



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»

22 – 23 июня 2026 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*; д.б.н., профессор *Е.В. Коротков*; д.б.н. *Н.В. Пименов*; д.б.н. *А.Ф. Топунов*

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» (22-23 июня 2026 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 22-23, 2026)

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, 2026

Оглавление

Багаева Д.И. «КАРУСЕЛЬНЫЙ» МЕХАНИЗМ МЕТИЛТРАНСФЕРАЗЫ СРМТА ОБЕСПЕЧИВАЕТ СИНТЕЗ ТЕТРАМЕТИЛОВОГО ЭФИРА КОПРОПОРФИРИНА III ПРИ ПЕРЕХОДЕ <i>Mycobacterium smegmatis</i> В СОСТОЯНИЕ ПОКОЯ.....	5
Володина В.Н. ИССЛЕДОВАНИЕ БЕЛКОВОГО ПРОФИЛЯ И УРОВНЕЙ ПРОВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ ЦИТОКИНОВ В МОЗГЕ МЫШЕЙ NON-SPF ПОСЛЕ ХРОНИЧЕСКОГО ВОЗДЕЙСТВИЯ КУПРИЗОНА.....	10
Ефремова А.Д. СВОЙСТВА РЕКОМБИНАНТНОЙ 5'-НУКЛЕОТИДАЗЫ ИЗ <i>Limosilactobacillus reuteri</i>	18
Зайцев П.Е. ОЦЕНКА БИОСОВМЕСТИМОСТИ И БИОИНТЕГРАЦИИ ПОРИСТЫХ УГЛЕРОД-УГЛЕРОДНЫХ КОМПОЗИТНЫХ МАТЕРИАЛОВ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МРТ.....	23
Игнатенко А.В. ВОССТАНОВЛЕНИЕ ХРОМАТА НОВЫМИ ГАЛОАЛКАЛОФИЛЬНЫМИ БАКТЕРИЯМИ.....	30
Клюшин Г.С. ЭКСТРЕМОФИЛЬНЫЕ МИКРОБНЫЕ СООБЩЕСТВА КАК ИСТОЧНИКИ НОВЫХ ГЛУБОКИХ ФИЛОГЕНЕТИЧЕСКИХ ЛИНИЙ ЭЛЕКТРОАКТИВНЫХ ПРОКАРИОТ И БАЗА ДЛЯ СОЗДАНИЯ АВТОНОМНЫХ ИСТОЧНИКОВ ТОКА.....	35
Лайкова А.А. ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ ЭЛЕКТРОПРОВОДЯЩИХ И ИНЕРТНЫХ МАТЕРИАЛОВ-НОСИТЕЛЕЙ НА ПРОЦЕСС ТЕМНОВОЙ ФЕРМЕНТАЦИИ В БИОФИЛЬТРАХ С ВОСХОДЯЩИМ ПОТОКОМ.....	40
Рассомахина Н.В. ИЗУЧЕНИЕ ПРОТИВООПУХОЛЕВОГО ОТКЛИКА НА ИНГИБИТОРЫ ПРОТЕИНКИНАЗ НА БИОЛОГИЧЕСКИХ МОДЕЛЯХ РАКА.....	45
Шехурдина С.В. ВЛИЯНИЕ МОДИФИКАЦИИ БИОАНОДА НА БЕЗНИТРИТНОЕ УДАЛЕНИЕ АММОНИЯ АНАММОКС-СООБЩЕСТВОМ В МИКРОБНОЙ ЭЛЕКТРОЛИЗНОЙ ЯЧЕЙКЕ	54
Ефремова К.В. СОСТАВ МИКРОБНОГО СООБЩЕСТВА БИОФИЛЬТРА: ОПРЕДЕЛЕНИЕ И ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ПРОВЕРКА	59
Илясов И.О. СТРУКТУРНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ПРИ РАЗРАБОТКЕ ТЕРАПЕВТИЧЕСКИХ АНТИТЕЛ И ИММУНОГЕНОВ: ОПРЕДЕЛЕНИЕ МЕХАНИЗМА НЕЙТРАЛИЗАЦИИ ТЯЖЕЛОЦЕПОЧЕЧНЫХ АНТИТЕЛ К КЛОСТРИДИЙНОМУ ТОКСИНУ И ГЕМАГГЛЮТИНИНУ ГРИППА, РАЦИОНАЛЬНАЯ ОПТИМИЗАЦИИ АНТИГЕНА ДЛЯ ВАКЦИНОПРОФИЛАКТИКИ ВИЧ	64
Колесов Д.Э. СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ РАСПРЕДЕЛЕНИЯ R-ПЕТЕЛЬ В КЛЕТКАХ ПЛОСКОКЛЕТОЧНОГО РАКА ШЕЙКИ МАТКИ.....	69
Косякова А.И. ФИКСАЦИЯ АЗОТА И АНОКСИГЕННЫЙ ФОТОСИНТЕЗ У НЕГЕТЕРОЦИСТНОЙ ЦИАНОБАКТЕРИИ <i>SODALINEMA</i> SP. P-1104.....	74
Макарова А.О. ИЗУЧЕНИЕ ОЛИГОМЕРИЗАЦИИ БЕЛКА ПИРУВАТ-ФОРМИАТ ЛИАЗЫ В (PflB) <i>E. coli in vivo</i>	79

