу для идентификации и количественной оценки белков, потенциально участвующих в транспорте порфиринов через мембрану.

В результате проведенного протеомного анализа мембранной фракции *M. smegmatis* был идентифицирован 121 белок, относительное количество которых увеличивалось в процессе активной экскреции порфиринов в культуральную среду после стимуляции синтеза с помощью 5-АЛК. Среди этих 121 белков на основании анализа литературных данных, предсказанной функции и структурных особенностей нами было отобрано 15 наиболее интересных кандидатов, с точки зрения возможного участия в транспорте порфиринов в окружающую среду. Эти белки включали в себя, в частности, белки, содержащие трансмембранные домены, белки, принадлежащие к семействам АТФ-зависимых транспортеров (АВС-транспортеров), и белки, участвующие в метаболизме липидов клеточной стенки.

Для дальнейшего изучения роли этих белков в транспорте порфиринов и их потенциального влияния на эффективность аФДТ туберкулеза, нами были идентифицированы ортологичные белки у *Mycobacterium tuberculosis*. С использованием алгоритмов поиска гомологии последовательностей, таких как BLAST, были определены гены в геноме *M. tuberculosis*, кодирующие белки, наиболее близкие по аминокислотной последовательности к отобранным 15 белкам *M. smegmatis*. Полученные данные будут использованы для дальнейшего исследования роли этих белков в транспорте порфиринов у *M. tuberculosis* и оценки их потенциала в качестве мишеней для ингибирования с целью повышения эффективности аФДТ. В частности, планируется изучение влияния мутаций в генах, кодирующих эти белки, на синтез и транспорт порфиринов, а также на чувствительность *M. tuberculosis* к аФДТ.

При исследовании процесса экскреции порфиринов у *Mycobacterium tuberculosis* нами было выявлено, что логарифмическая культура начинает экспорт детектируемого количества порфиринов в среду культивирования уже на 3 сутки после добавления в среду

роста 3мМ 5-АЛК. Экскреция порфиринов постепенно увеличивается и достигает плато на 9 сутки культивирования. Этот относительно быстрый ответ на добавление 5-АЛК, предшественника в биосинтезе порфиринов, представляет собой интересный феномен, который может быть использован в диагностических целях.

Для дальнейшего изучения механизмов, регулирующих экскрецию порфиринов у *M. tuberculosis*, были получены образцы культуры в момент активной экскреции пигментов. Эти образцы были подвергнуты выделению РНК с последующей обратной транскрипцией в комплементарную ДНК (кДНК). Полученная кДНК будет использована для анализа экспрессии генов-кандидатов, определенных ранее с помощью протеомного анализа *M. smegmatis*.

В дополнение к генам, представляющим интерес с точки зрения транспорта порфиринов, в ходе протеомного анализа был обнаружен белок, кодируемый геном MSMEG_6227 у *Mycobacterium smegmatis*, количество молекул которого значительно увеличивалось во время экскреции порфиринов. Удивительно, но наблюдалось более чем 60-кратное увеличение содержания этого белка. Это значение превосходит все остальные для проанализированных белков и указывает на то, что данный белок играет важную роль в адаптации бактерий к условиям, возникающим при накоплении и транспорте порфиринов.

Кроме того, этот белок обнаружен нами ранее в условиях перехода бактерии в дормантное состояние, индуцированное постепенным закислением среды. Данный белок может играть важную роль не только в метаболизме порфиринов, но и в механизмах выживания бактерий в стрессовых условиях, связанных с изменением pH. Более того, ортолог данного белка у *M. tuberculosis* также демонстрировал повышенный уровень экспрессии при образовании покоящихся форм этих бактерий. Этот консервативный характер изменения экспрессии указывает на важную функциональную роль белка в адаптации микобактерий к стрессовым условиям.

Биоинформатический анализ аминокислотной последовательности белка MSMEG_6227 выявил ряд интересных особенностей. Во-первых, было установлено, что данный белок способен взаимодействовать с РНК, что позволяет предположить его участие в регуляции экспрессии генов. Во-вторых, белок содержит характерный неструктурированный участок, который может определять его способность к взаимодействию с другими белками и нуклеиновыми кислотами. В-третьих, белок проявляет склонность к агрегации, что может быть связано с его функцией в стрессовых условиях. Наконец, обнаруживается некоторое сходство с белками, участвующими в разделении жидких фаз (Liquid-Liquid Phase Separation, LLPS) у других микроорганизмов. LLPS - это процесс, при котором белки и нуклеиновые кислоты самоорганизуются в дискретные капли, которые могут играть роль в организации клеточных процессов и ответе на стресс.

Основные выводы. Установлено, что как *Mycobacterium smegmatis* (модельный организм), так и *Mycobacterium tuberculosis* активно экспортируют порфирины в культуральную среду после стимуляции их синтеза с помощью 5-АЛК. Это указывает на наличие активных механизмов транспорта порфиринов через мембрану микобактерий. Протеомный анализ *M. smegmatis* позволил идентифицировать 121 белок, количество которых увеличивается во время экспорта порфиринов. Из них отобраны 15 белков, представляющих особый интерес с точки зрения транспорта порфиринов. Для 15 отобранных белков *M. smegmatis* были идентифицированы ортологичные гены у *M.*

tuberculosis, что указывает на консервативность механизмов транспорта порфиринов у различных видов микобактерий. К ним относятся: Rv 0341, Rv2564 (оперон Rv2563, Rv2564), Rv3666с (оперон Rv3666с, Rv3665с, Rv3664с, Rv3663с), Rv12 18с, Rv0987 (оперон Rv0987, Rv0986, Rv0988), Rv1258с, Rv3758с, Rv0265с, Rv1819с. *M. tuberculosis* начинает экспортировать порфирины через 3 дня после стимуляции с помощью 5-АЛК, и процесс выходит на плато на 9 сутки, что свидетельствует о регулируемом процессе.

Литература

1. D. M. Shashin и др., «The Effect of Antimicrobial Photodynamic Inactivation on the Protein Profile of Dormant Mycolicibacterium smegmatis Containing Endogenous Porphyrins», International Journal of Molecular Sciences, т. 24, вып. 18. 2023 г. doi: 10.3390/ijms241813968.
2. L. Nguyen, «Antibiotic resistance mechanisms in *M. tuberculosis*: an update», Arch. Toxicol., т. 90, вып. 7, сс. 1585–1604, 2016, doi: 10.1007/s00204-016-1727-6.
3. A. D. Bendre, P. J. Peters, и J. Kumar, «Tuberculosis: Past, present and future of the treatment and drug discovery research», Curr. Res. Pharmacol. Drug Discov., т. 2, с. 100037, 2021, doi: 10.1016/j.crphar.2021.100037.
4. V. D. Nikitushkin, M. O. Shleeva, A. I. Zinin, K. A. Trutneva, D. N. Ostrovsky, и A. S. Kaprelyants, «The main pigment of the dormant Mycobacterium smegmatis is porphyrin», FEMS Microbiol. Lett., т. 363, вып. 19, сс. 1–8, 2016, doi: 10.1093/femsle/fnw206.

Shashin Denis Maksimovich
RESEARCH CENTER OF BIOTECHNOLOGY RAS

IDENTIFICATION OF PROTEINS OF MYCOBACTERIA INVOLVED IN PORPHYRIN EXCRETION AS TARGETS FOR INCREASING THE EFFECTIVENESS OF AFDT

Abstract. *Photodynamic therapy (PDT) is one of the promising methods of combating bacterial infections, which can affect various forms of bacteria, including those resistant to antibiotics. PDT is caused by the effect of light on photosensitive molecules, which leads to the formation of reactive oxygen species, which non-specifically damage numerous targets in the cell and lead to its death. The causative agent of tuberculosis, Mycobacterium tuberculosis, is able to accumulate photosensitive molecules, porphyrins. However, these pigments are able to be transported from the mycobacterial cell, which may reduce the effectiveness of PDT. Using the method of proteomic analysis, we conducted a search for a porphyrin transporter protein under conditions of stimulation of their synthesis. We have discovered a number of proteins that are potentially important for porphyrin excretion in mycobacteria.*

Keywords: *porphyrins, tuberculosis, dormant forms, antibacterial photodynamic therapy, porphyrin transport, proteome.*

Работа выполнена при поддержке РФФ (грант 24-15-00221)

Шехурдина Светлана Витальевна

аспирант ФИЦ Биотехнологии РАН 2 года обучения

научная специальность 1.5.11 Микробиология

e-mail: sh.sweeta@yandex.ru

Научный руководитель

Литти Юрий Владимирович

кандидат биологических наук,

с.н.с., зав. лабораторией,

лаборатории микробиологии антропогенных мест обитания



ВЛИЯНИЕ КАТИОНОВ МАГНИЯ НА АКТИВНОСТЬ ПРЕСНОВОДНОГО АНАММОКС-СООБЩЕСТВА В УСЛОВИЯХ ВЫСОКОЙ СОЛЁНОСТИ

Аннотация. Исследование было направлено на изучение комбинированного влияния солёности и Mg^{2+} на эффективность удаления азота пресноводным анаммокс-сообществом. Внесение Mg^{2+} улучшало удаление азота в условиях солевого стресса за счёт увеличения выработки и изменения состава внеклеточных полимерных веществ. Состав и структура распределения внеклеточных полимерных веществ влияли на способность анаммокс-бактерий к агрегации. Была проведена электрохимическая оценка активности цитохромов с-типа, что позволило определить их влияние на эффективность процесса анаммокс. Полученные результаты свидетельствуют о биотехнологическом потенциале использования катионов Mg для улучшения очистки сточных вод с высоким содержанием соли от азотных загрязнений.

Ключевые слова: анаэробное окисление аммония, внеклеточное полимерное вещество, гранулы анаммокс-сообщества, солёность, внеклеточный перенос электронов, двухвалентные катионы

Анаэробное окисление аммония (анаммокс) в настоящее время считается одним из наиболее перспективных процессов удаления азота при очистке сточных вод. Однако сложность и неоднородность состава сточных вод, а также чувствительность анаммокс-сообщества к условиям окружающей среды ограничивают применение процесса. В частности, высококонцентрированные азотсодержащие промышленные сточные воды часто содержат больше количество солей [2]. Высокая концентрация солей оказывает стрессовое воздействие на микроорганизмы пресноводного анаммокс-сообщества, что приводит к подавлению активности многих ферментов и даже к лизису клеток.

Анаммокс-бактерии обладают высокой склонностью к агрегации, которая позволяет эффективно обеспечивать их удержание в реакторе и снижать неблагоприятное воздействие окружающей среды. Предыдущие исследования показали, что концентрация 20-30 г NaCl/л приводит к снижению гидрофобности и увеличению отталкивающих электростатических сил, что в конечном итоге препятствует агрегации микроорганизмов [2]. Сочетание этих факторов приводит к ухудшению биологической очистки соленых сточных вод. Эффективной стратегией для увеличения активности пресноводного анаммокс-сообщества при повышенной солёности является внесение двухвалентных катионов. В частности, Mg^{2+}

может снижать межклеточное электростатическое отталкивание, усиливая агрегацию анаммокс-бактерий. Отмечалось, что катионы Mg необходимы для синтеза некоторых ферментов, играют ключевую роль в передаче сигналов, транспорте веществ, экспрессии генов и энергетическом метаболизме, что напрямую влияет на рост и развитие микроорганизмов. В некоторых исследованиях сообщалось, что добавление Mg^{2+} способно усиливать секрецию внеклеточных полимерных веществ (EPS). В условиях высокой солёности EPS агрегируют на поверхности клеток, вызывая изменения в потреблении воды и секреции соли, что, в свою очередь, влияет на состояние агрегации клеток и способствует образованию гранул [1]. Таким образом, пресноводные анаммокс-бактерии с высокой способностью к агрегации могут использоваться для очистки сточных вод с высоким содержанием соли. Однако комбинированное взаимодействие анаммокс-сообщества с двухвалентными катионами в условиях солевого стресса изучено слабо.

Целью данной работы являлась оценка эффективности удаления азота в пресноводном анаммокс-сообществе в зависимости от внесения Mg^{2+} в среду (реакторы R1 и R3) со ступенчатым повышением концентрации соли от 0 до 30 г NaCl/л (реакторы R1 и R2) и в условиях постоянного солевого стресса при концентрации соли 30 г NaCl/л (реакторы R3 и R4).

В эксперименте, в ходе которого происходило постепенное увеличение концентрации соли от 0 до 10, 20 и 30 г NaCl/л средняя эффективность удаления общего азота для реактора с добавлением Mg^{2+} (R1) составила $45,6 \pm 0,7\%$, $39,9 \pm 0,4\%$, $27,9 \pm 0,6\%$ и $22,5 \pm 1,2\%$, соответственно. Для реактора без добавления Mg^{2+} (R2) средняя скорость удаления азота на соответствующем этапе была $37,2 \pm 1,2\%$, $29,5 \pm 0,8\%$, $21,7 \pm 1,6\%$ и $14,8 \pm 0,4\%$. Подобная тенденция наблюдается и в реакторах, находящихся в условиях постоянного солевого стресса. Для реактора с добавлением Mg^{2+} (R3) средняя эффективность удаления общего азота оценивалась в $29,7 \pm 0,7\%$, $27,6 \pm 0,4\%$, $20,2 \pm 0,6\%$ и $13,9 \pm 1,2\%$, а для реактора без добавления Mg^{2+} (R4) в $25,8 \pm 0,7\%$, $23,7 \pm 0,4\%$, $18,7 \pm 0,6\%$ и $13,5 \pm 1,2\%$. Без постепенной адаптации сообщества к солёности для R3 и R4 эффективность удаления общего азота была существенно ниже, по сравнению с R1 и R2 при солёности 30 г NaCl/л.

Электрохимическая акцепторная способность гранул увеличилась на 57% для R1 и снизилась на 33%, 38% и 33% для R2, R3 и R4, соответственно. Это свидетельствует о выраженной склонности системы к принятию электронов в окислительно-восстановительных реакциях, что, по-видимому, ускорило реакции восстановления в анаммокс-сообществе. Анаммокс-гранулы содержат большое количество окислительно-восстановительных переносчиков, в частности цитохромов *c*-типа, и оценка их активности коррелирует с эффективностью анаммокс-процесса. Уровень активности цитохромов *c*-типа при 0 г NaCl/л для R1 был ниже на 41% по сравнению с R2, однако, при дальнейшем повышении солёности уровень активности цитохромов *c*-типа увеличивался на 40% и 58%. В условиях постоянного стресса при 30 г NaCl/л активность цитохромов *c*-типа для R3 увеличивалась на 49%, 2% и 15% по сравнению с R4. Общей тенденцией было то, что при увеличении солёности активность цитохромов *c*-типа падает, однако внесение Mg^{2+} помогает поддерживать ее на более высоком уровне.

В ходе эксперимента для R1 дзета-потенциал гранул составил -15,1 мВ, -15,6 мВ, -15,3 мВ, -13,5 мВ, а для R2 составил -15,5 мВ, -15,9 мВ, -16,3 мВ, -17,5 мВ. В условиях стресса для R3 дзета-потенциал колебался на уровне от -17,4 мВ до 17,2 мВ, в то время как

для R4 от -17,7 мВ до -18,02 мВ. Это указывает на то, что поверхность гранул является электроотрицательной, и этот показатель растет с увеличением солёности. В то же время внесение Mg^{2+} помогает снизить негативное воздействие, способствуя снижению межклеточного электростатического отталкивания.

Для выявления причин снижения агрегации анаммокс-сообщества при повышении солёности были проанализированы структурные изменения, а также изменения компонентов и содержания EPS. Согласно КЛСМ анализу, с увеличением солёности между реакторами R1 и R2 наблюдались различия в структуре колоний. При 0 г NaCl/л в R1 и R2 формировалась гомогенная биопленка с равномерным распределением клеток в толще матрикса, и общая структура гранул была более сглаженной. Также в R1 было обнаружено большое количество структурных белков, выполняющих функцию поддержания каркасного матрикса, в то время как в R2 было больше белков, ответственных за клеточную активность. Содержание α и β -полисахаридов в R1 и R2 практически не отличалось. При повышении солёности до 20 г NaCl/л в R1 структура гранул становилась шероховатой, в то время как в R2 подобного не наблюдалось, и структура гранул оставалась сглаженной. В R2 происходило снижение размера гранул, что, вероятно, связано с худшей агрегацией по сравнению с R1, где агрегация гранул поддерживалась за счет внесения Mg^{2+} . β -полисахариды, как и белки, активно участвуют в клеточных процессах, и поэтому располагаются в непосредственной близости от клеток. Солевой стресс существенно влиял на функции и структуру распределения полисахаридов в EPS. В R1 отмечалось равномерное распределение α и β -полисахаридов, в то время как в R2 β -полисахаридов становилось меньше по сравнению с α -полисахаридами в ходе эксперимента. Снижение β -полисахаридов в R2, вероятно, негативно повлияло на агрегацию гранул, в которых β -полисахарид отвечает за поддержание структурной функции.

Согласно данным биохимического анализа наблюдалась общая тенденция к снижению концентрации компонентов EPS с увеличением солёности, однако, при добавлении Mg^{2+} в реакторах R1 и R3 количество EPS существенно увеличивалось. Это позволяет предположить, что влияние двухвалентных катионов может быть связано с изменениями в количестве и составе EPS. Также увеличение солёности приводило к подавлению выработки белков и увеличению синтеза полисахаридов в гранулах анаммокс-сообщества. Согласно литературным данным полисахариды способствуют увеличению гидрофильности EPS, в то время как белки – гидрофобности [2]. Уменьшение соотношения белков к полисахаридам (Б/ПС) приводит к ухудшению гидрофобности поверхности клеток, снижая их способность к агрегации. Исходя из результатов эксперимента, в условиях ступенчатого повышения солёности, соотношение Б/ПС для R1 и R2 снижалось, однако добавление Mg^{2+} в R1, вероятно, помогало поддерживать соотношение на относительно высоком уровне по сравнению с R2. Реакторы R3 и R4 показали относительно низкое соотношение Б/ПС, что, вероятно, в большей степени негативно влияло на агрегацию анаммокс-сообщества.

Анализ СЭМ показал, что при солёности 0 г NaCl/л матрикс был более тонким и эластичным с большим количеством рыхлых гранул. Кроме того, было обнаружено много клеток анаммокс-бактерий, которые были свободны от матрикса. Ступенчатое повышение концентрации соли вызывало уплотнение матрикса и гранул, количество клеток существенно снижалось. В то же время, внесение Mg^{2+} приводило к смягчению матрикса,

появлению рыхлых гранул с открытыми участками, в которых прослеживалось наличие клеток анаммокс-бактерий.