Маркелова Е.Е. АНАЛИЗ ПОПУЛЯЦИОННО-СПЕЦИФИЧНЫХ ИММУННЫХ ИЗМЕНЕНИЙ ПРИ ДИАБЕТЕ 2 ТИПА В РОССИИ	83
Пихтерева В.А. ВЫДЕЛЕНИЕ И ОПИСАНИЕ НОВЫХ ЖЕЛЕЗОРЕДУКТОРОВ ИЗ ВОДОНОСНЫХ ГОРИЗОНТОВ КАВКАЗСКИХ МИНЕРАЛЬНЫХ ВОД.....	89
Салова В.Д. ВЫДЕЛЕНИЕ НОВЫХ ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ ФИЛУМА <i>VERRUCOMICROBIOTA</i> ИЗ НАКОПИТЕЛЬНЫХ КУЛЬТУР С МЕТАНОКИСЛЯЮЩИМИ МИКРООРГАНИЗМАМИ.....	96
Чепурко В.Г. ПОДБОР УСЛОВИЙ ТРАНСФОРМАЦИИ БАКТЕРИЙ РОДА <i>Thioalkalivibrio</i> МЕТОДОМ ЭЛЕКТРОПОРАЦИИ	101
Шайфутдинов Р.Р. АНАЛИТИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИЗАЦИЯ И ОЦЕНКА СТАБИЛЬНОСТИ ПРОДУЦЕНТА БИОАНАЛОГОВОГО ДУЛАГЛУТИДА В КЛЕТКАХ СНО.....	107
Ваапов Б.Р. РЕГУЛЯЦИЯ R-ПЕТЕЛЬ, ОПОСРЕДОВАННАЯ ВАФ, В РАННЕМ РАЗВИТИИ И РАКЕ	112
Васягин Е.А. ПОЛУЧЕНИЕ И АНАЛИЗ ХИМЕРНЫХ ВИРУСОПОДОБНЫХ ЧАСТИЦ НА ОСНОВЕ КАПСИДНОГО БЕЛКА БАКТЕРИОФАГА RQ465, НЕСУЩИХ КОНСЕРВАТИВНЫЕ АНТИГЕНЫ ВИРУСА ГРИППА А.....	117
Гербст А.Г. СОЗДАНИЕ ГЕНЕТИЧЕСКИХ КОНСТРУКТОВ ШАПЕРОНИНА GROEL С РАЗНЫМИ ЗАРЯДАМИ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ ЕГО ФОЛДИНГА.....	121
Гурина А.К. ОЦЕНКА ПРОТЕКТОРНОГО ВЛИЯНИЯ СИДНОНИМИНОВ НА РАСТЕНИЯ ГОРОХА В УСЛОВИЯХ ЗАСУХИ.....	126
Касаткина С.И. МОДУЛЯЦИЯ АКТИВНОСТИ СИРОГЕМСИНТАЗЫ MSMEG_2618 КАК СПОСОБ УПРАВЛЕНИЯ ЭНДОГЕННОЙ ФОТОСЕНСИБИЛИЗАЦИЕЙ МИКОБАКТЕРИЙ	131
Лихов А.Р. КОМПЛЕКСНАЯ IN VITRO ОЦЕНКА БИОДЕГРАДАЦИИ И ЦИТОСОВМЕСТИМОСТИ ПОЛИЭФИРНЫХ СОПОЛИМЕРОВ	137
Нестерович В.М. ИССЛЕДОВАНИЕ ПОДХОДОВ К ФОРМИРОВАНИЮ БИЛИПИДНОЙ МЕМБРАНЫ ДЛЯ СОЗДАНИЯ БИОСЕНСОРОВ НА ОСНОВЕ БЕЛКОВЫХ НАНОПОР	142
Самигуллина С.Р. ВЛИЯНИЕ БИОЦИДОВ НА БИОРАЗНООБРАЗИЕ КОРРОЗИОННО-АКТИВНЫХ ПРОКАРИОТ ИЗ НЕФТЯНОГО МЕСТОРОЖДЕНИЯ.....	147
Сахарова С.А. ИССЛЕДОВАНИЕ МЕХАНИЗМОВ АДАПТАЦИИ К ХОЛОДУ У ПСИХРОУСТОЙЧИВЫХ ГРИБОВ <i>LEUCONEUROSPORA PULCHERRIMA</i> И <i>PSYCHROPHILOMYCES ANTARCTICUS</i>	154
Торопов А.Л. ОСОБЕННОСТИ ВОЗРАСТНЫХ ИЗМЕНЕНИЙ ИММУННОЙ СИСТЕМЫ ПРИ САХАРНОМ ДИАБЕТЕ 2 ТИПА В РАЗЛИЧНЫХ ЭТНИЧЕСКИХ ГРУППАХ.....	160

Багаева Дарья Игорьевна

аспирант ФИЦ Биотехнологии РАН 3 года обучения

научная специальность 1.5.4 Биохимия

e-mail: bagaeva115@mail.ru

Научный руководитель

Шлеева Маргарита Олеговна

доктор биологических наук

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

микроорганизмов



«КАРУСЕЛЬНЫЙ» МЕХАНИЗМ МЕТИЛТРАНСФЕРАЗЫ CPmtA ОБЕСПЕЧИВАЕТ СИНТЕЗ ТЕТРАМЕТИЛОВОГО ЭФИРА КОПРОПОРФИРИНА III ПРИ ПЕРЕХОДЕ MYCOBACTERIUM SMEGMATIS В СОСТОЯНИЕ ПОКОЯ

Аннотация. При переходе *Mycobacterium smegmatis* в состояние покоя метилтрансфераза CPmtA обеспечивает синтез тетраметилового эфира копропорфирина III (ТМК). В данной работе с помощью структурно-динамического моделирования раскрыт «карусельный» механизм такого синтеза: фермент катализирует последовательное метилирование четырёх карбоксильных групп, при этом интермедиаты переориентируются, не покидая активного центра. Мутационный анализ (Y184F, S235A) подтверждает ключевую роль Tyr184 и Ser235 в катализе и подвижности субстрата. Кроме того, моделирование показывает, что ТМК, в отличие от копропорфирина III (КП), способен интегрироваться в фосфолипидную мембрану, модулируя её физико-химические свойства, которые, возможно, важны для запуска или поддержания покоя.

Ключевые слова: микобактерии, тетраметильный эфир копропорфирина III, метилтрансферазы, «Карусельный» механизм.

Обнаруженный нами ранее уникальный метаболический путь: метилирование копропорфирина III (КП) с образованием его тетраметилового эфира (ТМК) у *M. smegmatis*, открывает перспективы для понимания адаптации микобактерий к покоящемуся состоянию [1]. В условиях перехода клеток в покой ТМК накапливается в клеточной стенке, при этом синтез данного соединения обеспечивает фермент CPmtA (MSMEG_0614) [2, 3].

Целью данной работы было исследование механизма метилирования КП метилтрансферазой CPmtA и влияния ТМК на свойства липидного бислоя.

Для реализации поставленной цели нами была проведена характеристика реакции метилирования с участием CPmtA. Было показано, что CPmtA проявляет каталитическую активность по отношению к ряду порфириновых субстратов. Она эффективно метилирует копропорфирин III, копропорфирин I, протопорфирин IX и цинксодержащий копропорфирин I, что указывает на ее широкую специфичность.

На начальных этапах реакции CPmtA с КП при низкой конверсии субстрата нами была выявлена задержка (лаг-фаза) в образовании ТМК в течение первых 30 минут, что указывает на протекание реакции через образование промежуточных соединений. Образование моно- и диметилированных интермедиатов КП в первые 80 минут реакции подтверждает ступенчатый характер метилирования. Отсутствие триметильного производного КП в условиях эксперимента наряду с устойчивым накоплением ТМК указывает на то, что скорости последовательных стадий метилирования возрастают.

На основе экспериментальных данных и молекулярно-динамического моделирования предложен «карусельный» механизм последовательного метилирования КП ферментом CPmtA. Ключевая особенность: частично метилированные интермедиаты не покидают активный центр после каждого акта переноса метильной группы, а переориентируются внутри связывающего кармана, последовательно подставляя следующую карбоксильную группу к каталитическому центру.

Неметилированный КП исходно жёстко зафиксирован за счёт водородных связей реактивной карбоксильной группы с Tyr184 и Arg80. Мутация Y184F полностью устраняет эту фиксацию: расстояние донор-акцептор $<6 \text{ \AA}$ наблюдается лишь в 4% времени моделирования (против 19% у дикого типа), что приводит к полной потере активности *in vitro*. После переноса метильной группы нарушается комплементарность белок-лигандного интерфейса, что увеличивает подвижность продукта. Мутация S235A, напротив, ослабляет периферические взаимодействия с другими карбоксилатами, не затрагивая критическую связку Tyr184/Arg80, что увеличивает долю реактивных состояний до 27% и сохраняет активность.

С каждым актом метилирования гидрофобность лиганда возрастает, и вероятность диссоциации лиганда из комплекса уменьшается. При этом вероятность переориентации субстрата внутри кармана увеличивается. Этим объясняется отсутствие экспериментально детектируемого триметильного производного КП. Дополнительно в «карусельном» цикле формируется гидрофобный участок на поверхности белка, что может облегчать взаимодействие CPmtA с мембраной. Таким образом, «карусельный»

механизм обеспечивает высокую эффективность синтеза ТМК, предотвращает потерю интермедиатов и сопряжён с адаптивными изменениями свойств фермента.

Согласно данным моделирования, ТМК (в отличие от неметилированного КП) способен интегрироваться в модельную фосфолипидную мембрану, изменяя её физико-химические характеристики, что, вероятно, важно для перехода клеток в состояние покоя.

Основные выводы:

1. Установлено, что CPmtA является мультисубстратной метилтрансферазой порфиринов. Фермент эффективно метилирует копропорфирин III, копропорфирин I, протопорфирин IX и Zn-копропорфирин I, демонстрируя широкую субстратную специфичность.

2. CPmtA последовательно тетраметирует карбоксильные группы копропорфирина III.

3. Выявлен уникальный «карусельный» механизм метилирования КП: частично метилированные интермедиаты не покидают активный центр, а переориентируются внутри кармана, последовательно подставляя следующую карбоксильную группу.