В анаммокс-сообществе на протяжении всего эксперимента во всех реакторах основным представителем анаммокс-бактерий был *Candidatus* Kuenenia. Наиболее обильной группой всех реакторов была *SBR1031* (филум *Chloroflexota*). При увеличении солёности возрастала относительная численность бактерий *SWB02* (филум *Pseudomonadota*) и *Limnobacter*, способных к синтезу EPS для защиты гранул анаммокс от стресса. Для R3 и R4 была обнаружена высокая представленность гидролитических микроорганизмов родов *Pseudomonas*, *Alkaliflexus*, *Crassaminicella* и гетеротрофных денитрификаторов родов *Denitratisoma* и *Arenimonas*, что, вероятно связано с адаптационной сукцессией из-за нарушения стабильности функционирования микробного сообщества в связи с гибелью микроорганизмов в условиях солевого стресса.

Основные выводы. Более высокая эффективность удаления азота в условиях солевого стресса наблюдалась при постепенной адаптации анаммокс-сообщества. Добавление Mg^{2+} способствовало увеличению эффективности удаления азота при всех концентрациях соли. Также Mg^{2+} положительно влиял на активность цитохромов *c*-типа в условиях высокой солёности. При повышении солёности наблюдалось ухудшение агрегации клеток, отражающееся в изменении структуры и размера гранул. Данные перестройки связаны с увеличением выработки полисахаридов и их перераспределением в сторону преобладания α -полисахаридов. Облегчение солевого стресса, по-видимому, тесно связано с внесением Mg^{2+} , который повлиял на выработку, а также на количество белка, содержащегося в EPS.

Литература

1. Wang P., Lu B., Chai X. Novel insights into self-defense function of anammox sludge under magnesium ions (Mg^{2+}) stress based on Mg^{2+} transport system // Bioresource Technology. – 2024. – Vol. 414. – P. 131615.XXX
2. Zhang A., Wang S., Yang M., Li H., Wang H., Fang F., Guo J. Influence of NaCl salinity on the aggregation performance of anammox granules // Journal of Water Process Engineering. – 2021. – Vol. 39. – P. 101687.

Список публикаций по теме работы

Тезисы докладов

1. Shekhurdina S.V., Zhuravleva E.A., Laikova A.A., Andreev E.A., Loiko N.G., Ivanenko A.A., Kovalev A.A., Kovalev D.A., Litti Y.V. The impact of flue dust on the anaerobic digestion of volatile fatty acids by methanogenic biofilms grown on conductive and non-conductive surfaces. International Conference Innovations in Biotechnology for Sustainability (New Delhi, India, 23-25 November 2024) – 347 с. (постерный доклад, сертификат за лучший устный и постерный доклад).

Shekhurdina Svetlana Vitalievna
RESEARCH CENTER OF BIOTECHNOLOGY RAS

EFFECT OF MAGNESIUM CATIONS ON THE ACTIVITY OF FRESHWATER ANAMMOX COMMUNITY UNDER HIGH SALINITY CONDITIONS

Abstract. *The study aimed to investigate the combined effect of salinity and magnesium (Mg^{2+}) on the efficiency of nitrogen removal by freshwater anaerobic ammonium oxidation (anammox) communities. The addition of magnesium improved nitrogen removal under conditions of salt stress by increasing the production of extracellular polymeric substances and altering their composition. The composition and structure of these substances influenced the aggregation ability of anammox bacteria. An electrochemical assessment of c-type cytochrome activity was performed to determine its effect on the anammox process's effectiveness. The results indicate the potential for using magnesium cations in biotechnologies to improve wastewater treatment from nitrogen pollution with high salt content.*

Keywords: *anaerobic ammonium oxidation, extracellular polymeric substance, anammox granules, salinity, extracellular electron transfer, divalent cations.*

Ефремова Кристина Валерьевна

аспирант ФИЦ Биотехнологии РАН 1 года обучения

научная специальность 1.5.6 Биотехнология

e-mail: kristina.efremova.1221@mail.ru

Научный руководитель

Миронов Владимир Витальевич

доктор технических наук, профессор

руководитель группы микробных процессов

конверсии органических отходов



БИОКОНВЕРСИЯ АГРО-ПИЩЕВЫХ ОТХОДОВ В ПРОДУКТЫ С ДОБАВЛЕННОЙ СТОИМОСТЬЮ

Аннотация. *Пищевая и сельскохозяйственная промышленности, как и другие отрасли, характеризуются значительным объемом образующихся отходов. Одним из возможных решений данной проблемы является преобразование отходов в полезные продукты в процессе компостирования – контролируемого биологического разложения сложных органических веществ животного и/или растительного происхождения до более простых и стабильных соединений. Хотя агро-пищевые отходы изначально населены разнообразной микробиотой, для оптимизации процессов биоконверсии считается необходимым внесение микроорганизмов, обладающих повышенной деградационной способностью.*

В связи с вышесказанным, на первом этапе работы были выявлены активные автохтонные микроорганизмы для быстрого разложения пищевых отходов в условиях аэробного компостирования.

Ключевые слова: *компостирование, микроорганизмы компоста, гидролитические микроорганизмы, Bacillus, Penicillium, пищевые отходы*

Пищевые отходы (ПО), образующиеся на всех этапах производства и потребления продуктов питания, представляют собой неоднородную смесь органических остатков. Компостирование считается эффективным методом переработки ПО в полезные продукты, вместо их захоронения или сжигания. Тем не менее, имеются некоторые сложности при компостировании ПО, например, высокое содержание органических веществ в субстрате и их быстрая трансформация на начальном этапе процесса приводит к подкислению среды, что, в свою очередь, может спровоцировать сбой из-за снижения активности микроорганизмов и получение компоста низкого качества [7]. В связи с этим, считается возможным использовать так называемые «инокулированные микроорганизмы» (ИМ), которые обладают повышенной гидролитической активностью, что является ключом к улучшению биоконверсии и стабилизации органических веществ во время компостирования [1].

В качестве ИМ считается перспективным использовать микроорганизмы, выделенные в процессе компостирования, предполагая, что они наиболее адаптированы к условиям протекания данного процесса [1], например, представителей родов *Bacillus*, *Caldibacillus*, *Aspergillus* и *Penicillium*, которые были охарактеризованы как доминирующие деструкторы при аэробном компостировании [6].

В нашей работе мы исследовали влияние разного объема добавленных бактериальных суспензий. Общая концентрация бактерий, добавленных в компостируемый субстрат, составила $\sim 10^5$ и $\sim 10^8$ КОЕ/г сырой массы ПО; грибов – $\sim 10^4$ КОЕ/г сырой массы ПО. ИМ можно вводить на разных фазах компостирования. В нашей работе мы вносили ИМ в начале процесса (Вариант 1), затем компостировали в течение 28 суток, после чего в контрольный вариант (без инокулята) была добавлена вода до оптимальной влажности около 60% (по массе) и суспензия микроорганизмов, таким образом был получен опытный Вариант 2. Далее Вариант 2 был компостирован ещё в течение 21 дня. Влияние состава инокулята на эффективность компостирования оценивалось по образованию CO_2 (основной критерий), образованию NH_3 и температуре компостирования T_{av} (дополнительные критерии).

Компостирование проводилось в опытно-промышленной испытательной системе в течение 49 дней в 8 идентичных камерах. Конструкция и эксплуатационные характеристики используемой системы соответствовали значениям [5].

Полученные чистые культуры проверяли на способность гидролизовать различные органические соединения: крахмал, белки (казеин), целлюлозу и липиды (Твин-80) аналогично [3]. Для оценки активности культуры использовали соотношение диаметра зоны гидролиза к диаметру колонии [2]. 10 культур с наибольшей гидролитической активностью были отобраны для 2 бактериальных составов (B1, содержащий пять культур рода *Bacillus*, способные расщеплять белки, крахмал, целлюлозу и частично липиды; B2 – *Bacillus subtilis* и *Bacillus amyloliquefaciens*, способные гидролизовать белки, крахмал и целлюлозу, но не расщепляющие липиды (Твин-80)) и грибного состава F (две культуры были идентифицированы на уровне рода *Penicillium*, а две другие представляли собой смесь *Penicillium crustosum* и *Penicillium chrysogenum*) инокулята. Культуры, входящие в составы B1, B2 и F, не подавляли рост друг друга. Проверка на перекрестный антагонизм проведена по [4].

Основные выводы. В зависимости от стадии компостирования и типа органических соединений для интенсификации процесса следует применять разные стратегии инокуляции. В начале процесса, когда субстрат богат легко разлагаемыми органическими материалами и влажность высока, эффективна инокуляция бактериями *Bacillus*. Однако для преодоления конкуренции с собственной микробиотой отходов требуется высокая концентрация инокулята ($\sim 10^8$ КОЕ/г ПО). На этапе охлаждения, для разложения более устойчивых соединений, целесообразно использовать культуры *Penicillium*.

Применение *Bacillus* на начальном этапе компостирования обеспечило быстрое разложение органического субстрата, что выражалось в значительном увеличении образования CO_2 по сравнению с не инокулированным контролем. Доминирование ИМ *Bacillus* над автохтонной микробиотой приводило к преобладанию ферментативных процессов, что, вероятно, ограничивало выделение тепла, но способствовало образованию летучих органических соединений, при этом выработка аммиака оставалась стабильной. После внесения *Penicillium* на 28 день компостирования произошло разложение более сложных соединений, что отразилось в увеличении продукции CO_2 , а также в повышении температуры и выделении аммиака.

Добавление активных дегрантов в процесс компостирования интенсифицирует разложение органических веществ, приводит к формированию более качественного и ценного продукта – компоста с улучшенными агрономическими характеристиками,

который можно эффективно использовать для улучшения плодородия почвы и повышения урожайности сельскохозяйственных культур.

Литература

1. Critical evaluation of post-consumption food waste composting employing thermophilic bacterial consortium / Awasthi M. K. [et al.] // *Bioresource technology*. 2017. Vol. 245. P. 665-672. URL: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0960852417315559?via%3Dihub> (дата обращения: 27.04.2025).
2. Hankin L., Zucker M., Sands D. C. Improved solid medium for the detection and enumeration of pectolytic bacteria // *Applied Microbiology*. 1971. Vol. 22. №. 2. P. 205-209. URL: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/am.22.2.205-209.1971> (дата обращения: 20.04.2025).
3. Isolation and screening of potential actinobacteria for rapid composting of rice straw / Kausar H. [et al.] // *Biodegradation*. 2011. Vol. 22. P. 367-375. URL: <https://link.springer.com/article/10.1007/s10532-010-9407-3> (дата обращения: 20.04.2025).
4. Lertcanawanichakul M., Sawangnop S. A comparison of two methods used for measuring the antagonistic activity of *Bacillus* species // *Walailak Journal of Science and Technology (WJST)*. 2008. Vol. 5. №. 2. P. 161-171. URL: https://www.researchgate.net/publication/289652949_A_Comparison_of_Two_Methods_Used_for_Measuring_the_Antagonistic_Activity_of_Bacillus_Species (дата обращения: 20.04.2025).
5. Mironov V., Trofimchuk E., Plutalova A. Degradation of high concentrations of commercial polylactide packaging on food waste composting in pilot-scale test // *Bioresource Technology*. 2024. Vol. 410. P. 131288. URL: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960852424009921?via%3Dihub> (дата обращения: 20.04.2025).
6. Pollutant emissions from municipal biowaste composting: comparative analysis and contribution of N-containing organic compounds / Mironov V. [et al.] // *Energies*. 2023. Vol. 16. №. 21. P. 7271. URL: <https://www.mdpi.com/1996-1073/16/21/7271> (дата обращения: 20.04.2025).
7. Wang Y., Tang Y., Yuan Z. Improving food waste composting efficiency with mature compost addition // *Bioresource Technology*. 2022. Vol. 349. P. 126830. URL: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0960852422001596> (дата обращения: 25.04.2025).

Список публикаций по теме работы

Статьи

1. Enhancing aerobic composting of food waste by adding hydrolytically active microorganisms / Mironov V. [et al.] // *Frontiers in Microbiology*. 2024. Vol. 15. P. 1487165. URL: <https://www.frontiersin.org/journals/microbiology/articles/10.3389/fmicb.2024.1487165/full>.
2. Роль аммиака в деструкции полипропиленкарбоната в условиях ускоренного компостирования / Черникова Е. В. [и др.] // *Высокомолекулярные соединения. Серия Б*. 2024. Т. 66. №4. С. 246-260. URL: <https://journals.rcsi.science/2308-1139/article/view/279932>.

Тезисы докладов

1. Полярное проявление свойств *C. rosea* как патогена и агента биоконтроля на различных сельскохозяйственных культурах / Давыдова Д. С. [и др.] // Сборник трудов, приуроченных к Всероссийской студенческой научно-практической конференции «Актуальные вопросы сельскохозяйственной микробиологии», посвященной 100-летию со дня рождения В.Т. Емцева / Под ред. Козлова А. В., Маннаповой Р. Т., Волобуевой О. Г.,

Селицкой О. В., Уварова Г. В., Дятлова И. С., Верзуновой Л. В., Махныревой О. Е. – М.: ФГБОУ ВО РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева; ООО «Мегаполис». 2024. 293 с. (тезисы и устный доклад).

2. Фитопатогенный вид *Penicillium solitum* / Давыдова Д. С. [и др.] // Сборник трудов, приуроченных к Всероссийской студенческой научно-практической конференции «Актуальные вопросы сельскохозяйственной микробиологии», посвященной 100-летию со дня рождения В.Т. Емцева / Под ред. Козлова А. В., Маннаповой Р. Т., Волобуевой О. Г., Селицкой О. В., Уварова Г. В., Дятлова И. С., Верзуновой Л. В., Махныревой О. Е. – М.: ФГБОУ ВО РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева; ООО «Мегаполис». 2024. 293 с. (тезисы и устный доклад).

Efremova Kristina Valerevna
RESEARCH CENTER OF BIOTECHNOLOGY RAS

BIOCONVERSION OF AGRO-FOOD WASTE INTO VALUE-ADDED PRODUCTS

Abstract. *The food and agricultural industries, like other industries, are characterized by a significant volume of waste generated. One of the possible solutions to this problem is the conversion of waste into useful products in the process of composting – controlled biological decomposition of complex organic substances of animal and/or plant origin into simpler and more stable compounds. Although agro-food waste is initially populated by a diverse microbiota, in order to optimize the bioconversion processes, we consider it is necessary to additionally introduce microorganisms with increased degradation capacity.*

In connection with the above, at the first stage of the work, active autochthonous microorganisms were identified for the rapid decomposition of food waste under aerobic composting conditions.

Keywords: *composting, compost microorganisms, hydrolytic microorganisms, Bacillus, Penicillium, food waste*

Работа выполнена при поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации в соответствии с соглашением № 075-15-2022-318 от 20 апреля 2022 года. Грант был предоставлен для государственной поддержки создания и развития Научного центра мирового уровня «Агротехнологии будущего».

Илясов Игорь Олегович

аспирант ФИЦ Биотехнологии РАН 1 года обучения

научная специальность 1.5.4 Биохимия

e-mail: i.ilyasov@fbras.ru

Научный руководитель

Бойко Константин Михайлович

кандидат биологических наук

с.н.с. лаборатории инженерной энзимологии



СТРУКТУРНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ АНТИТЕЛО-АНТИГЕН ДЛЯ РЯДА НЕЙТРАЛИЗУЮЩИХ ОДНОДОМЕННЫХ АНТИТЕЛ К ТЕРАПЕВТИЧЕСКИМ МИШЕНЯМ

Аннотация. Изучение структурных детерминант связывания моноклональных антител с антигеном, а также особенностей организации их эпитопов открывают большие возможности для оценки терапевтического потенциала антител, оптимизации и направленного дизайна новых антиген-связывающих агентов, а также для разработки рекомбинантных вакцин. В данной работе в качестве объектов для структурного исследования были выбраны следующие антитела и их целевые мишени с потенциалом практического медицинского применения: однодоменное антитело B5 к N-концевому домену S-белка вируса SARS-CoV-2; тяжелоцепочечное антитело A3.2 к токсину B *Clostridioides difficile*; однодоменное антитело A1.3 к CROPs домену токсина B *C. difficile*; тяжелоцепочечное антитело G2.3 к гемагглюнину вируса гриппа H1N1.

Ключевые слова: моноклональные антитела, однодоменные антитела, SARS-CoV-2, грипп, гемагглютинин, TcdB, *Clostridioides difficile*, клостридиоз, коронавирус.

Объем мирового рынка моноклональных антител превышает 200 миллиардов долл. США, они являются эффективным средством для профилактики и лечения ряда инфекционных заболеваний. Особого внимания заслуживают однодоменные антитела, найденные у представителей сем. *Camelidae*, лишенные легких цепей и имеющие более компактный антигенсвязывающий участок в сравнении с каноническими антителами позвоночных [1]. При этом переменные домены однодоменных антител, несмотря на меньший размер, не уступают в аффинности и специфичности каноническим антителам [2]. Более того, они имеют ряд преимуществ, в частности, способность распознавать труднодоступные эпитопы, высокую стабильность, простоту создания поливалентных форм и более низкую стоимость производства [3].

Важным аспектом изучения и разработки моноклональных антител, как препаратов для иммунотерапии, является установление деталей организации эпитопа и структурных особенностей связывания с антигеном. Это позволяет подтвердить универсальность нейтрализующего антитела, связывающегося с консервативным участком антигена и имеющего низкий риск возникновения эскейп-мутантов. Понимание структурного взаимодействия антиген-антитело также способствует направленной модификации антител для улучшения аффинности и использованию современных подходов ИИ в молекулярном дизайне новых компонентов рекомбинантных вакцин. Целью данной работы является

получение и детальная структурная характеристика комплексов нейтрализующих однодоменных антител с их целевыми мишенями, имеющих потенциал практического медицинского применения. В качестве объектов исследования были выбраны следующие белки: однодоменное антитело B5 к N-концевому домену (NTD) S-белка SARS-CoV-2; тяжелоцепочечное антитело A3.2 (A3.2-Fc) к токсину В *Clostridioides difficile*; однодоменное антитело A1.3 к домену комбинированных повторяющихся олигопептидов (combined repetitive oligopeptides, CROPs) токсина В *Clostridioides difficile* (TcdB) и тяжелоцепочечное антитело G2.3 (G2.3-Fc) к гемагглютинирующему вирусу гриппа N1H1.

Для каждого из объектов исследования были поставлены следующие задачи:

1. Получить антиген и антитело в количествах и с чистотой, необходимых для последующих структурных исследований методами рентгеноструктурного анализа и криоэлектронной микроскопии.
2. Провести пробоподготовку (кристаллизацию, витрификацию) для использования указанных структурных методов.
3. Получить структурные данные, провести их обработку и реконструкцию структур, а также провести их сравнительный анализ.

1. Антитело к NTD-домену S-белка вируса SARS-CoV-2. Однодоменное антитело B5 нацелено на N-концевой домен S-белка вируса SARS-CoV-2 и обладает широкой нейтрализующей активностью. Продукцию NTD провели в клетках CHO-S (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), продукцию антитела провели в клетках *E. coli* штамма Rosetta DE3. Белки VHH B5 и NTD были выделены в ходе двухэтапной очистки аффинной хроматографией и гель-фильтрацией. Способность однодоменного антитела B5 взаимодействовать с полученным рекомбинантным белком NTD была проверена с помощью неконкурентного иммуоферментного анализа, полумаксимальная эффективная концентрация составила 65.42 ± 10.49 нг/мл. Было выделено 2.1 мг комплекса NTD с VHH антителом B5 соочисткой с помощью гель-фильтрации. Для полученного препарата был проведен широкий скрининг кристаллизационных условий с использованием роботизированной системы кристаллизации Rigaku (USA) и коммерческих наборов PegIon HT, Crystal Screen HT, PegRX HT и Index HT (Hampton Research, USA). Получены условия, в которых наблюдается рост кристаллов малого размера. В настоящее время проводится оптимизация полученных условий кристаллизации.

2. Антитела к токсину В *Clostridioides difficile* штамма 630. *C. difficile* является ведущей причиной нозокомиальной антибиотик-ассоциированной диареи. Возбудитель продуцирует три белковых токсина [4], один из которых, TcdB, является объектом данного исследования. TcdB состоит из четырех доменов: N-концевого гликозилтрансферазного домена, аутопротеазного домена, домена для доставки и участвующего в связывании с рецепторами С-концевого домена CROPs [4].

Продукцию мутантной неактивной формы полноразмерного токсина В (aTcdB) проводили в *Bacillus megaterium* штамма WH320 (MoBiTec GmbH, Gottingen, Germany), антитело A3.2-Fc продуцировали в клетках CHO-S Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA). Рекомбинантные aTcdB и A3.2-Fc были выделены и был получен стехиометрический комплекс антиген-антитело для структурных исследований. КриоЭМ данные были получены на просвечивающем электронном микроскопе Titan Krios 60-300 (Thermo Fisher

Scientific, США) в НИЦ «Курчатовский институт», обработку данных проводили на сервере ФИЦ Биотехнологии РАН с помощью ПО CryoSPARC. В настоящее время ведется обработка полученных структурных данных.

Для однодоменного антитела A1.3 ранее было установлено расположение эпитопа в домене CROPs, поэтому было решено выделить комплекс данного домена токсина В с однодоменным антителом A1.3 для кристаллизации. Продукцию однодоменного антитела A1.3 и домена CROPs TcdB провели в клетках *E. coli* Rosetta DE3. После двухэтапной очистки аффинной хроматографией и гель-фильтрацией для VHH A1.3 была рассчитана полумаксимальная эффективная концентрация с помощью неконкурентного иммуоферментного анализа, которая составила 9.53 ± 1.71 нг/мл. Выделить комплекс для кристаллизации пока не удалось, ввиду нестабильности фрагмента токсина В. В этой связи планируется разбить дальнейшую работу на два направления – получение более мелких фрагментов домена CROPs, связывающихся с антителом и кристаллизация такого комплекса, и криоЭМ исследование комплекса полноразмерного CROPs с антителом.

3. Антитело к гриппу H1N1. Грипп остается одной из самых распространенных и контагиозных респираторных инфекций, вызывая более 1 миллиарда инфекций и около 500 000 смертей ежегодно. Основная проблема профилактики и терапии гриппа заключается в крайне высокой изменчивости вирусных белков (гемагглютинина и нейраминидазы), что приводит к быстрому появлению устойчивости к существующим противовирусным препаратам и вакцинам. Поверхностный тримерный вирусный белок гемагглютинин (HA) является одним из основных компонентов оболочки вируса, и терапия с использованием антител к его консервативным областям в области «стеблевого» домена (SD) может оказаться эффективной стратегией. Ранее была получена серия однодоменных антител к SD, среди которых клон G2.3 оказался одним из самых аффинных, константа диссоциации составила 0.55 нМ [2]. Для криоЭМ исследований был получен комплекс антитела G2.3-Fc с HA H1N1. КриоЭМ данные были получены на просвечивающем электронном микроскопе Titan Krios 60-300 (Thermo Fisher Scientific, США) в НИЦ «Курчатовский институт», обработку данных проводили на сервере ФИЦ Биотехнологии РАН с помощью ПО CryoSPARC. На основании полученных данных была построена 3D-реконструкция с максимальным разрешением 3 Å. На карте плотности распределения потенциала четко видна тримерная организация комплекса, состоящая из гетеродимеров HA и варибельного домена антитела, позволившая картировать антиген и идентифицировать остатки, участвующие в образовании интерфейса антиген-антитело.

Основные выводы

1. Был получен препарат комплекса NTD с VHH-B5 в количестве 2.1 мг, который был закристаллизован. Определенная полумаксимальная эффективная концентрация для однодоменного антитела B5 составила 65.42 ± 10.49 нг/мл.
2. Получен препарат CROPs домена токсина В *C.difficile* и антитела A1.3 к нему. Оценена полумаксимальная эффективная концентрация A1.3 к CROPs, которая составила 9.53 ± 1.71 нг/мл. Получен препарат полноразмерного токсина В *C.difficile* и антитела A3.2 к нему. Получены данные криоЭМ, проводится реконструкция структуры.
3. Получена структура тримера гемагглютинина с антителом G2.3-Fc. Анализ структуры позволил выявить расположение эпитопа, который согласуется с экспериментальными данными, полученными ранее неструктурными методами.

Литература

1. Conrath K. E. et al. Emergence and evolution of functional heavy-chain antibodies in Camelidae //Developmental & Comparative Immunology. – 2003. – V. 27. – №. 2. – P. 87-103.
2. Voronina D. V. et al. Development of neutralizing nanobodies to the hemagglutinin stem domain of influenza A viruses //Acta Naturae. – 2021. – V. 13. – №. 4. – P. 33-41.
3. Saerens D., Ghassabeh G. H., Muyldermans S. Single-domain antibodies as building blocks for novel therapeutics //Current opinion in pharmacology. – 2008. –V. 8. – №. 5. – P. 600-608.
4. Aktories K., Schwan C., Jank T. Clostridioides difficile toxin biology //Annual review of microbiology. – 2017. – V. 71. – №. 1. – P. 281-307.

Ilyasov Igor Olegovich

RESEARCH CENTER OF BIOTECHNOLOGY RAS

STRUCTURAL STUDY OF ANTIBODY-ANTIGEN INTERACTIONS OF NEUTRALIZING SINGLE-DOMAIN ANTIBODIES TOWARDS THERAPEUTIC TARGETS

Abstract. *The structural study of monoclonal antibodies interactions with their antigens allow assessing the therapeutic potential of antibodies, optimizing and design of new antigen-binding agents, and developing recombinant vaccines. In this study, the following antibodies and their targets with potential for practical medical application were selected as objects for structural research: VHH antibody B5 to the N-terminal domain of the Wuhan strain of SARS-CoV-2 S-protein; full-length antibody A3.2 to Clostridioides difficile toxin B; VHH antibody A1.3 to the CROPs domain of C. difficile toxin B; full-length antibody G2.3 to the hemagglutinin of the H1N1 influenza virus.*

Keywords: *monoclonal antibodies, single-domain antibodies, SARS-CoV-2, influenza, hemagglutinin, clostridial toxin B, clostridiosis, coronavirus.*

Колесов Денис Эдуардович

аспирант ФИЦ Биотехнологии РАН 1 года обучения

научная специальность 1.5.3 Молекулярная биология

e-mail: 52ru111@mail.ru

Научный руководитель

Воробьёв Иван Иванович

доктор биологических наук,

в.н.с., зав. лабораторией биоинженерии клеток млекопитающих



ИССЛЕДОВАНИЕ МЕТАБОЛИЧЕСКИХ СВОЙСТВ АПОПТОЗ РЕЗИСТЕНТНЫХ КЛЕТОК СНО, ИСПОЛЬЗУЮЩИХСЯ ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ ЛИНИЙ ПРОДУЦЕНТОВ ТЕРАПЕВТИЧЕСКИХ БЕЛКОВ

Аннотация. *Выполнен анализ данных полногеномного секвенирования устойчивой к апоптозу клеточной линии СНО 4BGD с гомозиготными нокаутами генов BAK1, BAX, DHFR, GLUL с целью описания событий редактирования. На основе данной линии при помощи двухэтапной селекции получены клетки с гомозиготными нокаутами гена FUT8 для производства афукозилированных антител; рассчитан процент клонов с генотипом FUT8(-/-) до и после селекции лектином чечевицы. Исследовано влияние замены сигнальных пептидов и введения дополнительных копий комплекса сигнал узнающей частицы (SRP) на выход целевых белков в клетках продуцентах на основе СНО 4BGD.*

Ключевые слова: *клетки СНО, редактирование генома, афукозилированные антитела, метаболическая инженерия, сигнальные пептиды.*

В настоящее время наиболее часто используемой культурой клеток млекопитающих для производства терапевтических рекомбинантных белков являются клетки яичников китайского хомячка (СНО). Большинство используемых в биофармацевтическом производстве линий клеток СНО были получены ещё в прошлом столетии при помощи методов химического мутагенеза, в результате чего их геном претерпел структурные изменения. Использование систем направленного редактирования, таких как CRISPR/Cas9 значительно расширяет возможности для инженерии клеток СНО, позволяя с высокой эффективностью осуществлять избирательный нокаут генов, отвечающих за жизнеспособность культуры, синтез целевых белков и профиль гликозилирования.

Ранее в лаборатории, при помощи двух последовательных раундов редактирования клеток СНО S, была получена клеточная линия СНО 4BGD, не содержащая активных аллелей проапоптотических генов Bak1 и Bax, а также генов метаболических селекционных маркеров: дигидрофолатредуктазы (DHFR) и глутаминсинтетазы (GS), и содержащая дополнительные копии генов антиапоптотического белка Bcl-2 и индуктора макроаутофагии Beclin-1 [1]. По данным полногеномного секвенирования события редактирования были подтверждены для каждой из 5 использованных направляющих РНК; при помощи перекрывающихся прочтений были охарактеризованы события замен, делеций и вставки чужеродной ДНК, которые относились либо к геному E. Coli-TOP10, либо к плазмиде, кодирующей Cas9. Также были рассмотрены все локусы в геноме, в которых гРНК имели гомологию не менее 16 нуклеотидов из 20, а следующие 3 нуклеотида

соответствовали приемлемому РАМ-сайту нуклеазы Cas9 (всего 468 локусов и 14 потенциальных сайтов нецелевого разрезания). Все предполагаемые нецелевые эффекты относятся к межгенным областям и ни один ген не содержал мутаций в ОРС в результате редактирования.

```

glul
intact  GATGGCCTCCTCGATGTGCC-----TGGTGAAG
edited1 GATGGCCTCCTCGATGTGCCGTC...ATAGCCTGGTGAAG
          insertion 7: NC_048598.1:133334084-133334247
edited2 GATGGCCTCCTCGATGT-----CAAAGGTTGCTATTA
          deletion NC_048598.1:37798326 - 37798901

bak1
intact  CCAGGAAGCCGGTCAAACACGTTGGTAG
edited1 CCAGGAAGCCGGT-----GTTGGTAG
edited2 CCAGGAAGCCG-----GTTGGTAG

bax
intact  TTTGCTGATGGCAACTTCAA-CTGGGGCCG
edited  TTTGCTGATGGCAACTTCAAACTGGGGCCG

dhfr
intact  CTAGGTGATCGCTGCTGCTG-----TCATGGTTC...TCGGCAAGAACGGAGACCTTCCCTGGCCA
edited1 CTAGGTGATCGCTGCTGCTGGCT...ACGCTGTCATGGTTC...TCGGCAAGAACGGAGA-----CCTGGCCA
          NZ_CP080620.1:349443-349443250  NZ_CP080620.1:941407-941471

dhfr
intact  CTAGGTGATCGCTGCTGCTG-----TCATGGTTC...TCGGCAAGAACGGAGAC---CTTCCCTGGCCA
edited2 CTAGGTGCTA...CCGTGT...GTATCATGGTTC...TCGGCAAGAACGGAGACCTTCTTCCCTGGCCA
          px458N:5809-5877  NZ_CP080620.1:1845932-1846016

```

Рис. 3. Консенсусные последовательности участков редактирования генов *glul*, *bak1*, *bax* и *dhfr* согласно данным полногеномного секвенирования, синим цветом обозначены участки направляющих РНК, красным - РАМ сайты, фиолетовым - вставки чужеродной ДНК.

Другим перспективным направлением является изменения профилей гликозилирования целевых белков. Например, нокаут гена *FUT8* (α -1,6-фукозилтрансферазы) позволяет получать дефукозилированные антитела, которые демонстрируют повышенную антителозависимую клеточную цитотоксичность (ADCC) за счет повышения аффинности к Fc гамма IIIa рецептору [2], что уже находит применение в терапевтических антителах (Обинутузумаб, Бенрализумаб, Могамулизумаб).

Инактивация гена *FUT8* проводилась в клетках CHO-4BGD путем введения пары гидовых РНК к гену *FUT8* и плазмиды PX459, кодирующей Cas9 и ген устойчивости к пурамицину. Дополнительная инкубация клеток с лектином чечевицы (*Lens Culinaris* Agglutinin) позволила увеличить число отредактированных аллелей на 70%. После клонирования были отобраны клетки, обладающие длинной делецией в обоих аллелях *FUT8* и наилучшими ростовыми свойствами. Получение линий продуцентов было отработано на модельном Fc-слитном белке (дулаглутид). Доля остаточных фукозилированных гликанов рассчитана по данным масс-спектрометрии.



Рис. 4. Результаты ПЦР клональных линий с нокаутами FUT8. М - маркер, Pc/Nc – положительный (поликлональная популяция после селекции) и отрицательный (исходные клетки) контроли, цифрами обозначены номера клонов, слева указаны длины фрагментов (пар оснований), красным выделен номер линии, использованной далее для получения белка.

Удельная продуктивность клетки может быть ограничена на уровне транскрипции, трансляции, пост-трансляционного процессинга белка, его секреции и стабильности в культуральной среде. Возможной стратегией для дальнейшей модификации линий может являться инженерия секреторного пути, включая экспрессию дополнительных белков, позволяющих целевым белкам быстрее проходить этапы секреторного пути, например, компонентов комплекса сигнал-узнающей частицы SRP14–SRP9, обеспечивающей котрансляционную транслокацию белков в ЭПР, а также подбор наиболее оптимальных сигнальных пептидов [3]. Линии-продуценты сложного для экспрессии (DTE) и нормально экспрессирующегося (ETE) антитела трансфецировали генетической конструкцией для коэкспрессии SRP9 и SRP14 в виде слитного белка с гибким линкером под контролем конститутивного промотора.

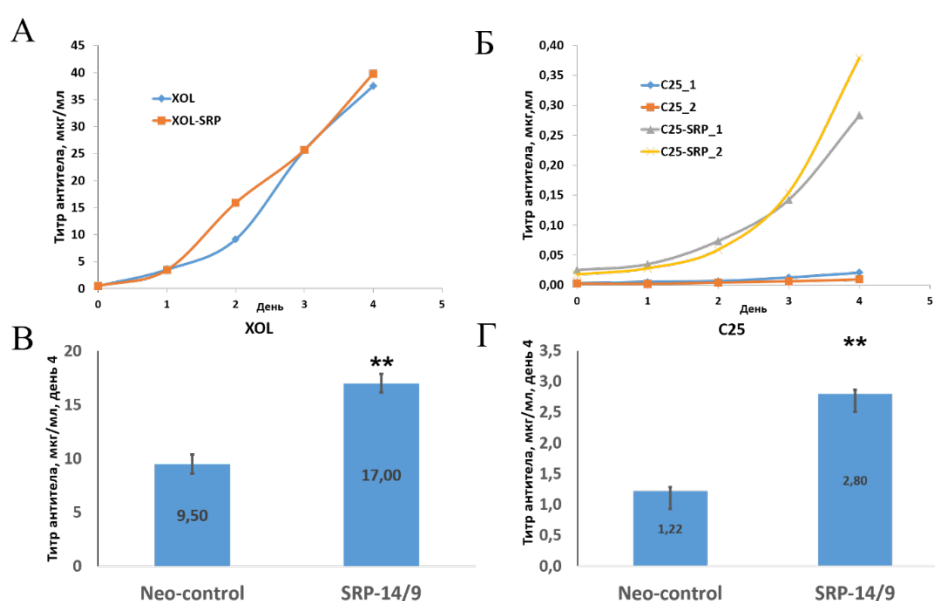


Рис. 5. Концентрация легких (клеточная линия XOL) и тяжелых для экспрессии антител (C25) в культуральной среде для стабильно трансфицированных популяций. В)-Г): Соотношение продуктивности клеток, трансфецированных плазмидой, кодирующей комплекс SRP14/9 и контрольной плазмидой, несущей ген устойчивости к неомицину.

Для транзистентных культур для обеих линий было получено статистически значимое увеличение секреции. Для стабильно трансфецированных популяций в случае ETE overэкспрессия SRP не оказывала значимого влияния на титр, а в случае DTE приводила к увеличению выходу антитела на порядок.

Аденогипофизарные гормоны - тиреотропный гормон (ТТГ), фолликулостимулирующий гормон (ФСГ) и лютеинизирующий гормон (ЛГ), а также плацентарный гормон хорионический гонадотропин (ХГ) состоят из двух гликозилированных субъединиц – α (общей для всего семейства) и β (специфической). При получении в клетках-продуцентах общая α -цепь гормонов синтезируется клетками в избытке относительно различных β -цепей и, в некоторых случаях, служит шапероном для фолдинга β -цепей. Для каждого гормона создано по 4 генетических конструкции, отличающихся только сигнальным пептидом бета-цепи (СП человеческого сывороточного альбумина, азуроцидина, общей для семейства α -цепи и контрольный нативный СП индивидуальной для каждого гормона β -цепи). Исследуемыми плазмидами трансфицировали клетки СНО, получали стабильные линии, проводили 1 раунд геномной амплификации под действием 2 мкМ метотрексата, после чего определяли содержание гетеродимера и свободных цепей в культуральной среде при помощи ИФА и вестерн-блоттинга.