4. ТМК, в отличие от КП, интегрируется в фосфолипидную мембрану и изменяет её свойства. Это может иметь ключевое значение для адаптации *M. smegmatis* к состоянию покоя, связывая ферментативный синтез с мембранной локализацией конечного продукта.

Литература

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

2. 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.

3. Bagaeva D.I., Demina G.R., Panina I.S. et al. Methyltransferase CPmtA drives dormancy-associated synthesis of coproporphyrin III tetramethyl ether via a "carousel" mechanism in *Mycobacterium smegmatis* // International journal of biological macromolecules. – 2026. – v. 358. – p. 151714.

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 *Mycolicibacterium 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.

3. Bagaeva D.I., Demina G.R., Panina I.S. et al. Methyltransferase CPmtA drives dormancy-associated synthesis of coproporphyrin III tetramethyl ether via a "carousel" mechanism in *Mycobacterium smegmatis* // *International journal of biological macromolecules.* – 2026. – v. 358. – p. 151714.

Тезисы докладов

1. 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.: Сб. тез. / АНО «Иннов. центр Кольцово». — Новосибирск: ИПЦ НГУ. – 2022. – с. 764 (устный доклад).

2. Багаева Д.И., Глигонов И.А., Демина Г.Р., Вострокнутова Г.Н., Капрельянц А.С., Савицкий А.П., Ворожцов Д.С., Шлеева М.О. Накопление свободных порфиринов в покоящихся клетках *Mycolicibacterium smegmatis* приводит к увеличению микровязкости мембран и нарушению функционирования дыхательной цепи // Сборник тезисов 26-ой Пущинской школы-конференции молодых ученых с международным участием «БИОЛОГИЯ – НАУКА XXI ВЕКА». – Пущино: ФИЦ ПНЦБИ РАН. – 2023. – с. 358 (постерный доклад).

3. Багаева Д.И., Демина Г.Р., Шлеева М.О. Гиперэкспрессия метилтрансферазы MSMEG_0614 в *Mycolicibacterium smegmatis* способствует устойчивости к неблагоприятным факторам окружающей среды // Материалы IX Молодежной школы-конференции по молекулярной и клеточной биологии Института цитологии РАН, С.-Петербург, 15–18 октября 2024 г. – СПб.: Астерион, 2024. – с. 332 (устный доклад).

4. Багаева Д.И., Демина Г.Р., Шлеева М.О. Делеция гена MSMEG_0614 и снижение концентрации тетраметилового эфира копропорфирина III в бактериях повышает фоточувствительность покоящихся форм *Mycobacterium*

smegmatis // Биосистемы: организация, поведение, управление: Тезисы докладов 78-й Всероссийской с международным участием школы-конференции молодых ученых (Н. Новгород, 14–18 апреля 2025 г.). Н. Новгород, Университет Лобачевского. – 2025. – с. 293 (постерный доклад).

Bagaeva Daria Igorevna
RESEARCH CENTER OF BIOTECHNOLOGY RAS

**THE "CAROUSEL" MECHANISM OF METHYLTRANSFERASE
CPMTA DRIVES THE SYNTHESIS OF TETRAMETHYL
COPROPORPHYRIN III DURING *MYCOBACTERIUM SMEGMATIS*
TRANSITION TO DORMANCY**

Abstract. Upon *Mycobacterium smegmatis* transition to dormancy, the methyltransferase CPmtA drives the synthesis of tetramethyl coproporphyrin III (TMC). In this work, structural dynamics modeling reveals the "carousel" mechanism underlying this synthesis: the enzyme catalyzes the sequential methylation of four carboxyl groups, with intermediates reorienting within the active center without being released. Mutational analysis (Y184F, S235A) confirms the key role of Tyr184 and Ser235 in catalysis and substrate mobility. Furthermore, modeling shows that TMC, unlike coproporphyrin III (CP), can integrate into a phospholipid membrane, modulating its physicochemical properties, which may be important for the initiation or maintenance of dormancy.

Keywords: mycobacteria, coproporphyrin III tetramethyl ester, methyltransferases, "carousel" mechanism.

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

Володина Вероника Николаевна

аспирант ФИЦ Биотехнологии РАН 3 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



ИССЛЕДОВАНИЕ БЕЛКОВОГО ПРОФИЛЯ И УРОВНЕЙ ПРОВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ ЦИТОКИНОВ В МОЗГЕ МЫШЕЙ NON-SPF ПОСЛЕ ХРОНИЧЕСКОГО ВОЗДЕЙСТВИЯ КУПРИЗОНА

Аннотация. *Купризоновая модель рассеянного склероза широко используется для изучения механизмов демиелинизации и ремиелинизации. Учитывая значимость микробиологического статуса экспериментальных животных, целью работы являлось выявление изменений белковых профилей и уровня экспрессии цитокинов головного мозга мышей линии C57BL/6 с non-SPF-статусом при хронической интоксикации купризоном, а также установление взаимосвязи между изменением белкового профиля, МР-картиной и клиническими проявлениями у животных. Методом двумерного электрофореза (2D-ЭФ) и масс-спектрометрии выявлены изменения белков следующих групп: белки токсического воздействия, митохондриальные белки, белки защиты от окислительного стресса, белки везикулярного транспорта, белки сигнальных путей. Методом РТ-ПЦР установлено, что на 6-й неделе воздействия купризона наблюдается кратковременное увеличение экспрессии провоспалительных цитокинов (Il1b) и хемокинов (Ccl3), тогда как к 12-й неделе происходит резкое подавление экспрессии провоспалительных цитокинов, лимфоцит-ассоциированных цитокинов, хемокинов и генов «домашнего хозяйства», относительно контроля. Полученные данные важны для валидации модели при проведении доклинических исследований нейропротекторных препаратов, а также для понимания механизмов, лежащих в основе токсической демиелинизации.*