Концентрация гетеродимера в культуральной среде, пг/клетка

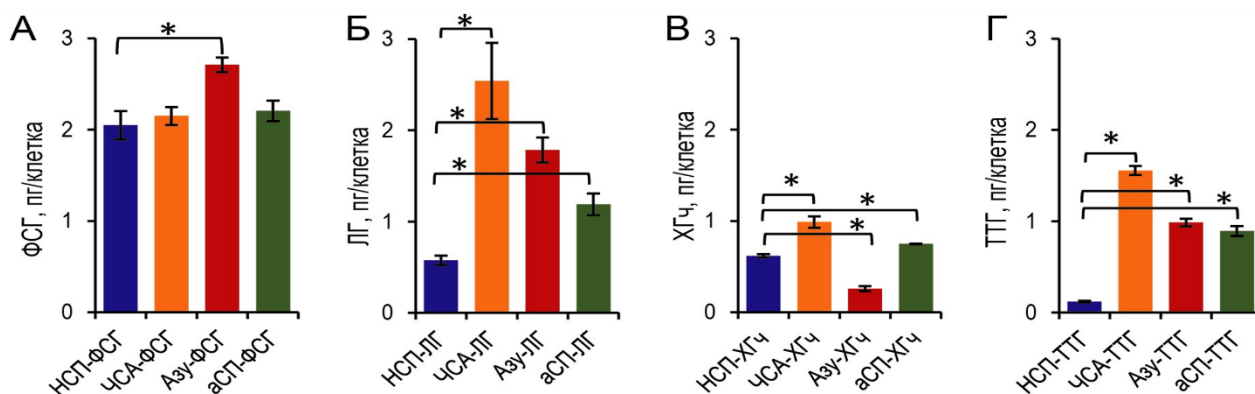


Рис. 6. Концентрация (удельная продуктивность, пг/клетка) для секретируемых в среду гетеродимеров гормонов, данные для дня 4. Представлен средний результат двух независимых биологических повторов, две повторности в ИФА для каждого образца, * – $p < 0,05$, критерий Стьюдента. Сокращения: ФСГ – фолликулостимулирующий гормон; ЛГ – лютеинизирующий гормон; ХГч – хорионический гонадотропин человека; ТТГ – тиреотропный гормон; НСП – нативный сигнальный пептид β -цепи соответствующего гормона; ЧСА – человеческий сывороточный альбумин; Азу – азуроцидин; аСП – сигнальный пептид α -цепи гликопротеиновых гормонов.

Для четырех гликопротеиновых гормонов, продуцируемых стабильно трансфицированными пулами клеток СНО, замена нативного СП β -цепи на гетерологичный привела к увеличению продуктивности клеток по гетеродимерному гормону (для ХГ, ЛГ и

ТТГ – 1,5, 4 и 13 раз, соответственно, при использовании СП ЧСА, для ФСТ – на 60% при использовании СП Азу).

Основные выводы. На основе клеток CHO-4BGD получена клеточная линия с нокаутом гена FUT8, способная продуцировать афукозилированные антитела. Модификация секреторного пути в апоптоз-резистентных клетках CHO, включающая как подбор оптимальных сигнальных пептидов, так и оверэкспрессию ключевых компонентов SRP, позволяет увеличить титр сложноэкспрессируемых белков.

Литература

1. Orlova N.A. et al. Targeted Knockout of the dhfr, glul, bak1, and bax Genes by the Multiplex Genome Editing in CHO Cells // Dokl. Biochem. Biophys. 2022. Vol. 502, № 1. P. 40–44.
2. Satoh M., Iida S., Shitara K. Non-fucosylated therapeutic antibodies as next-generation therapeutic antibodies // Expert Opin. Biol. Ther. 2006. Vol. 6, № 11. P. 1161–1173.
3. Le Fourn V. et al. CHO cell engineering to prevent polypeptide aggregation and improve therapeutic protein secretion // Metab. Eng. 2014. Vol. 21. P. 91–102.

Список публикаций по теме работы

Статьи

1. Sinegubova, M. V., Kolesov, D. E., Vorobiev, I. I., & Orlova, N. A. (2025). Increased glycoprotein hormone yield in stably transfected CHO cells using human serum albumin signal peptide for beta-chains. PeerJ, 13, e18908. <https://doi.org/10.7717/peerj.18908>

Тезисы докладов

1. Колесов Д.Э., Синегубова М.В., Воробьев И.И., Орлова Н.А. Характеризация клеточной линии CHO 4BGD с гомозиготными нокаутами генов BAK1, BAX, DHFR, GLUL при помощи полногеномного секвенирования, Сборник тезисов Всероссийской научной конференции с международным участием, «Генетика и индивидуальное развитие» 29–31 октября 2024 г. Москва, ИБР РАН (устный доклад)
2. Orlova, N.A.; Sinegubova, M.V.; Kolesov, D.E.; Khodak, Y.A.; Tatarskiy, V.V.; Vorobiev, I.I. Genomic and Phenotypic Characterization of CHO 4BGD Cells with Quad Knockout and Overexpression of Two Housekeeping Genes That Allow for Metabolic Selection and Extended Fed-Batch Culturing. Cells 2025, 14, 692.

Denis Eduardovich Kolesov

RESEARCH CENTER OF BIOTECHNOLOGY RAS

INVESTIGATION OF METABOLIC PROPERTIES OF APOPTOSIS-RESISTANT CHO CELLS USED FOR GENERATING THERAPEUTIC PROTEIN PRODUCER LINES

Abstract. *An analysis of whole-genome sequencing data was performed for CHO 4BGD cells with homozygous knockouts in the genes BAK1, BAX, DHFR, and GLUL to describe editing events. Based on this cell line, cells with homozygous knockouts of the FUT8 gene have been*

obtained through a two-step selection process for the production of afucosylated antibodies. The percentage of clones with the FUT8(-/-) genotype before and after lentil lectin selection has been calculated. The impact of replacing signal peptides and introducing additional copies of the signal recognition particle (SRP) complex on the yield of target proteins in producer cells based on CHO 4BGD has been investigated.

Keywords: *CHO cells, genome editing, afucosylated antibodies, metabolic engineering, signal peptides.*

Работа выполнена при поддержке РФФИ (грант № 25-24-00140)

Косякова Анастасия Игоревна

аспирант ФИЦ Биотехнологии РАН 1 года обучения

научная специальность 1.5.11 Микробиология

e-mail: AnastasiaaKosyakova@yandex.ru

Научный руководитель

Самылина Ольга Сергеевна

кандидат биологических наук,

с.н.с. лаборатории реликтовых микробных сообществ



ЭКОФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ ФИКСАЦИИ АЗОТА ГАЛОАЛКАЛОФИЛЬНЫМИ ЦИАНОБАКТЕРИЯМИ

Аннотация. Содовые озера – полиэкстремальные местообитания, основными diaзотрофами в которых считаются цианобактерии, хотя закономерности и экофизиологические особенности этого процесса изучены недостаточно. В данной работе проанализирована diaзотрофная активность 14 культур цианобактерий, выделенных из содовых озёр и встречающихся в широком диапазоне общей солёности (20-400 г/л). Исследования проводили в различных режимах освещения, а также с добавлением ингибитора окислительного фотосинтеза диурона. В результате были выявлены различия в закономерностях фиксации азота между гетероцистными, нитчатыми негетероцистными и одноклеточными штаммами цианобактерий, которые в природных условиях могут являться ключевыми азотфиксаторами в различных диапазонах солёности.

Ключевые слова: цианобактерии, содовые озера, азотфиксация, натронофильные цианобактерии, экстремофилы.

Светозависимая (а значит, связанная с фототрофами) фиксация азота в аэробной зоне содовых озёр детектирована в широком диапазоне общей солёности (до 400 г/л), хотя в гиперсолёных (>100 г/л) условиях наблюдается снижение интенсивности [2]. Ранее было показано, что цианобактерии могут играть ключевую роль в фиксации атмосферного азота в содовых озёрах, но неизвестно, как именно влияют различные физико-химические факторы на их diaзотрофную активность [1, 2].

Ключевыми diaзотрофными цианобактериями традиционно считаются гетероцистные, однако в содовых озёрах их развитие происходит, как правило, при низкой общей минерализации (до 60 г/л). При более высокой солёности в составе потенциально diaзотрофных фототрофных сообществ содовых озёр доминируют нитчатые негетероцистные цианобактерии (до 200 г/л), а при максимальном засолении (350-400 г/л) встречаются только одноклеточные [2]. Несмотря на понимание значимости цианобактерий для фиксации азота природными фототрофными сообществами, физиологические особенности этого процесса у цианобактерий из содовых озёр остаются неизученными.

Целью данной работы стало выявление diaзотрофной активности среди натронофильных и галоалкалофильных цианобактерий, доминирующих в микробных сообществах озёр при различной общей солёности.

В работе использовали штаммы гетероцистных (*Anabaenopsis*, *Trichormus*, *Nodularia*), нитчатых негетероцистных (*Sodalinema*) и одноклеточных (*Eubacterium*)

цианобактерий из коллекции лаборатории реликтовых микробных сообществ института микробиологии им. С.Н. Виноградского ФИЦ Биотехнологии РАН.

Оценку диазотрофной активности проводили методом ацетиленредукции (АР) в различных режимах освещения: «день/ночь» (16/8 часов), непрерывное освещение (3.5 кЛюкс), непрерывная темнота. Дополнительно оценивали влияние ингибитора окисленного фотосинтеза диурона (DCMU, 3-(3,4-дихлорфенил)-1,1-диметилмочевины). Использовали стандартные безазотистые среды, моделирующие содовые условия, М (1М $\text{Na}_2\text{CO}_3 + \text{NaHCO}_3$), S (0.2М $\text{NaHCO}_3 + 0.5\text{М NaCl}$) и Z₁₀ (0.2М $\text{NaHCO}_3 + 0.2\text{М NaCl}$). Измерения проводили ежедневно в течение 4-7 дней. Скорость АР рассчитывали на 2-4 сутки в зависимости от особенностей динамики процесса.

Суммарно было проанализировано 14 штаммов цианобактерий трёх морфологических групп: гетероцистные *Anabaenopsis* sp. G1-1601, G3-2401, *Trichormus* sp. T1-1501, *Nodularia* sp. B-1529; негетероцистные *Sodalinema* P-1104, Ey-1201, Ar-1901, Mc-2101, M-2102, B-353; одноклеточные *Euhalothece* Z-M001, Z-9404, T2-1114, T3-1123. Все штаммы были выделены из содовых и соленых щелочных озёр, кроме штаммов *Sodalinema* Ar-1901, Mc-2101, M-2102, выделенных из хлоридно-натриевых озёр.

Нитчатые негетероцистные цианобактерии рода *Sodalinema* осуществляли АР только в режиме переменного освещения («день/ночь»), причем добавление DCMU практически полностью ингибировало АР (Рис. 1 А). Из шести исследованных штаммов пять имели одинаковые закономерности АР, однако штамм B-353 не проявил способности к азотфиксации ни в каких из протестированных условий инкубирования.

Гетероцистные цианобактерии родов *Anabaenopsis* (штаммы G1-1601 и G3-2401), *Trichormus* (T1-1501), *Nodularia* (B-1529) осуществляли АР как при непрерывном освещении, так и в режиме «день/ночь». Добавление диурона ингибировало выделение этилена (Рис. 1. Б).

Одноклеточные цианобактерии рода *Euhalothece* показали невысокую скорость АР как в режиме «день/ночь», так и при непрерывном освещении без добавления DCMU. Добавление диурона многократно стимулировало выделение этилена в первые двое суток (Рис. 1. В), однако впоследствии процесс замедлился.

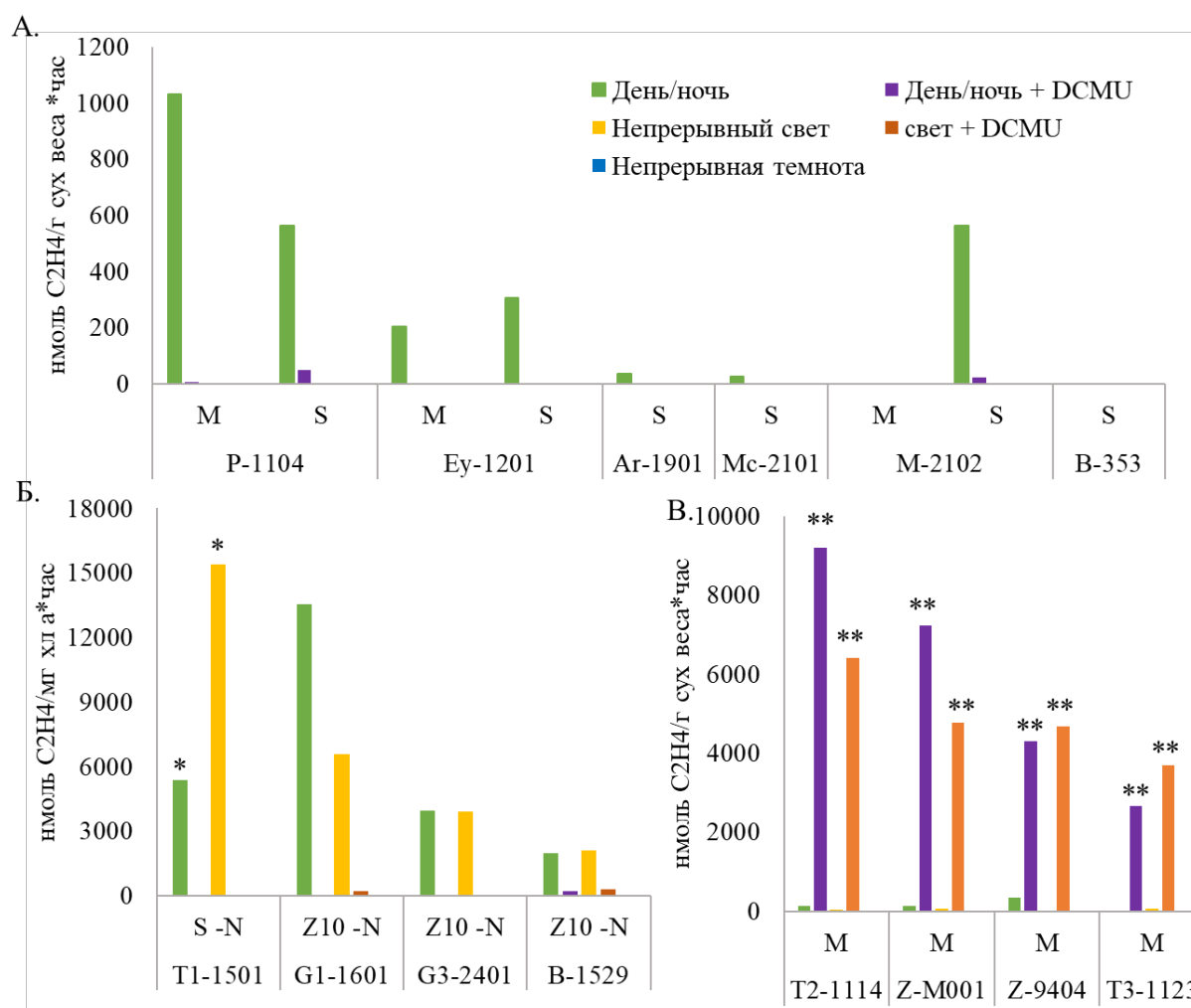


Рис. 1. Скорость АР в различных условиях освещения с/без добавления DCMU: (А) штаммами *Sodalinema* на средах S и M; (Б) штаммами *Anabaenopsis* (штаммы G1-1601 и G3-2401), *Trichormus* (T1-1501), *Nodularia* (B-1529); (В) штаммами *Euhalothese*. Расчет скоростей проводился на 3 сутки измерений, * на 4 сутки измерений, ** на 2 сутки измерений.

Результаты данной работы являются первым шагом к пониманию закономерностей фиксации азота микробными сообществами содовых озёр. Полученные данные указывают на то, что типичные для гиперминерализованных содовых озёр цианобактерии родов *Sodalinema* и *Euhalothese* могут являться ключевыми азотфиксаторами при высоких солёностях, функционально сменяя менее экстремотолерантные гетероцистные рода *Anabaenopsis*, *Trichormus* и *Nodularia*. При этом штаммы гетероцистных, нитчатых негетероцистных и одноклеточных цианобактерий демонстрируют разные закономерности этого процесса.

Основные выводы

1. Исследовано 14 штаммов гетероцистных, нитчатых негетероцистных и одноклеточных натронофильных и галоалкалофильных цианобактерий. Диазотрофная активность выявлена у 13 штаммов.
2. У всех одноклеточных цианобактерий рода *Euhalothese* максимальная скорость АР зафиксирована в течение первых двух суток при ингибировании кислородного

фотосинтеза DCMU в режимах «день/ночь» и при непрерывном освещении. Скорость АР без добавления DCMU была значительно ниже.

3. Негетероцистные цианобактерии рода *Sodalinema* продемонстрировали АР активность только в режиме «день/ночь», причём DCMU ингибировал этот процесс. Диязотрофная активность не выявлена только у штамма *Sodalinema gerasimenkoae* B-353.

4. Гетероцистные цианобактерии родов *Anabaenopsis*, *Trichormus* и *Nodularia* показали максимальную активность АР в режимах «день/ночь» и непрерывного освещения. Добавление DCMU ингибировало АР.

Литература

1. Herbst D. B. Potential salinity limitations on nitrogen fixation in sediments from Mono Lake, California //International Journal of Salt Lake Research. – 1998. – Т. 7. – №. 3. – С. 261-274.
2. Samylina O.S., Namsaraev Z.B., Grouzdev D.S., Slobodova N.V., Zelenev V.V., Borisenko G.V., Sorokin D.Y. The patterns of nitrogen fixation in haloalkaliphilic phototrophic communities of Kulunda Steppe soda lakes (Altai, Russia) //FEMS Microbiology Ecology. – 2019. – Т. 95. – № 11. – С. fiz174.

Список публикаций по теме работы

Тезисы докладов

1. А.И. Косякова, О.С. Самылина Влияние сульфида на фиксацию азота негетероцистной галоалкалофильной цианобактерией *Sodalinema* sp. P-1104 // Водоросли: проблемы таксономии и экологии, использование в мониторинге и биотехнологии: материалы VII Всероссийской научной конференции с международным участием (Владивосток, 16-20 сентября 2024 г.). – Владивосток, 2024. – С. 58. (устный доклад)
2. Kosyakova, A. Effect of Sulfide on Photosynthesis and Nitrogen Fixation in Non-heterocystous Cyanobacterium from a Soda Lake / A. Kosyakova, O. Samylina // 15th International Conference on Salt Lake Research (ICSLR'24): Abstracts. – Antalya, 2024. – С. 77. (постерный доклад)

Kosyakova Anastasia Igorevna

RESEARCH CENTER OF BIOTECHNOLOGY RAS

ECOPHYSIOLOGICAL FEATURES OF NITROGEN FIXATION BY HALOALKALOPHILIC CYANOBACTERIA

Abstract. Soda lakes are polyextreme habitats in which cyanobacteria are considered to be the main diazotrophs, although the patterns and ecophysiological features of this process have not been sufficiently studied. In this work, the diazotrophic activity of 14 cyanobacteria cultures isolated from soda lakes and found in a wide range of total salinity (20-400 g/l) was analyzed. The studies were carried out in various lighting modes, as well as with the addition of diuron, an inhibitor of oxygenic photosynthesis. As a result, differences in nitrogen fixation patterns were

revealed between heterocystous, filamentous non-heterocystous, and unicellular cyanobacteria strains, which in natural conditions can be key nitrogen fixators in various salinity ranges.

Keywords: *cyanobacteria, soda lakes, nitrogen fixation, natronophilic cyanobacteria, extremophiles.*

Работа выполнена при поддержке проекта РФФ (грант №22-14-00038)

Макарова Анна Олеговна

аспирант ФИЦ Биотехнологии РАН 1 года обучения

научная специальность 1.5.6 Биотехнология

e-mail: anna.makarova0@yandex.ru

Научный руководитель

Федоров Алексей Николаевич

доктор биологических наук,

з.н.с. лаборатории молекулярной биотехнологии



ИЗУЧЕНИЕ БИОСИНТЕТИЧЕСКОГО СВОРАЧИВАНИЯ БЕЛКОВ IN VIVO

Аннотация. *Сворачиванием белка называют процесс приобретения полипептидной цепью уникальной конформации, необходимой для выполнения биологической функции. Для понимания принципов сворачивания белков проводят анализ процесса ренатурации денатурированных полипептидов, однако при таком подходе не учитывается возможность котрансляционного сворачивания во время синтеза полипептида на рибосоме. Данная работа посвящена изучению возможных взаимодействий между образующимися субъединицами гомоолигомера, транслируемыми одновременно соседними рибосомами.*

*На первом этапе были разработаны критерии отбора белков для такой работы, и после осуществления анализа протеома *E. coli* была определена группа белков, отвечающих поставленным критериям, из которых для начала работ выбрали гомодимер пируватформатлиазу (PflB).*

Ключевые слова: *фолдинг белков, котрансляционное сворачивание гомоолигомеров.*

Механизм фолдинга остается до сих пор неизвестным, несмотря на публикацию большого числа работ и разработанные экспериментальные подходы, включающие рефолдинг денатурированных полипептидов. Одно из основных различий между биосинтетическим сворачиванием белка и его ренатурацией является котрансляционное сворачивание - сворачивание, которое происходит во время синтеза полипептидной цепи на рибосоме. Данную концепцию подтверждает выявление активности β -галактозидазы в полисомной фракции лизата *E. coli*, что предполагает котрансляционный фолдинг гомотетрамерной β -галактозидазы [1].

Существует несколько вариантов осуществления котрансляционного сворачивания белков. Ко-пост сворачивание осуществляется при взаимодействии диффундирующей субъединицы белка с образующейся субъединицей-партнером. Примером может служить сборка гетеродимерной люциферазы *Vibrio harveyi* LuxA-LuxB в клетках *E. coli* [2]. Альтернативным вариантом является сборка белковых комплексов посредством объединения двух образующихся субъединиц, транслируемых одновременно двумя рибосомами (ко-ко сборка) [3].

На основании анализа совокупности опубликованных данных нами была выдвинута идея проверки возможности реализации котрансляционной сборки белковых комплексов (ко-ко сборки). Ко-ко сборка в основном используется для образования гомоолигомерных

комплексов как для прокариот, так и для эукариот [3]. В связи с этим, один из главных критериев для выбора модельного белка для изучения механизма ко-ко сборки был выбран критерий гомоолигомерности белков. Однако необходимо, чтобы гомолигомер не включался в функциональный комплекс более высокого порядка, что осложнило бы работу по выделению этого белка.

Предположительно, механизм реализации ко-ко сборки подразумевает раннее взаимодействие между субъединицами белка при их одновременной трансляции на рибосомах. При этом высвободившийся из рибосомы N-концевой фрагмент белка длиной около 200-400 аминокислотными остатками участвует в формировании связей между субъединицами белка [3]. В связи с этим, на модельный белок были также наложены следующие ограничения: необходимо, чтобы энергия взаимодействия между цепями, входящими в состав белковых субъединиц, была сосредоточена у N-концов в промежутке между 300 и 600 аминокислотными остатками. Важным критерием является свободная локализация N- и C-концов субъединицы белка для упрощения возможного осуществления генно-инженерной модификации модельного белка, в том числе получение белка с введенными дополнительными аминокислотными остатками (довесок) на N- или C-конце. В случае, если N- или C-конец включены в активный центр белка, такая модификация затрудняла бы формирование функционального гомоолигомерного комплекса.

Для удобства проведения экспериментальных работ было принято решение рассматривать в качестве белков-кандидатов белки, имеющие высокую молекулярную массу (более 80 кДа), именно этот критерий был выбран для первичного отбора вариантов подходящих белков, которые далее проверялись на соответствие другим критериям.

В качестве модельного организма была выбрана бактерия *E. coli*, поскольку об этом организме существует большое количество опубликованных данных, в том числе данные протеомного анализа. Нами были проанализированы и выбраны статьи, содержащие наиболее полную информацию о протеоме *E. coli* [4,5]. Данные протеома в выбранных работах были различны в связи с проведением протеомного анализа в разных метаболических условиях. Выбранные работы содержали подтвержденную информацию примерно о 5 тысячах различных белков *E. coli*, включающую названия белков и соответствующих генов, молекулярный вес белков.

Прежде всего мы отсортировали все белки по молекулярному весу и выбрали белки, которые имели молекулярную массу более 80 кДа. Далее мы проверили соответствие белков критерию гомоолигомерности.

Дальнейший отбор был связан с проверкой структурных моделей белков. Для получения максимально точной и достоверной информации о структуре белка анализировались 3D-модели белков, полученные исключительно методом рентгеноструктурного анализа.

Кроме того, поскольку наша цель заключается в изучении природных механизмов сборки белков, для работы выбирались только нативные белки, не содержащие мутации. Последним важным критерием для отбора белков было наличие полной структурной модели всего белкового комплекса.

Анализ распределения энергии связей в белке осуществлялся с применением программы PDBePISA, позволяющей получать свободную энергию растворения каждого остатка.

В результате были отобраны подходящие по всем критериям белки:

- Неохарактеризованный белок MscS семейства YjeP
- Периплазматическая нитратредуктаза NapA
- Мальтодекстринфосфатаза malP
- Пируватформиацетилаза 1 PflB

Для дальнейшей работы был выбран белок пируватформиацетилаза PflB, катализирующий превращение пирувата и кофермента А (CoA) в ацетил-CoA и формиат, соответствующий всем критериям отбора и являющийся димером.

Для удобства наработки данного белка был заказан химический синтез гена *pflB*, оптимизированного для экспрессии в клетках *E. coli*. Для повышения уровня экспрессии *pflB* ген был клонирован в вектора pACYC-Duet, pRSF-Duet и pET-15b под контроль индуцибельного T7lac-промотора. Полученные рекомбинантные плазмиды pACYC-pflB, pRSF-pflB и pET15-pflB характеризуются разным количеством копий плазмиды на клетку, соответственно, разным уровнем экспрессии гена *pflB*. Для простоты дальнейшего выделения и очистки рекомбинантные плазмиды pACYC-pflB, pRSF-pflB и pET15-pflB содержат на N-конце белка PflB His₆-метку.

Индукцию и экспрессию OPC *pflB* проводили в штамме *E. coli* BL21 (DE3). Целевой белок PflB нарабатывается преимущественно в растворимой форме.

Основные выводы

1. Определены критерии, необходимые для отбора гомоолигомеров, предположительно осуществляющие котрансляционную сборку.
2. Проведен анализ протеома *E. coli* на предмет соответствия выбранным критериям.
3. Выбраны четыре белка-кандидата, предположительно осуществляющие котрансляционную сборку. В качестве первого кандидата выбран гомодимер пируватформиацетилаза PflB.
4. Получены конструкции pACYC-pflB, pRSF-pflB и pET15-pflB для экспрессии гена *pflB*, характеризующиеся разным количеством копий плазмиды на клетку.
5. Продемонстрирована продукция целевого белка PflB преимущественно в растворимой форме.

Литература

1. Zipser D. Studies on the ribosome-bound β -galactosidase of Escherichia coli // J Mol Biol. 1963. Vol. 7, № 6. P. 739–751.
2. Shieh Y.W. et al. Operon structure and cotranslational subunit association direct protein assembly in bacteria // American Association for the Advancement of Science, 2015. Vol. 350, № 6261. P. 678–680.
3. Bertolini M. et al. Interactions between nascent proteins translated by adjacent ribosomes drive homomer assembly // American Association for the Advancement of Science, 2021. Vol. 371, № 6524.
4. Schmidt A. et al. The quantitative and condition-dependent Escherichia coli proteome // Nat Biotechnol. Nature Publishing Group, 2016. Vol. 34, № 1. P. 104–110.
5. Wiśniewski J.R., Rakus D. Quantitative analysis of the Escherichia coli proteome // Data Brief. Elsevier Inc., 2014. Vol. 1. P. 7–11.

Makarova Anna Olegovna
RESEARCH CENTER OF BIOTECHNOLOGY RAS

STUDY OF BIOSYNTHETIC PROTEIN FOLDING *IN VIVO*

Abstract. *Protein folding is the process of acquisition by a polypeptide chain of a unique conformation necessary for performing a biological function. To understand the principles of protein folding, the process of renaturation of denatured polypeptides is analyzed, however, this approach does not take into account the possibility of cotranslational folding during the synthesis of a polypeptide on a ribosome. This work is devoted to the study of possible interactions between the formed homooligomer subunits translated simultaneously by neighboring ribosomes.*

At the first stage, criteria for selecting proteins for such work were developed, and after analyzing the E. coli proteome, a group of proteins meeting the criteria was identified, from which the pyruvate formate lyase homodimer (PflB) was selected to begin work.

Keywords: *protein folding, cotranslational folding of homooligomers.*

Маркелова Екатерина Евгеньевна

аспирант ФИЦ Биотехнологии РАН 1 года обучения
научная специальность 1.5.8 Математическая биология,
биоинформатика
e-mail: markelova.ke@gmail.com

Научный руководитель

Медведева Юлия Анатольевна

кандидат биологических наук

руководитель группы регуляторной транскриптомики и эпигеномики



МУЛЬТИОМИКСНЫЙ АНАЛИЗ ПОПУЛЯЦИОННОЙ СПЕЦИФИЧНОСТИ ФАКТОРОВ И МЕХАНИЗМОВ ДИАБЕТА 2 ТИПА В РОССИИ

Аннотация. Сахарный диабет 2 типа (СД2) – это полигенное заболевание, характеризующееся высокой гетерогенностью механизмов развития. Генетическая предрасположенность, особенности иммунных и метаболических процессов в разных популяциях могут определять доминирующие механизмы патогенеза заболевания. Настоящее исследование направлено на изучение особенностей СД2, ассоциированных с принадлежностью к одной из популяций – татар, чеченцев или якутов – на уровне мультиомиксных данных. На данном этапе был проведён анализ генотипирований участников исследования, была начата обработка данных секвенирования единичных клеток (scRNA-seq) и данных по открытым участкам хроматина (scATAC-seq). Были охарактеризованы генетические и клинические особенности СД2 в исследуемых популяциях.

Ключевые слова: диабет 2 типа, генотипирование, генетическое происхождение, популяции России, татары, чеченцы, якуты.

Сахарный диабет 2 типа (СД2) представляет собой хроническое метаболическое заболевание, характеризующееся нарушением регуляции уровня глюкозы в крови, инсулинорезистентностью и/или недостаточной секрецией инсулина[1]. Заболевание развивается на фоне сложного взаимодействия генетических, эпигенетических, иммунологических и экологических факторов и демонстрирует значительную межиндивидуальную и межпопуляционную вариабельность в проявлениях и механизмах патогенеза.

Многочисленные исследования последних лет показали, что традиционная модель "универсального" механизма развития СД2 уступает место более гибкому пониманию гетерогенности заболевания, где у разных групп пациентов преобладают различные молекулярные и клеточные механизмы[2]. Такой подход лёг в основу концепции классификации СД2, предполагающей существование различных "эндотипов" заболевания, для каждого из которых может потребоваться разный терапевтический подход.

При этом подавляющее большинство данных, формирующих современное понимание молекулярных основ СД2, получено на выборках из европейских, американских или восточноазиатских популяций[3]. Популяции России, обладающие уникальной историей формирования и генетической структурой, остаются существенно малоисследованными в контексте СД2.

В условиях быстро развивающихся технологий генотипирования, секвенирования единичных клеток и анализа эпигенома становится возможным комплексное мультиомиксное исследование патогенеза СД2 в различных популяциях. Такое исследование может выявить популяционно-специфические механизмы заболевания и, потенциально, способствовать разработке персонифицированных стратегий профилактики и терапии СД2.

В данном исследовании осуществляется мультиомиксный анализ СД2 представителей трёх этнических групп, проживающих на территории Российской Федерации — татар, чеченцев и якутов. Каждая из этих групп обладает уникальной популяционной историей, что предполагает возможное наличие различий в генетических и эпигенетических факторах, лежащих в основе предрасположенности к заболеванию. На первом этапе исследования было выполнено генотипирование участников с использованием чипов Illumina GSA. Был проведён анализ генетической принадлежности (с использованием публично доступных размеченных данных), в результате которого были определены три целевые популяции - татары, чеченцы и якуты. В результате регрессионного анализа были установлены клинические отличия проявлений СД2 в популяциях: так, у якутов при СД2 происходило наибольшее увеличение содержания холестерина и липопротеинов низкой плотности в крови, а у чеченцев, больных СД2, наблюдалось самое выраженное понижение содержания липопротеинов высокой плотности в крови.

При помощи анализа ассоциаций были установлены наборы однонуклеотидных полиморфизмов (ОНП) со значимо отличающейся частотой в определённых популяциях. Аннотация этих вариантов по базам данных (ClinVar, GTEx eQRTLs, GeneOnthology и т.д.), позволила выявить варианты, связанные с факторами и механизмами СД2. Например, были установлены конкретные ОНП в генах ACSM5 и ABCC1 (rs61078310 и rs17822931), с большой вероятностью связанные с метаболизмом и транспортом липидов, которые высоко распространены в популяции якутов и мало представлены в популяциях татар и чеченцев.

Также, генетические данные были проанализированы с применением “разделённых” шкал генетического риска (рШГР), характеризующих склонность пациента к определённым механизмам развития/протекания СД2. рШГР были посчитаны по методу, описанному Smith et al.[4]. Были обнаружены значительные различия в распределениях значений рШГР между популяциями. Так, у якутов отмечены повышенные значения рШГР, связанных с нарушением метаболизма липидов ($P \leq 0.01$) и гомеостаза глюкозы в бета-клетках поджелудочной железы ($P \leq 0.001$), гиперинсулинемией ($P \leq 0.01$). У чеченцев — более высокие показатели рШГР, связанных с неправильным распределением жировой ткани, липодистрофией ($P \leq 0.05$). Популяция татар отличается повышенными значениями рШГР, ассоциированного с нарушением синтеза инсулина в бета-клетках, что проявляется пониженным уровнем проинсулина ($P \leq 0.05$). Значения рШГР генетического механизма СД2, характеризуемого ожирением, понижены у якутов ($p \leq 0.001$) и не показывают значимого различия между татарами и чеченцами. Тенденции различий в уровнях рШГР наблюдаются не только среди пациентов с СД2, но и среди здоровых лиц. Использование рШГР может позволить глубже понять патогенетические механизмы заболевания и может способствовать развитию персонализированного подхода к диагностике и лечению.

На данном этапе работы был проведён анализ генотипов участников исследования, была начата обработка данных секвенирования единичных клеток (scRNA-seq) и данных по

выявленным открытым участкам хроматина в единичных клетках (scATAC-seq). Комплексная интеграция мультиомиксных данных позволит более детально охарактеризовать особенности СД2, свойственные разным популяциям России.

Основные выводы

Генотипирование и секвенирование единичных клеток было проведено успешно, результаты обработаны, соотнесены с метаданными, полученными из анкетирования участников. Были выявлены значимые межпопуляционные различия в клинических проявлениях СД2, в частотах определённых вариантов, в уровне разделённых шкал генетического риска (рШГР). Результаты работы подтверждают наличие популяционно-специфичных механизмов развития СД2. Генетически обусловленные различия подчеркивают важность учета популяционной принадлежности при оценке рисков и разработке стратегий лечения СД2.

Литература

1. Kahn S.E., Cooper M.E., Del Prato S. Pathophysiology and treatment of type 2 diabetes: perspectives on the past, present, and future // The Lancet. 2014. Vol. 383, № 9922. P. 1068–1083.
2. Wesolowska-Andersen A. et al. Four groups of type 2 diabetes contribute to the etiological and clinical heterogeneity in newly diagnosed individuals: An IMI DIRECT study // Cell Rep. Med. 2022. Vol. 3, № 1. P. 100477.
3. Sirugo G., Williams S.M., Tishkoff S.A. The Missing Diversity in Human Genetic Studies // Cell. Elsevier, 2019. Vol. 177, № 1. P. 26–31.
4. Smith K. et al. Multi-ancestry polygenic mechanisms of type 2 diabetes // Nat. Med. Nature Publishing Group, 2024. P. 1–10.