Ключевые слова: *купризоновая модель, демиелинизация, протеом, 2D-электрофорез, РТ-ПЦР, цитокины*

Купризон-индуцированная демиелинизация у мышей является одной из наиболее воспроизводимых моделей рассеянного склероза, позволяющей

изучать первичные механизмы повреждения миелина и процессы ремиелинизации без аутоиммунного компонента [2]. В последние годы всё больше данных свидетельствуют о роли общего микробиологического статуса, который отражается также на метаболических и иммунологических особенностях животных, влияет на тяжесть и динамику демиелинизации [1,3]. Однако молекулярные механизмы, лежащие в основе таких различий, остаются недостаточно изученными.

Цель настоящей работы — анализ протеомных и транскрипционных изменений в головном мозге мышей линии C57BL/6 при хроническом введении купризона, а также взаимосвязь данных процессов с МР-картиной и клиническими признаками.

Методы

Исследование выполнено на 12-недельных самках мышей C57BL/6 (non-SPF, n=40). Животные получали корм с добавлением 0,4% купризона в течение 90 дней. Контрольные группы получали стандартный корм. МРТ-исследования проводили с использованием T2w импульсных последовательностей на 1 Т МРТ (Aspect Imaging, Израиль). На 6-й и 12-й неделях проводили эвтаназию с последующим извлечением головного мозга. Для протеомного анализа ткань гомогенизировали, белки разделяли методом двумерного электрофореза по О'Фарреллу в двух модификациях: равновесная изоэлектрофокусировка (ИЭФ) в диапазоне pH 4–10 и неравновесная ИЭФ для детекции щелочных белков (pI>11). Идентификацию белков осуществляли с помощью MALDI-TOF масс-спектрометрии на базе ЦКП ФИЦ Биотехнологии РАН. Для РТ-ПЦР выделяли тотальную РНК из полушарий, мозжечка и продолговатого мозга, синтезировали кДНК и проводили амплификацию с праймерами на гены цитокинов и гены «домашнего хозяйства» *Gapdh*, *Il1b*, *Il6*, *Lta*, *Ccl3*, *Ccl5*, *Cxcl10*, *IFN γ* . Экспрессию нормировали по эндогенному контролю (18S рибосомальная РНК). Статистическую обработку проводили с использованием t-критерия Стьюдента.

Результаты

В МР-картине присутствовали структурные изменения в области гипоталамуса и миндалевидного тела, наблюдаемые только у мышей non-SPF статуса (рис.1). При этом животные демонстрировали, предположительно, стресс-индуцированные судороги.

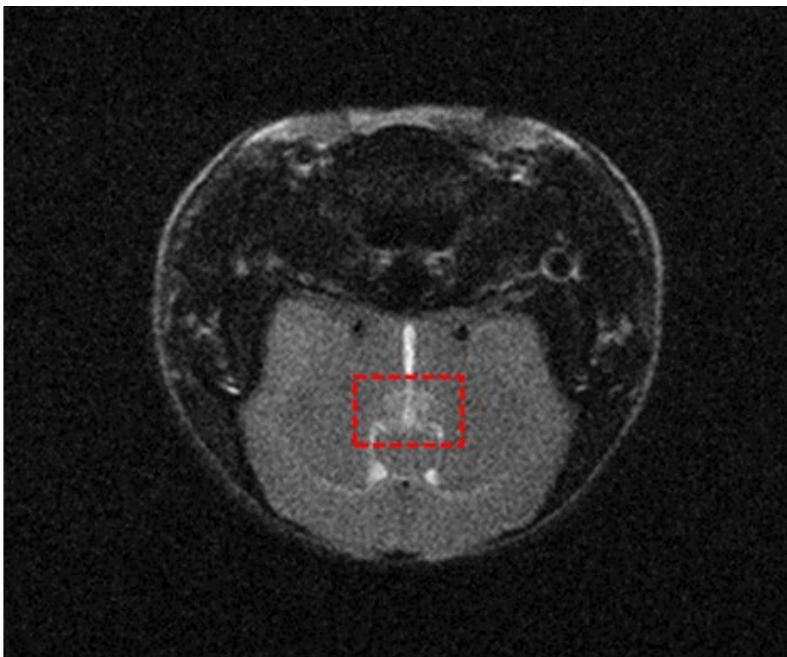


Рис. 1. МР-картина купризон-индуцированной демиелинизации, снимок сделан на режиме T2w. Структурные изменения в области гипоталамуса и миндалевидного тела выделены красным.