Список публикаций по теме работы

Тезисы докладов

1. Single-cell analysis of PBMC characterizes the response of idiopathic recurrent pericarditis patients to goflkicept, Международная школа-конференция «Анализ отдельных клеток» ASCA Moscow 2024, Москва, 18-22 ноября 2024г. (устный доклад)

Markelova Ekaterina Evgenievna

RESEARCH CENTER OF BIOTECHNOLOGY RAS

MULTIOMICS ANALYSIS OF POPULATION-SPECIFIC FACTORS AND MECHANISMS OF TYPE 2 DIABETES IN RUSSIA

Abstract. *Type 2 diabetes mellitus (T2D) is a polygenic disease characterized by a high degree of heterogeneity in its pathogenic mechanisms. Genetic predisposition, as well as specific immune and metabolic processes in different populations, may determine the dominant mechanisms underlying disease development. The present study aims to investigate the features of T2D at the level of multiomics data associated with genetic background — specifically among Tatars, Chechens, and Yakuts. At this stage, genotyping data from study participants have been analyzed, and preprocessing of single-cell RNA sequencing (scRNA-seq) and single-cell*

chromatin accessibility (scATAC-seq) data has been initiated. Genetic and clinical features of T2D were characterized in the studied populations.

Keywords: *type 2 diabetes, genotyping, genetic ancestry, populations of Russia, Tatars, Chechens, Yakuts.*

Пихтерева Валерия Александровна

аспирант ФИЦ Биотехнологии РАН 1 года обучения

научная специальность 1.5.11 Микробиология

e-mail pikhtereva.valeria@gmail.com

Научный руководитель

Заварзина Дарья Георгиевна

доктор биологических наук,

с.н.с. лаборатории метаболизма экстремофильных прокариот



ОСОБЕННОСТИ ДЫХАТЕЛЬНОГО МЕТАБОЛИЗМА АНАЭРОБНЫХ ПРОКАРИОТ, ТРАНСФОРМИРУЮЩИХ МИНЕРАЛЫ ЖЕЛЕЗА

Аннотация. *Прокариоты, участвующие в трансформации железосодержащих минералов, интересны не только для фундаментальной науки, но и для биотехнологии. Данные микроорганизмы являются перспективными продуцентами наноразмерных магнитных частиц, используемых в биомедицине, электронике и других важных отраслях. За отчетный период были получены накопительные и чистые культуры новых железоредукторов и проведен анализ генетических детерминант, ответственных за способность к восстановлению нерастворимых форм трехвалентного железа.*

Ключевые слова: *подземная биосфера, биогеохимический цикл железа, железоредукция, термофилы, чистые культуры, водоносные горизонты.*

Железо является четвертым по распространённости элементом на Земле и главным металлом, используемым в хозяйственной деятельности человека. Предполагается, что трансформация железа, осуществляемая микроорганизмами в процессах хемосинтеза, - один из древнейших биологических окислительно-восстановительных процессов, возникших на ранних этапах эволюции биосферы Земли (Заварзин, 2004). Поскольку катаболические реакции с участием железа дают высокий выход энергии (Lovely, 2004), микроорганизмы, трансформирующие минералы железа, широко распространены в природе и встречаются во многих местообитаниях – в осадках пресных и морских вод, “хвостохранилищах”, водно-болотных угодьях, почве и подземной биосфере (Nixon et al., 2022). В результате жизнедеятельности диссимиляционных железоредукторов образуются такие распространенные минералы железа, как магнетит (Fe_3O_4) и сидерит (FeCO_3) (Walker, 1987). При этом смешанновалентный минерал магнетит играет важную роль сопряжения окислительной и восстановительной частей биогеохимического цикла железа. Механизмы и условия восстановления минералов железа в природных и лабораторных условиях определяются физико-химическими параметрами среды и особенностями метаболизма железоредуцирующих прокариот. Понимание этих механизмов является необходимым условием для использования этой важной метаболической группы микроорганизмов в самых разных областях биотехнологии – биоремедиации (адсорбция тяжелых металлов, очистка питьевых вод от повышенного содержания окислов железа), биомедицины (использование наноразмерного магнетита для адресной доставки лекарств), создания топливных элементов с участием электрогенных микроорганизмов.

В ходе работы за первый год аспирантуры были получены накопительные культуры из образцов лечебных грязей озера Тамбукан. В качестве доноров электронов использовали молекулярный водород (10%), ацетат (10 мМ), лактат (10 мМ), глюкозу (1 г/л) и дрожжевой экстракт (1 г/л), пирротин (FeS) или углекислый газ (90%). В качестве акцепторов электронов использовали сульфат или синтезированный ферригидрит ($5\text{Fe}_2\text{O}_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$). Инкубирование проводили в темноте при комнатной температуре. Состояние накопительных культур в ходе инкубации контролировали по изменению количества клеток (прямой счет окрашенных акридин оранжевым препаратов), по изменению состава газовой фазы (хроматографически) и по образованию двухвалентного железа или сульфида (спектрофотометрически). Для изучения филогенетического состава полученных накопительных культур методом высокопроизводительного секвенирования участков гена 16S РНК использовали 2-ой пересев. Выявление филоотипов целевых метаболических групп проводили путем сравнения с составом микробных сообществ природных образцов лечебных грязей. Результаты секвенирования природных образцов показали значительное разнообразие бактерий, участвующих в серном цикле, а также наличие микроорганизмов, способных трансформировать соединения железа. В ходе исследования были получены накопительные культуры, включающие лито- и органотрофных метаногенов, сульфат- и железовосстанавливающих бактерий, а также органотрофов и синтрофов. Доминирующую роль в микробных сообществах природных образцов играли сульфидогены, при этом существенную долю (51% представленности) в них составлял филоотип, близкий к некультивируемому семейству MSBL7 (порядок *Desulfobulbales*). Продолженная работа с накопительными культурами железовосстанавливающих бактерий привела к обогащению микроорганизмами, относящимися к ранее описанному семейству *Anaerosomataceae* (группа OPB41) (Khomyakova et al., 2022).

Также в рамках запланированных исследований из пробы минеральных вод, добытых из скважины 1-бис-э, вскрывающей верхнемеловой водоносный горизонт Ессентукского месторождения минеральных вод, была получена накопительная, а затем и чистая культура, представляющая новый вид в роде *Melioribacter* (штамм Ez-97). Клетки данного изолята были подвижными неспорообразующими палочками с грамотрицательной клеточной стенкой. Штамм являлся факультативным анаэробом, термофилом - рост в диапазоне температур 20–58°C с оптимальным ростом при 55 °C, нейтрофилом - рост в диапазоне pH 5,7–7,85 с оптимальным ростом при pH 6,8–7,1, галотолерантом, растущим в диапазоне концентраций NaCl 0–7% с оптимальным ростом при 0–0,2%. Штамм Ez-97 являлся облигатным хемоорганогетеротрофом, способным к брожению, аэробному и анаэробному дыханию. Как и другие представители семейства *Melioribacteraceae*, исследуемый штамм оказался способным к диссимиляционной железоредукции. Наличие в лабораторной коллекции всех известных на сегодняшний день выделенных в чистые культуры штаммов семейства *Melioribacteraceae* позволило провести скрининг на предмет различий в процессах диссимиляционной железоредукции среди представителей этого семейства. В качестве объектов исследования использовали следующие виды: *Melioribacter roseus* штамм P3M-2, *Stygiobacter electus* штамм 09-Me, *Rosettibacter primus* штамм 4148-Me, *Rosettibacter firmus* 4137-Me штамм и *Pyranulibacter aquaticus* штамм 4301-Me. Штаммы культивировали с ацетатом (10 мМ) (анаэробное дыхание) или целлобиозой (200 мг/л) (облегченное брожение) в качестве доноров электронов и синтезированным

ферригидритом (10 и 100 мМ) в качестве акцептора электронов. В ходе эксперимента проводили контроль образования Fe(II) (спектрофотометрически) и потребления субстратов (хроматографически). По завершении культивирования проводили исследование полученных твердых фаз с помощью Мессбауэровской спектроскопии. Также был проведен анализ геномов на предмет наличия белков, участвующих во внеклеточном переносе электронов. В результате эксперимента было выявлено, что выделенный нами штамм Ez-97, являлся лидером по интенсивности диссимиляционного восстановления Fe(III), что согласовывалось с данными, полученными при анализе геномных последовательностей.

Основные выводы

1. Классическими микробиологическими и молекулярными методами изучен метаболический потенциал и филогенетический состав микробных сообществ из образцов лечебных грязей озера Тамбукан.
2. Из образцов лечебных грязей получены устойчивые накопительные культуры диссимиляционных железоредукторов, в которых существенную долю составляют представители недавно описанного семейства Anaerosomataceae.
3. Получена и описана чистая культура бактерии штамм Ez-97, представляющей новый вид в роде *Melioribacter*.
4. Проведен скрининг коллекции штаммов всех представителей семейства *Melioribacteraceae* на предмет их способности к железоредукции и выявлены геномные детерминанты, обуславливающие различия в протекании процесса диссимиляционной железоредукции.

Литература

1. Заварзин Г.А. Лекции по природоведческой микробиологии. // М.:«Наука», 2004
2. Khomyakova M. A., Zavarzina D. G., Merkel A. Y., Klyukina A. A., Pikhtereva V. A., Gavrilov S. N., Slobodkin A. I. The first cultivated representatives of the actinobacterial lineage OPB41 isolated from subsurface environments constitute a novel order Anaerosomatales //Frontiers in Microbiology. – 2022. – Vol. 13. – T. 1047580.
3. Lovley D. R., Holmes D. E., Nevin, K. P. Dissimilatory fe (iii) and mn (iv) reduction //Advances in microbial physiology. – 2004. – T. 49. – №. 2. – С. 219-286.
4. Nixon S. L., Bonsall E., Cockell C. S. Limitations of microbial iron reduction under extreme conditions //FEMS microbiology reviews. – 2022. – Vol. 46. – №. 6. – P. fuac033.
5. Walker J. C. G. Was the Archaean biosphere upside down? //Nature. – 1987. – Vol. 329. – №. 6141. – P. 710-712.

Список публикаций по теме работы

Статьи

2. Pikhtereva V. A., Klyukina A. A., Merkel A. Y., Zavarzina D. G. Taxonomic Composition and Functional Potential of the Anaerobic Microbial Communities of the Tambukan Lake Therapeutic Muds //Microbiology. – 2024. – V. 93. – №. Suppl 1. – P. S28-S34.

Тезисы

6. В.А. Пихтерева, А.А. Ключкина, А.Ю. Меркель, Д.Г. Заварзина. Таксономический и функциональный состав анаэробных микробных сообществ лечебных грязей озера Тамбукан// XIV молодежная школа-конференция с международным участием Актуальные аспекты современной микробиологии (г. Москва, 6-8 ноября 2024 г.): - Москва: ВАШ ФОРМАТ. - 2024. – С. 168. (стендовый доклад)

Pikhtereva Valeria Alexandrovna
RESEARCH CENTRE OF BIOTECHNOLOGY RAS

**FEATURES OF RESPIRATORY METABOLISM OF ANAEROBIC PROKARYOTES
TRANSFORMING IRON MINERALS**

Abstract. *Prokaryotes involved in the transformation of iron-containing minerals are of interest not only for fundamental science, but also for biotechnology. These microorganisms are promising producers of nanosized magnetic particles used in biomedicine, electronics and other important industries. During the reporting period, enrichment and pure cultures of new iron reducers were obtained and an analysis of the genetic determinants responsible for the ability to transform mineral particles was conducted.*

Keywords: *underground biosphere, biogeochemical cycle of iron, iron reduction, thermophiles, pure cultures, aquifers.*

Работа выполнена при поддержке гранта РФФ 24-64-00023.

Салова Варвара Дмитриевна

аспирант ФИЦ Биотехнологии РАН 1 года обучения

научная специальность 1.5.11 Микробиология

e.mail: salovavd@gmail.com

Научный руководитель

Дедыш Светлана Николаевна

доктор биологических наук,

зав. лабораторией молекулярной экологии и филогеномики бактерий



ИЗУЧЕНИЕ ХАРАКТЕРИСТИК НОВОГО ПРЕДСТАВИТЕЛЯ ФИЛУМА *VERRUCOMICROBIOTA*, ВЫДЕЛЕННОГО ИЗ БИОРЕАКТОРА С МЕТАНОКИСЛЯЮЩИМИ МИКРООРГАНИЗМАМИ

Аннотация. *Verrucomicrobiota* – это отдельная филогенетическая группа домена *Bacteria*, которая представлена грамотрицательными, аэробными и анаэробными, свободноживущими и симбиотическими микроорганизмами с разнообразной морфологией клеток, населяющими широкий спектр местообитаний. За единичными исключениями, подавляющее большинство веррукомикробов сложны в культивировании, поэтому филум насчитывает сравнительно небольшое число таксономически охарактеризованных представителей. Работа первого года была направлена на изучение нового представителя этого филума, штамма *Vm1*, выделенного из биореактора с аэробными метанокисляющими микроорганизмами рода *Methylococcus*.

Ключевые слова: *Verrucomicrobiota*, семейство *Opitutaceae*, ассоциированные с метанотрофами бактерии, бактериальные микрокомпартменты (БМК).

Verrucomicrobiota – это одна из широко распространенных филогенетических групп бактерий, входящая вместе с *Planctomycetota* и *Chlamydiota* суперфилум PVC, представители которого отличаются особенностями клеточного строения. Веррукомикробы населяют широкий спектр местообитаний, их можно обнаружить в почвах, пресных и морских экосистемах, а также в микробиоме различных животных и человека [3]. Тем не менее, число полученных в культурах и охарактеризованных представителей этих бактерий остается крайне малым. Целью этого исследования является расширение спектра культивируемых представителей филума *Verrucomicrobiota* и изучение их физиологии и метаболического потенциала.

Исследования первого года были направлены на изучение характеристик нового изолята веррукомикробов, штамма *Vm1*, выделенного из биореактора с метанотрофными бактериями рода *Methylococcus*. В работе решались следующие задачи: 1) Установление таксономического положения штамма *Vm1* с помощью определения и сравнительного анализа полной последовательности гена 16S рРНК и генома; 2) Анализ диапазонов и оптимумов роста и спектра утилизируемых субстратов штамма *Vm1*; 3) Определение способности к росту в совместной культуре с *Methylococcus capsulatus* KN2 на минеральной среде с метаном в качестве единственного источника углерода и энергии.

Присутствие представителя филума *Verrucomicrobiota* в составе метанокисляющего микробного сообщества биореактора было выявлено с помощью профилирования по V3-V4 участку гена 16S рРНК. Получение чистой культуры штамма *Vm1* проводили с

помощью фильтрации суспензии клеток из биореактора через фильтр с диаметром пор 0,45 мкм и последующей серией предельных разведений. Для выделения, поддержания культуры и физиологических тестов использовали жидкую минеральную среду mNMS с добавлением фруктозы (250 мг/л), пептона (200 мг/л), дрожжевого экстракта (200 мг/л), pH 7. Рост штамма контролировали путем измерения OD₆₀₀ в течение 3 суток в различных условиях, включая температуру 4–45°C, pH 5.0–11.0 и концентрацию NaCl 0–4.0% (вес/об.). Диапазон потенциальных ростовых субстратов исследовали путем внесения в среду mNMS целевых источников углерода в концентрации 500 мг/л (кроме метана – 30% в газовой фазе и метанола – 0.05–0.1% (об./об.)) и 50 мг/л дрожжевого экстракта, как фактора роста. Новый штамм идентифицировали путем анализа последовательности гена 16S рРНК [11]. Построение филогенетических дендрограмм производили с использованием программного пакета MEGAX [5]. Секвенирование генома проводили с использованием MiSeq (“Illumina”, США) и MinIon (“Oxford Nanopore”, Великобритания). Для аннотации генома использовали PROKKA [10] и GhostKOALA [4]. Величины сходства последовательностей геномов штамма Vm1 и близкородственных к нему видов проводили с использованием ANI calculator [9].

В результате был выделен изолят бактерий, штамм Vm1, представленный мелкими подвижными диплококками, размером 0.45 ± 0.05 мкм с перитрихально расположенными жгутиками (Рис 1).

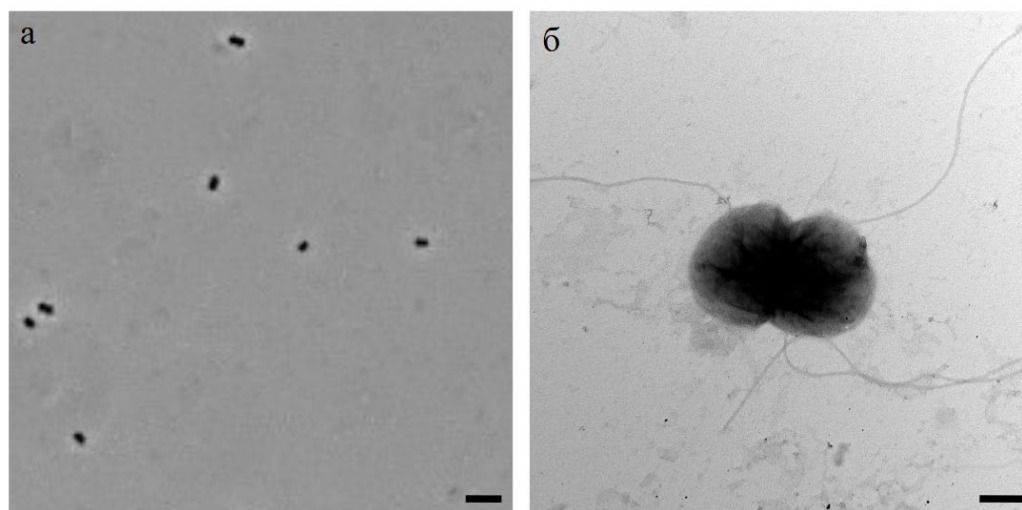


Рис.1: а – Фазово-контрастная микрофотография клеток штамма Vm1, масштабная метка – 2 мкм; б – Электронная микрофотография с контрастированием поверхностных структур клеток штамма Vm1, масштабная метка – 0.2 мкм.

Штамм Vm1 рос в диапазоне температур от 20 до 42°C ($T_{\text{опт}}$ 35–42°C) и pH от 5.5 до 9.0 ($\text{pH}_{\text{опт}}$ 6.5–8.0). Содержание NaCl в среде выше 0.5% (вес/об.) ингибировало рост. Рост штамма Vm1 наблюдался только в аэробных условиях. Источниками углерода и энергии являлись различные простые сахара (глюкоза, фруктоза, галактоза, манноза, ксилоза, L-рамноза, L-фукоза), дисахарида (лактоза, мальтоза), полисахарида (декстрин, ксилан, геллановая камедь, камедь рожкового дерева), некоторые органические кислоты (пируват, сукцинат, малат, фумарат, лактат) и некоторые аминокислоты и пептиды. Штамм Vm1 не способен к росту на метане и метаноле в качестве источников углерода и энергии. В качестве источников азота новый изолят использовал нитраты, аммоний, L-лейцин, тирозин, L-триптофан и L-глутамин. Исследуемый штамм показал стабильный рост в

бинарной культуре с *Methylococcus capsulatus* KN2 на минеральной среде с метаном в качестве единственного источника углерода и энергии.

Филогенетический анализ последовательности гена 16S рРНК показал принадлежность штамма Vm1 к семейству *Opitutaceae* филума *Verrucomicrobiota* (Рис. 2). Наиболее близкими таксономически охарактеризованными видами являются представители рода *Oleiharenicola* – *O. alkalitolerans* и *O. lentus*, со сходством нуклеотидных последовательностей гена 16S рРНК в 97.90% и 97.54%, соответственно. *O. alkalitolerans* был выделен из хвостохранилища нефтеносных песков [8], а *O. lentus* – ирригационной воды [1]. Другими ближайшими родственниками являлись бактерии рода "*Lacunisphaera*", выделенными из озерной воды [7], сходства последовательностей генов 16S рРНК составляло 95.53–96.65%.

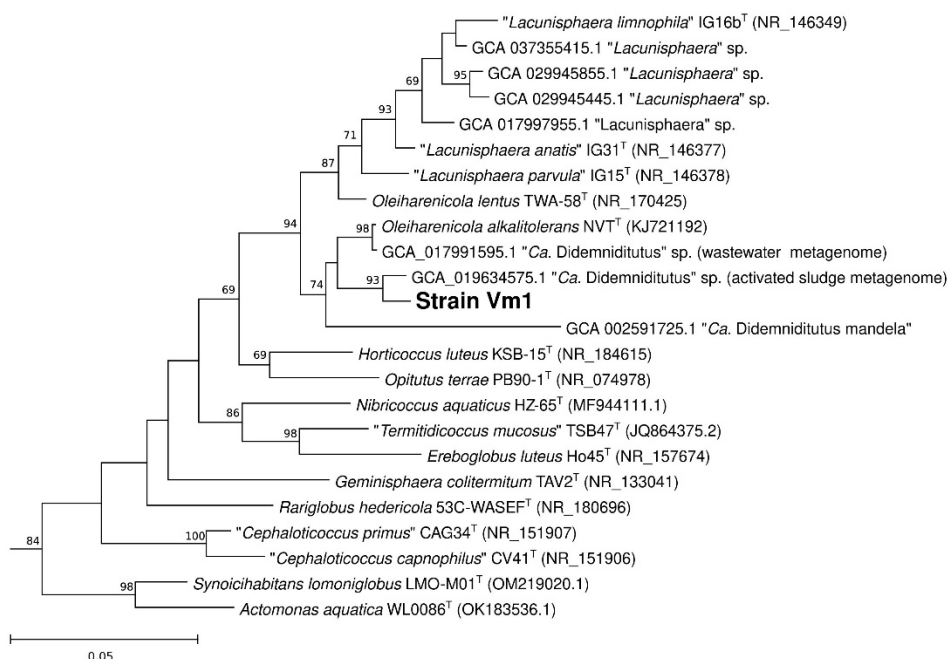


Рис.2 – Дендрограмма, построенная на основе результатов сравнительного анализа нуклеотидных последовательностей генов 16S рРНК штамма Vm1 и других представителей семейства *Opitutaceae*. Показаны значения бутстрэп-анализа >60.

Маркер – 0.05 замен на нуклеотидную позицию.

Полученная в результате гибридной сборки последовательность генома штамма Vm1 составила около 4.8 млн. пар оснований. Содержание ГЦ-пар в ДНК составило 68.89%. Оценка уровня подобия геномных последовательностей с помощью калькулятора ANI показала 82.9% и 80.1% сходства штамма Vm1 с представителями других двух видов рода *Oleiharenicola*, *O. alkalitolerans* и *O. lentus*, соответственно. Штамм Vm1 кластеризуется в одну монофилетическую группу с *O. alkalitolerans* и некультивированными представителями рода "*Ca. Didemniditutus*". Представители этой клады являются как свободноживущими, так и вступают в симбиозы с морскими беспозвоночными [6]. Геномы других представителей этой клады были получены из различных пресноводных экосистем. Уровень сходства геномных последовательностей (ANI) между штаммом Vm1 и представителями клады "*Ca. Didemniditutus*" составил от 77.33 до 85.51%. Все вышеперечисленное указывает на принадлежность штамма Vm1 к новому виду рода *Oleiharenicola* (семейство *Opitutaceae*).

В ходе аннотации определили, что геном штамма Vm1 содержит необходимые гены ферментов ряда основных метаболических путей - гликолиза, окислительного пентозофосфатного пути, КДФГ-пути, цикла трикарбоновых кислот без глиоксилатного шунта. Отсутствие ключевых генов метанотрофии и метилотрофии согласуется с отсутствием роста на метане и метаноле.

Одной из интересных особенностей штамма Vm1 являлась его способность расти на L-рамнозе и L-фукозе. Для ряда представителей филумов *Planctomycetota* и *Verrucomicrobiota* характерны рост на дезокси-L-сахарах (L-рамнозе и L-фукозе) и образование бактериальных микрокомпартментов (БМК). БМК необходимы для изоляции токсичного лактальдегида, образующегося при окислении этих сахаров [2]. В геноме штамма Vm1 были обнаружены α -L-рамнозидазы, α -L-фукозидазы, а также кластер генов фосфорилирующего пути метаболизма L-рамнозы и часть генов не- /фосфорилирующих путей L-фукозы. Анализ генома выявил способность штамма Vm1 к формированию БМК. Обнаруженный кластер генов БМК включает регулятор транскрипции семейства DeoR, четыре гена гексамер- и три гена пентамер-формирующих субъединиц оболочки, а также пять генов, кодирующих ферменты. В геноме также был обнаружен БМК-независимый путь деградации L-рамнозы, ключевым ферментом которого является предполагаемый бифункциональный фермент, обладающий рамнулозо-1-фосфат альдозазной и лактальдегидрогеназной активностями. Вероятно, штамм Vm1 использует эти пути при росте в ассоциации с метанотрофами рода *Methylococcus*, в состав экзополисахаридов которых входит L-рамноза [12].

Основные выводы

1. Изучение физиологии штамма Vm1, выделенного из метанотрофного сообщества биореактора, показало, что он представлен термотолерантными подвижными хемоорганотрофными бактериями, использующими сахара, некоторые полисахариды, органические кислоты и пептиды, и растущими в диапазоне температур 20-42°C с оптимумом при 40-42°C и pH от 5.0 до 9.0 с оптимумом при pH 7.0-8.0.

2. Сравнительный анализ последовательности гена 16S рРНК штамма Vm1 показал его принадлежность к роду *Oleiharenicola* семейства *Opitutaceae* филума *Verrucomicrobiota* (97.90% сходства последовательностей генов 16S рРНК с ближайшим видом). Филогеномный анализ позволил идентифицировать штамм Vm1 как представителя филогенетической подгруппы семейства *Opitutaceae*, образованной *Oleiharenicola alkalitolerans* и некультивируемыми веррукомикробами "*Candidatus Didemniditutus*".

3. Определена последовательность генома штамма Vm1 длиной 4.8 млн. п.н., включающая около 4200 белок-кодирующих генов и 3 копии оперона рРНК, с содержанием ГЦ-пар в ДНК равным 68.9%. Геном штамма Vm1 кодирует необходимые ферменты окисления дезокси-L-сахаров. Способность использовать L-рамнозу, входящую в состав экзополисахаридов *Methylococcus capsulatus*, объясняет способность штамма Vm1 расти в ассоциации с этим метанотрофом.

Литература

17. Chen W.M., Chen T.Y., Yang C.C., Sheu S.Y. *Oleiharenicola lentus* sp. nov., isolated from irrigation water //International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. – 2020. – V. 70. – №. 5. – P. 3440-3448.

18. Erbilgin O., McDonald K.L., Kerfeld C.A. Characterization of a planctomycetal organelle: a novel bacterial microcompartment for the aerobic degradation of plant saccharides // *Applied and environmental microbiology*. – 2014. – V. 80. – №. 7. – P. 2193-2205.
19. Hedlund B.P. Phylum XXIII. *Verrucomicrobia* phyl. nov // *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. – Springer, New York, 2010. – P. 795-841.
20. 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.
21. Kumar S., Stecher G., Li M., Knyaz C., Tamura K. MEGA X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms // *Molecular biology and evolution*. – 2018. – V. 35. – №. 6. – P. 1547.
22. Lopera J., Miller I.J., McPhail K.L., Kwan J.C. Increased biosynthetic gene dosage in a genome-reduced defensive bacterial symbiont // *Msystems*. – 2017. – V. 2. – №. 6. – P. 10.1128/msystems. 00096-17.
23. Rast P., Glöckner I., Boedeker C., Jeske O., Wiegand S., Reinhardt R., Schumann P., Rohde M., Spring S., Glöckner F.O., Jogler C., Jogler M. Three novel species with peptidoglycan cell walls form the new genus *Lacunisphaera* gen. nov. in the family *Opitutaceae* of the verrucomicrobial subdivision 4 // *Frontiers in microbiology*. – 2017. – V. 8. – P. 202.
24. Rochman F.F., Kim J.J., Rijpstra W.I.C., Sinninghe Damsté J.S., Schumann P., Verbeke T.J., Dunfield P.F. *Oleiharenicola alkalitolerans* gen. nov., sp. nov., a new member of the phylum *Verrucomicrobia* isolated from an oilsands tailings pond // *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. – 2018. – V. 68. – №. 4. – P. 1078-1084.
25. Rodriguez-R L.M., Konstantinidis K.T. Bypassing cultivation to identify bacterial species // *Microbe*. – 2014. – V. 9. – №. 3. – P. 111-118.
26. Seemann, T. Prokka: rapid prokaryotic genome annotation // *Bioinformatics*. – 2014. – V. 30 – № 14. – P. 2068–2069.
27. 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.
28. Wyss O., Moreland E. J. Composition of the capsule of obligate hydrocarbon-utilizing bacteria // *Applied Microbiology*. – 1968. – V. 16. – №. 1. – P. 185.

Список публикаций по теме работы

Тезисы

1. Салова В.Д., Данилова О.В., Ошкин И.Ю., Сузина Н.Е., Дедыш С.Н. Особенности метаболизма L-рамнозы и формирование бактериальных микрокомпарментов в клетках нового представителя филума *Verrucomicrobiota* // Сборник тезисов 28-ой Пущинской школы-конференции молодых ученых с международным участием "БИОЛОГИЯ - НАУКА XXI ВЕКА" (г. Пущино, 21–24 апреля 2025 г.) – Пущино: ФИЦ ПНЦБИ РАН, 2025. – С. 350-351.

Salova Varvara Dmitrievna

FEDERAL RESEARCH CENTRE OF BIOTECHNOLOGY

**NOVEL REPRESENTATIVE OF THE PHYLUM *VERRUCOMICROBIOTA*
ISOLATED FROM A BIOREACTOR WITH METHANE-OXIDISING
MICROORGANISMS**

Abstract. *Verrucomicrobiota* constitutes a distinct phylogenetic group of the domain Bacteria, comprising Gram-negative, aerobic and anaerobic, free-living and symbiotic microorganisms with diverse cell morphology, which inhabit a wide range of habitats. With few exceptions, the vast majority of verrucomicrobia are difficult to culture, and as a result the phylum has a relatively small number of taxonomically characterized representatives. The work undertaken during the first year focused on the study of a novel representative of this phylum, strain Vm1, which was isolated from a bioreactor containing aerobic methanotrophic bacteria of the genus *Methylococcus*.

Keywords: *Verrucomicrobiota*, family *Opitutaceae*, methanotroph-associated bacteria, bacterial microcompartments (BMC)

Работа выполнена при поддержке гранта РНФ 25-24-00426 «Филум Verrucomicrobiota: новый подход к расширению культивируемого разнообразия».

Чепурко Владислав Геннадьевич

аспирант ФИЦ Биотехнологии РАН 1 года обучения

научная специальность 1.5.6 Биотехнология

e-mail: vgchepurko@gmail.com

Научный руководитель

Попов Владимир Олегович

доктор химических наук, академик РАН

зав. лаб. инженерной энзимологии



РАЗРАБОТКА МЕТОДА ТРАНСФОРМАЦИИ ГАЛОАКАЛИФИЛЬНОЙ БАКТЕРИИ *THIOALKALIVIBRIO PARADOXUS*

Аннотация. *Tv. paradoxus* — галоалкалифильная хемолитоавтотрофная бактерия, обладающая уникальной способностью к окислению тиоцианата. Метаболизм этого организма представляет значительный интерес, однако, изучение клеточных молекулярных механизмов до настоящего времени ограничивалось отсутствием методов генной инженерии, применимых к *Tv. paradoxus*. В этой работе впервые описан способ трансформации *Tv. paradoxus* с использованием вектора широкого круга хозяев *pBBR1MCS-1*. Разработанный метод основан на конъюгационном переносе плазмидной ДНК от штаммов *E. coli* SM10 и S17-1. Наличие рекомбинантной ДНК в трансформированных клетках *Tv. paradoxus* было подтверждено методом ПЦР с использованием праймеров к маркерным генам. Предложенный подход позволяет создать основу для генетических исследований данного организма.

Ключевые слова: *Thioalkalivibrio paradoxus*, трансформация, конъюгация, *E. coli* SM10 и S17-1, электропорация, вектор широкого круга хозяев *pBBR1MCS-1*, зеленый флуоресцентный белок.

Tv. paradoxus представляет собой галоалкалифильную хемолитоавтотрофную бактерию, впервые выделенную из содового озера в Кении. [1] Этот вид, как и некоторые другие представители рода *Thioalkalivibrio*, способен использовать тиоцианат (SCN^-) в качестве единственного источника энергии и азота. Тиоцианат — токсичный, устойчивый анион, образующийся в результате ряда промышленных процессов, включая производство гербицидов и инсектицидов, газификацию и коксование угля, а также добычу золота. Для его биологической утилизации применяются смешанные культуры сероокисляющих бактерий. *Tv. paradoxus* можно рассматривать как организм перспективный для этого направления. Ранее в лаборатории инженерной энзимологии ФИЦ Биотехнологии РАН были исследованы биохимические свойства и получена структура тиоцианатдегидрогеназы — ключевого фермента пути окисления тиоцианата из бактерии *Tv. paradoxus*. [2] Изучение метаболических систем *Tv. paradoxus* представляет фундаментальный и прикладной интерес, поэтому крайне важно иметь арсенал генно-инженерных подходов, позволяющих целенаправленно изменять генетический материал этой бактерии. Разработка эффективных методов трансформации *Tv. paradoxus* является ключевым шагом к изучению её метаболических путей, регуляции экспрессии генов и созданию штаммов с заданными свойствами.

Для работы была выбрана векторная система на основе плазмиды pBBR1MCS-1. [3] Данная плазида содержит генетические детерминанты *oriV* и *rep*, обеспечивающие автономную репликацию плазмиды в широком круге хозяев, сайт множественного клонирования, селективный маркер устойчивости к хлорамфениколу *catA* и участок *mob*, необходимый для мобилизации плазмиды при конъюгационном переносе. Этот процесс осуществляется генами *tra*-оперона, представленным в клетке-доноре в составе отдельной плазмиды (например, RK2), либо интегрированным непосредственно в геном (например, штаммы *E. coli* SM10 и S17-1). В литературе [4] эти штаммы *E. coli* представляются как надежные инструменты для межвидовой передачи генетической информации, включая перенос генетического материала в экстремофильные микроорганизмы.

На первом этапе для определения потенциального селективного маркера был произведен анализ генома *Tv. paradoxus* на предмет содержания в нём генов, кодирующих белки, ответственные за устойчивость к ряду антибиотиков, широко используемых в генной инженерии. Было выявлено, что в геноме бактерии содержатся гены белков, обеспечивающих устойчивость к ампициллину, гентамицину, стрептомицину, канамицину и тетрациклину, что делает невозможным использование этих антибиотиков в качестве селективных маркеров. В связи с этим для роли селективного агента был выбран эритромицин, так как в геноме исследуемой бактерии не обнаружен ген, кодирующий рНК-метилтрансферазу — фермент, который придает клеткам устойчивость к этому антибиотику. Для *Tv. paradoxus* была определена минимальная летальная концентрация эритромицина, которая составила 5 мкг/мл.

Ген, кодирующий рНК-метилтрансферазу, был амплифицирован с использованием в качестве матрицы плазмиды pTRKH2 и клонирован в вектор pBBR1MCS-1 по сайтам *AatII* и *NcoI* вместо фрагмента, содержащего ген устойчивости к хлорамфениколу. Затем в полученный вектор по сайтам *XbaI* и *SalI* был клонирован ген *gfp*, кодирующий зеленый флуоресцентный белок (GFP), под контролем конститутивного промотора гена, кодирующего большую субъединицу рибулозобисфосфаткарбоксилазы (RuBisCO) в *Tv. paradoxus*. Полученной плазмидой pBBR1-gfp-ErmR (рисунок 1) были трансформированы штаммы *E. coli* SM10 и S17-1.