Протеомный анализ. При сравнении протеомных профилей контрольных и купризон-обработанных мышей методом 2D-ЭФ выявлены различия в экспрессии 18 белков:

- Полная элиминация тубулина alpha-1C chain (Tuba1c) — ключевого структурного компонента цитоскелета нейронов, ассоциированного с нарушениями нейрогенеза и нейродегенерацией.
- Исчезновение олигомера ферритина (≈ 500 кДа) и значительное снижение синапсинов 1 (изоформы a и b).
- Появление маркеров окислительного стресса и клеточного повреждения: белков теплового шока (HSP70, HSP90), ацетилированного альфа-интернексина, белка регуляции гипоксии (HIG1).
- Фрагменты деградации белков: креатинкиназы В-типа, GFAP, актина, лактатдегидрогеназы В, пируватдегидрогеназы, аденилаткиназы 1.
- Защитная реакция: повышение глутатион-S-трансферазы Mu1 и P1, супероксиддисмутазы, пероксиредоксина-1.
- При неравновесной ИЭФ зафиксировано снижение изоформ основного белка миелина (MBP3 и MBP6/4) на 30–50%, а также снижение митохондриальной аконитазы 2 и субъединицы АТФ-синтазы O.

Соотношение фракций белков с зафиксированными изменениями представлены на рис. 2 и 3.

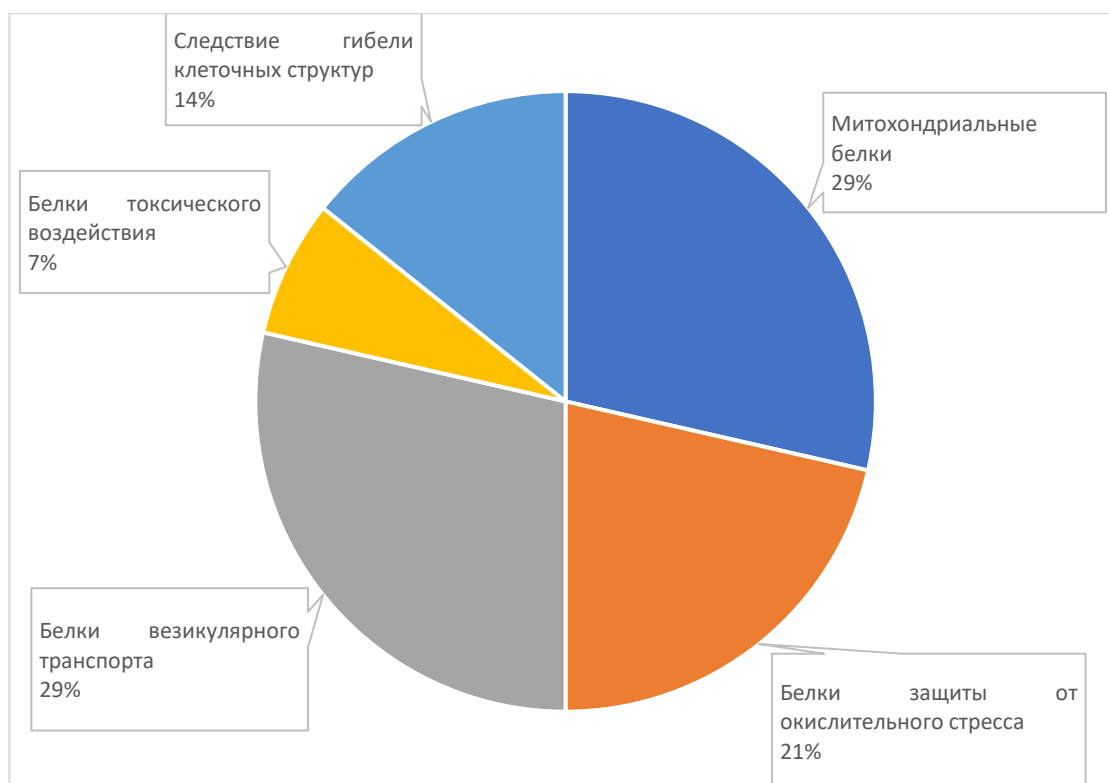


Рис. 2. Анализ спектра белков в равновесном ИЭФ у животных с микробиологическим статусом non-SPF в результате купризон-индуцированной демиелинизации

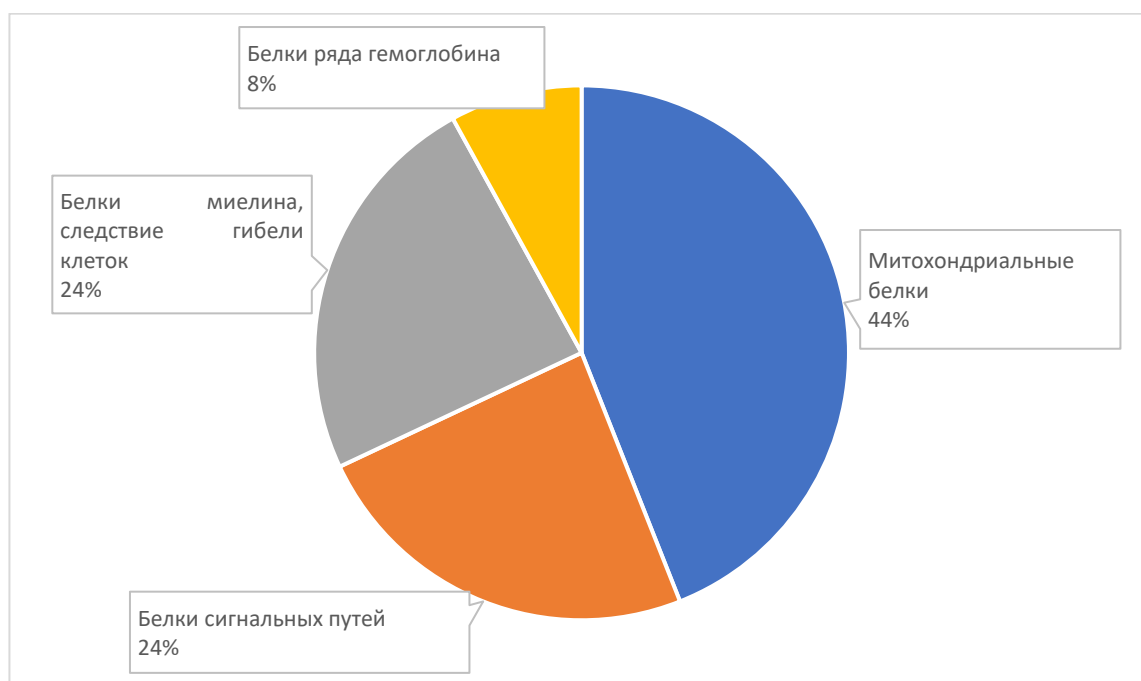
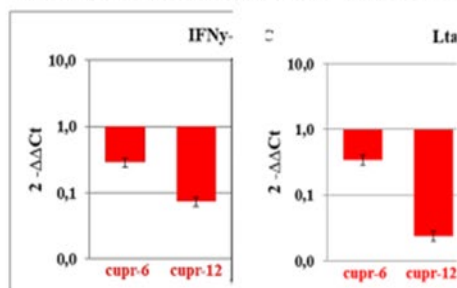


Рис. 3. Анализ спектра белков в неравновесном ИЭФ у животных с микробиологическим статусом non-SPF в результате купризон-индуцированной демиелинизации

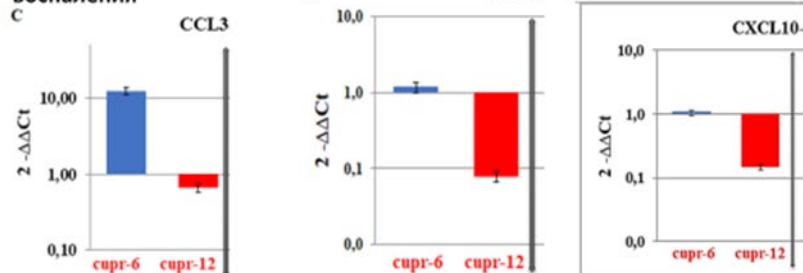
В ходе эксперимента наблюдалось усиление местного иммунного ответа на 6 неделю приема купризона, и подавление периферического ответа иммунной системы на 12-ю неделю приема купризона, что укладывается в системное подавление функций иммунной защиты на фоне хронической интоксикации.

В группе non-SPF выявлено прогрессирующее снижение экспрессии гена *Gapdh*: в 3–4,5 раза к 6-й неделе и в 50 раз к 12-й неделе по сравнению с контролем. Экспрессия *Il1b* на 6-й неделе повысилась в 3–3,5 раза, однако к 12-й неделе снизилась в 5–15 раз. Экспрессия *Lta* снизилась в 2–4,5 раза (6 недель) и в 50 раз (12 недель). Экспрессия *Ccl3* на 6-й неделе возросла в 10–23 раза, а к 12-й неделе снизилась в 1,1–2,3 раза. Экспрессия *IFN γ* снизилась к 6-й неделе в 2,6–5 раз. В сыворотке крови отмечено повышение уровней *IL-1 β* и *IL-17* в 2–5 раз. У мышей SPF динамика была менее выражена: пиковые значения *Il1b* и *Ccl3* не превышали 2–3 кратного увеличения, а к 12-й неделе супрессия генов была менее значительной (снижение не более чем в 10 раз). Данные, полученные при РТ-ПЦР, представлены на рис.4.

Оценка лимфоцит-ассоциированных цитокинов-экспрессируемых инфильтрирующими Т-ЛФЦ



Оценка хемокинов (CCL3, CCL5, CXCL10), продуцирующихся астроцитами, а также микроглией, нейронами и эндотелиальными клетками, играющих роль в привлечении иммунных клеток в очаг воспаления



Оценка провоспалительных цитокинов (IL-1 β , IL-6, TNF), продуцирующихся преимущественно микроглией и астроцитами в различных областях мозга

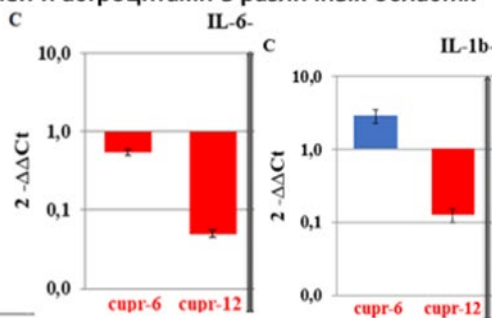


Рис. 4. Изменение экспрессии провоспалительных, лимфоцит-ассоциированных цитокинов, а также хемокинов при купризон-индуцированной демиелинизации у животных статуса non-SPF на 6-ой и 12-ой неделях.