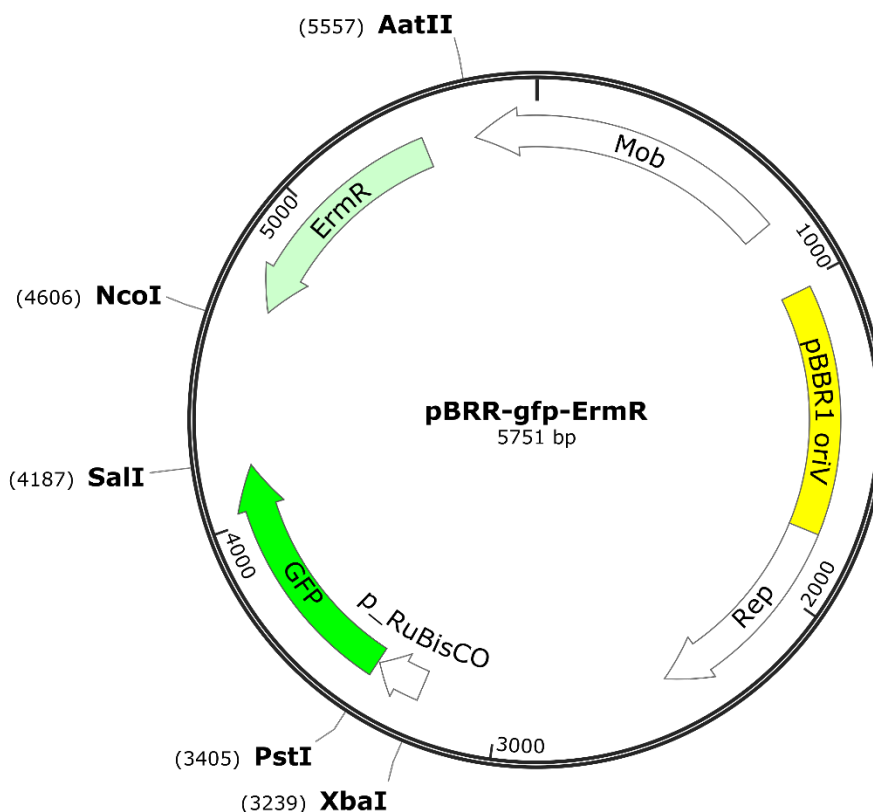


Рис. 1. Схематическое изображение плазмиды pBRR-gfp-ErmR

Культуры клеток *E. coli* (донор) и *Tv. paradoxus* (реципиент) выращивали до достижения оптической плотности $OD_{600} = 0,7$. Смесь донора и реципиента в соотношении 1:1 помещали на стерильный нитроцеллюлозный фильтр, находящийся на агаризованной питательной среде SMTD [5]. Через сутки биомассу с поверхности фильтра смывали и сеяли на агаризованную питательную среду TD [5] для *Tv. paradoxus*, содержащую 10 мкг/мл эритромицина. Спустя 5 суток инкубации при 37 °C на селективной среде обнаруживали колонии трансформированных клеток *Tv. paradoxus*. Наличие плазмиды в трансформированных клетках дополнительно подтверждали методом ПЦР с использованием праймеров к гену устойчивости к эритромицину и *gfp*. Однако при анализе трансформантов с использованием флуоресцентной микроскопии, экспрессии функционального GFP выявлено не было. Полученные трансформанты сохраняли устойчивость к антибиотику при повторных пересевах на селективную среду.

Для обоих штаммов-доноров из 10^8 исходных клеток *Tv. paradoxus* получали от 1 до 20 трансформантов. Изменение условий трансформации (продолжительность инкубации конъюгации, варьирование состава питательной среды и изменение соотношения донор:реципиент) существенно не повлияли на эффективность трансформации.

Также был протестирован метод электропорации клеток *Tv. paradoxus* с использованием плазмиды pBRR1-ErmR-gfp (напряжённость поля — 15 кВ/см, длительность импульса — 6 мс). Компетентные клетки готовили путём двукратной отмывки биомассы раствором, содержащим 0,5 М сорбитола, 0,5 М маннитола и 10% глицерина. Ранее было показано, что клетки *Tv. paradoxus* теряют жизнеспособность в воде, однако сохраняются после обработки указанным раствором. Тем не менее, при использовании данной методики получить трансформанты не удалось.

Таким образом, в настоящей работе впервые был предложен способ трансформации клеток *Tv. paradoxus* мобилизуемой плазмидой широкого круга хозяев методом конъюгации с применением штаммов-доноров *E. coli* SM10 и S17-1, что открывает потенциальные возможности для разностороннего изучения этой бактерии.

Основные выводы

- Впервые показана возможность трансформации *Tv. paradoxus* путём конъюгационного переноса плазмиды широкого круга хозяев pBBR1-ErmR-gfp с использованием донорских штаммов *E. coli* SM10 и S17-1.
- Селекцию проводили по устойчивости полученных трансформантов *Tv. paradoxus* к эритромицину. Устойчивость к антибиотику сохранялась при последовательных пересевах. Присутствие плазмиды в клетке было подтверждено ПЦР с использованием праймеров к маркерным генам.
- Частота трансформации составила 1–20 колоний на 10^8 клеток.
- Электропорация при выбранных параметрах оказалась неэффективной.
- Полученный инструментарий открывает доступ к направленной молекулярной инженерии и функциональному анализу метаболических путей *Tv. paradoxus*.

Литература

1. Sorokin D. Y. et al. Thioalkalivibrio thiocyanoxidans sp. nov. and Thioalkalivibrio paradoxus sp. nov., novel alkaliphilic, obligately autotrophic, sulfur-oxidizing bacteria capable of growth on thiocyanate, from soda lakes //International journal of systematic and evolutionary microbiology. – 2002. – Т. 52. – №. 2. – С. 657-664.
2. Tikhonova T. V. et al. Trinuclear copper biocatalytic center forms an active site of thiocyanate dehydrogenase //Proceedings of the National Academy of Sciences. – 2020. – Т. 117. – №. 10. – С. 5280-5290.
3. Kovach M. E. et al. pBBR1MCS: a broad-host-range cloning vector //Biotechniques. – 1994. – Т. 16. – №. 5. – С. 800-802.
4. Xu T. et al. Utilization of gene manipulation system for advancing the biotechnological potential of halophiles: A review //Biotechnology Advances. – 2024. – Т. 70. – С. 108302.
5. Hao X. et al. CRISPR/Cas12a-Mediated genome editing in Thioalkalivibrio versutus //ACS Synthetic Biology. – 2023. – Т. 12. – №. 4. – С. 1204-1215.

Chepurko Vladislav Gennadievich

RESEARCH CENTER OF BIOTECHNOLOGY RAS

DEVELOPMENT OF A TRANSFORMATION METHOD FOR THE HALOALKALIPHILIC BACTERIUM *THIOALKALIVIBRIO PARADOXUS*

Abstract. *Thioalkalivibrio paradoxus* is a haloalkaliphilic chemolithoautotrophic bacterium distinguished by its capacity to oxidize thiocyanate—an ability of considerable environmental and biochemical relevance. Despite the organism's potential for both fundamental and applied research, investigations into its molecular and cellular mechanisms have been

hindered by the absence of suitable genetic engineering tools. Here, we report the first successful transformation of Tv. paradoxus using the broad-host-range vector pBBR1MCS-1. The method relies on conjugative transfer of plasmid DNA from donor strains E. coli SM10 and S17-1. Integration of recombinant DNA was confirmed in Tv. paradoxus transformants by PCR with primers targeting marker genes. This work establishes a foundational genetic platform for the study and manipulation of extremophilic sulfur-oxidizing bacteria.

Keywords: *Thioalkalivibrio paradoxus; conjugative transfer; E. coli SM10 and S17-1; electroporation; broad-host-range vector; green fluorescent protein.*

Шайфутдинов Ролан Рустемович

аспирант ФИЦ Биотехнологии РАН 1 года обучения

научная специальность 1.5.3 Молекулярная биология

e-mail urtmyakowski@yandex.ru

Научный руководитель

Воробьёв Иван Иванович

доктор биологических наук

в.н.с., зав. лабораторией

биоинженерии клеток млекопитающих



ПОЛУЧЕНИЕ ПРОДУЦЕНТА БИОАНАЛОГОВОГО Fc-СЛИТНОГО БЕЛКА В АПОПТОЗ-РЕЗИСТЕНТНЫХ КЛЕТКАХ CHO

Аннотация: В исследовании разработаны продуценты биоаналогового Fc-слитного белка на основе антиапоптотической линии клеток CHO 4BGD. Использованы две генетические конструкции под контролем промотора фактора элонгации трансляции 1 альфа китайского хомячка. Последовательная трансфекция, геномная амплификация (метотрексат до 8 мкМ) и двойная селекция (MTX + MSX) позволили достигнуть продуктивности клеточных популяций 25 нг/клетку. Клеточное клонирование выявило 12 высокопродуктивных клонов, из которых линии 73 и 105 при периодическом культивировании с подпиткой и снижением температуры (37→34°C) достигли титров 1047 и 952 мг/л за 18 дней при жизнеспособности >80%.

Ключевые слова: Fc-слитные белки, клетки CHO, геномная амплификация, клеточное клонирование, периодическое культивирование с подпиткой.

Fc-слитные белки (Fc-белки) представляют собой химерные белки, обычно состоящие из лиганда рецептора или внеклеточного фермента, слитого с Fc-фрагментом иммуноглобулина. Благодаря повышенной стабильности и увеличенному периоду полувыведения Fc-белки представляют из себя перспективный класс биофармацевтических препаратов. В некоторых случаях Fc-белки могут заменить моноклональные антитела (мкАт) за счет очень прочного связывания лиганда со своим рецептором. На 2020 год тринадцать Fc-белков были одобрены FDA для клинического применения, ещё 37 находились на стадии разработки. Большинство из них производится с помощью клеток яичника китайского хомячка (CHO) [1].

В отличие от мкАт, большинство Fc-белков кодируются одним геном, в котором может сильно различаться длина целевой мРНК и ее 5'-концевая область. По-прежнему актуальным остается вопрос разработки эффективной системы экспрессии Fc-белков для экономически обоснованного производства. По сравнению с моноклональными антителами Fc-белки предъявляют дополнительные требования к выделению и очистке ввиду чувствительности к рН, ионной силе раствора и склонности к агрегации [2]. Также важно отметить, что производство Fc-белков требует более тщательного контроля профиля гликозилирования по сравнению с моноклональными антителами ввиду наличия большего количества сайтов гликозилирования [1].

В данной работе были получены две генетические конструкции кодирующие открытую рамку считывания короткого биоаналогового Fc-белка на основе векторов семейства p1.1 под контролем промотора фактора элонгации трансляции 1 альфа китайского хомячка [3, 4], с селекционными маркерами дигидрофолатредуктазы (DHFR) и глутаминсинтетазы (GS) соответственно: p1.1-Tr2-Fc, p1.2-GS-Fc .

Плазмида p1.1-Tr2-Fc была трансфицирована путем электропорации в антиапоптотическую линию клеток CHO 4BGD с нокаутами генов BAK1, BAX, DHFR и GLUL и сверхэкспрессией генов BCL2 и BECN1, полученную ранее в нашей лаборатории на основе клеточной линии CHO-S [5].

С помощью селекционного воздействия метотрексата (MTX) была получена стабильно трансфицированная поликлональная популяция с нормализованной волюметрической продуктивностью 1.8 пг/клетку. Клетки подвергали возрастающим концентрациям MTX (200 нМ – 2 мкМ – 8 мкМ), что привело к увеличению продуктивности в 10 раз. Была проведена повторная трансфекция поликлональной популяции клеток, полученной при действии 8 мкМ MTX, вспомогательной плазмидой p1.2-GS-Fc. Клетки подвергали вторичной селекции путем воздействия агента L-метионин сульфоксимины (MSX) в концентрации 25 мкМ. Полученная стабильно трансфицированная поликлональная популяция имела несколько более высокую продуктивность (Таблица 1).

Таблица 1

Титр Fc-белка при селекции и амплификации, оценка на третий день простого периодического процесса, измерение методом ИФА.

Этап	Концентрация селекционного агента в среде	Титр Fc-белка, мкг/мл $\pm$ SD	Плотность культуры, тыс. клеток/мл	Нормализованная волюметрическая продуктивность, пг/клетка
Первичная селекция	200 нМ MTX	$3,5 \pm 0,06$	2010	1,8
Амплификация, шаг 1	2 мкМ MTX	$19,4 \pm 0,12$	1880	10,3
Амплификация, шаг 2	8 мкМ MTX	$30,1 \pm 0,41$	1610	18,7
Вторичная селекция после дополнительной трансфекции	8 мкМ MTX, 25 мкМ MSX	$49,4 \pm 0,58$	1980	25,0

Полученную поликлональную популяцию подвергли клеточному клонированию путем посева в лунки 96-луночного планшета. Все колонии клеток перенесли в 24-луночный планшет и подвергли скринингу уровня продуктивности методом иммуноферментного анализа. 42 клон с максимальным титром перенесли в 6-луночные

планшеты и снова подвергли скринированию. Наконец, 12 клонов с максимальным титром перенесли в перемешиваемые колбы Эрленмейера для дальнейшего тестирования.

Для четырех клональных линий с наиболее высокой продуктивностью проводили длительное культивирование с подпиткой и снижением температуры с 37 до 34 °С на пятый день в среде EmCD CHO 101 (Eminence, КНР). Клетки клональных линий 73 и 105 продемонстрировали сохранение жизнеспособности выше 80% в течение 18 дней культивирования (Рис. 1, Б). Уровень аммония возрастал в течение всего времени культивации и достиг 14 мМ в день окончания культивирования (Рис. 1, Г).

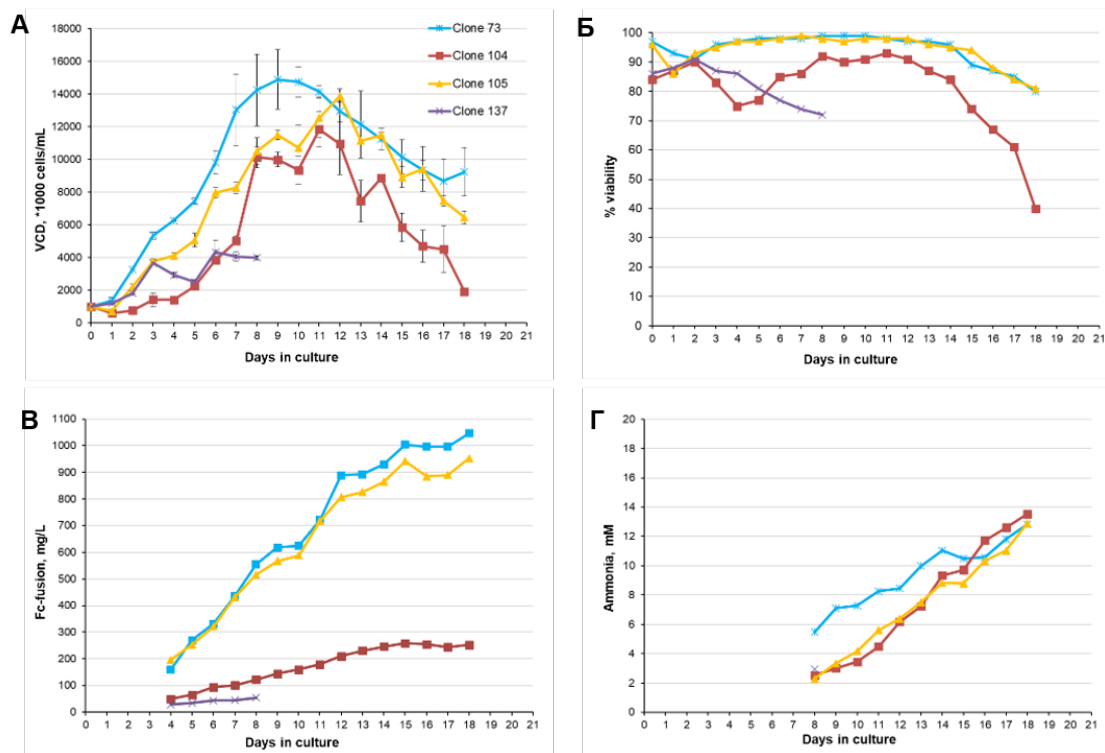


Рис. 7 Периодическое культивирование клональных линий. Динамика клеточной плотности (А), выживаемости (Б), накопления целевого белка (В), уровня аммония (Г)

Уровень Fc-белка возрастал практически линейно до дня 12, рос незначительно в дни 12-15 и практически перестал расти в дни 15-18. Для клональных линий 73 и 105, максимальный титр составил 1047 мг/л и 952 мг/л соответственно (Рис. 1, В).

Основные выводы: на основе антиапоптотической клеточной линии CHO 4BGD были получены штаммы-продуценты биоаналогового Fc-белка, имеющие повышенную жизнеспособность и демонстрирующие титр продукта около 1000 мг/л при периодическом культивировании с подпиткой в течение 18 дней.

Литература

1. Duivelshof, B.L., et al., Therapeutic Fc-fusion proteins: current analytical strategies. *Journal of separation science*, 2021. 44(1): p. 35-62.
2. Kovnir, S., et al., Knockout of BAX and BAK1 genes and overexpression of BCL2, BECN1 genes increase lifespan and the maximum density of a CHO-S cell culture. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 2023. 59(8): p. 1047-1052.

3. Orlova, N.A., et al., Improved elongation factor-1 alpha-based vectors for stable high-level expression of heterologous proteins in Chinese hamster ovary cells. BMC biotechnology, 2014. 14: p. 1-12.
4. Shukla, A.A., P. Gupta, and X. Han, Protein aggregation kinetics during Protein A chromatography: Case study for an Fc fusion protein. Journal of chromatography A, 2007. 1171(1-2): p. 22-28.
5. Sinegubova, M.V., N.A. Orlova, and I.I. Vorobiev, Promoter from Chinese hamster elongation factor-1a gene and Epstein-Barr virus terminal repeats concatemer fragment maintain stable high-level expression of recombinant proteins. PeerJ, 2023. 11: p. e16287.

Список публикаций по теме работы

Тезисы докладов

1. Шайфутдинов Р.Р., Гаямова Е.А., Воробьев И.И., & Орлова Н.А. (2024) Экспрессия слитых с кристаллизуемым фрагментом иммуноглобулина G1 белков в клетках CHO. XXXVI международная зимняя молодежная научная школа, Москва, 7-9 февраля 2024 года.
2. Шайфутдинов Р.Р., Гаямова Е.А., Синегубова М. В., Воробьев И.И., Орлова Н.А. Плазмиды на основе нетранслируемых частей гена EEF1A1 китайского хомячка в качестве платформы для экспрессии терапевтических Fc-белков. 27-я Пущинская школаконференция молодых ученых с международным участием «Биология-наука XXI века» Пущино, 22–25 апреля 2024 года.

Shayfutdinov Rolan Rustemovich

RESEARCH CENTER OF BIOTECHNOLOGY RAS

OBTAINING A PRODUCER OF A BIOSIMILAR FC-FUSION PROTEIN IN APOPTOSIS-RESISTANT CHO CELLS

Abstract: *In this study, producers of a biosimilar Fc-fusion protein were developed using the apoptosis-resistant CHO 4BGD cell line. Two genetic constructs under the control of the Chinese hamster elongation factor 1 alpha (EF-1a) promoter were employed. Sequential transfection, genomic amplification (methotrexate up to 8 μ M), and dual selection (MTX + MSX) enabled achieving a cellular population productivity of 25 pg/cell. Cell cloning identified 12 high-productivity clones, with lines 73 and 105 reaching titers of 1047 and 952 mg/L, respectively, during 18-day fed-batch cultivation with temperature reduction (37→34°C) while maintaining viability above 80%.*

Keywords: *Fc-fusion proteins, CHO cells, genomic amplification, cell cloning, fed-batch cultivation.*