Основные выводы

Хроническое введение купризона вызывает у мышей non-SPF тяжёлые деструктивные изменения протеома головного мозга, включая элиминацию тубулина alpha-1C chain, снижение синапсинов и изоформ MBP, а также активацию маркеров окислительного стресса, что ведет к глубоким структурным изменениям в области гипоталамуса и миндалевидного тела (BSTMV), регистрируемым на МР-картине.

Также данная область интегрирует сигналы от миндалевидного тела в реакцию гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой оси на психологический стресс, а также служит центральным релейным звеном в обеспечении поведенческих и физиологических реакций на стрессорное воздействие, повреждение которой, предположительно, и являлось причиной регистрируемых судорог.

Воспалительный ответ, изученный на мышах статуса non-SPF, носит двухфазный характер: кратковременный всплеск провоспалительных цитокинов (IL-1 β , CCL3) на 6-й неделе сменяется глубокой супрессией экспрессии иммунных генов к 12-й неделе, что согласуется с данными протеома о деградации клеточных структур. Наблюдалось кратковременное спорадическое вовлечение иммунной системы на 6 неделе приема купризона, которое к 12 неделе сменялось слабовыраженной, относительно организма, иммуносупрессией.

Таким образом, в ходе проведенной работы, по предварительным данным, была обнаружена взаимосвязь протеома с клинической картиной и структурными изменениями в головном мозге, происходящими при токсической демиелинизации, детектируемыми с помощью МРТ. Также было подтверждено отсутствие значимого вовлечения в токсическую демиелинизацию иммунного компонента.

Благодарим за оказанную помощь в проведении работы ЦКП ФИЦ Биотехнологии РАН, ведущего научного сотрудника Ковалева Л.И., старшего научного сотрудника лаборатории функциональной геномики Малошенок Л.Г. ИОГЕН РАН.

Литература

1. Berer K. et al. Commensal microbiota and myelin autoantigen cooperate to trigger autoimmune demyelination //Nature. – 2011. – Т. 479. – №. 7374. – С. 538-541.
2. Moldovan N. et al. Altered transition metal homeostasis in the cuprizone model of demyelination //Neurotoxicology. – 2015. – Т. 48. – С. 1-8.

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.

Список публикаций по теме работы

Статьи

1. Volodina V. et al. Vindeburnol Reduces Brain lesions in a Cuprizone-Induced Demyelination Model in C57BL/6 Mice: outcomes from 1T-MRI and MIP Analysis. – 2025. (препринт)

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

3. ХОЛОЭКСПО 2025: XXII Международная конференция по голографии и прикладным оптическим технологиям (Уфа, 8–12 сентября 2025 года): тезисы докладов / Общество с ограниченной ответственностью «Холоэкспо наука и практика». — Москва: Издательство МГТУ им. Н.Э. Баумана, 2025. — с. 336-338

Volodina Veronika Nikolaevna

RESEARCH CENTER OF BIOTECHNOLOGY RAS

ANALYSIS OF PROTEIN PROFILE AND PRO-INFLAMMATORY CYTOKINE LEVELS IN THE BRAIN TISSUE OF NON-SPF MICE AFTER CHRONIC CUPRIZONE TREATMENT

Abstract. The cuprizone model of multiple sclerosis is widely used to study the mechanisms of demyelination and remyelination. Considering the importance of the microbiological status of experimental animals, the aim of this work was to identify changes in protein profiles and cytokine expression levels in the brain of C57BL/6 mice with a non-SPF status during chronic cuprizone intoxication, as well

as to establish the relationship between alterations in the protein profile, MR imaging findings, and clinical manifestations in animals. Using two-dimensional electrophoresis (2D-EF) and mass spectrometry, changes were detected in the following groups of proteins: toxicity-related proteins, mitochondrial proteins, oxidative stress defense proteins, vesicular transport proteins, and signaling pathway proteins. RT-PCR analysis revealed that at week 6 of cuprizone exposure, a transient surge in the expression of the pro-inflammatory cytokine *Il1b* and the chemokine *Cc/3* occurs, whereas by week 12 there is a sharp suppression of the expression of pro-inflammatory cytokines, lymphocyte-associated cytokines, chemokines, and housekeeping genes relative to controls. The obtained data are important for model validation in preclinical studies of neuroprotective agents, as well as for understanding the mechanisms underlying toxic demyelination.

Keywords: cuprizone model, demyelination, proteome, 2D electrophoresis, RT-PCR, cytokines.

Ефремова Анастасия Дмитриевна

аспирант ФИЦ Биотехнологии РАН 3 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



СВОЙСТВА РЕКОМБИНАНТНОЙ 5'-НУКЛЕОТИДАЗЫ ИЗ *LIMOSILACTOBACILLUS REUTERI*

Аннотация. *В настоящей работе проведено определение различных свойств рекомбинантной 5'-нуклеотидазы из пробиотического штамма лактобактерий, а также осуществлён анализ первичной и пространственной структуры исследуемого белка. В ходе эксперимента была изучена температурная стабильность методом дифференциальной сканирующей калориметрии (ДСК), выявлена группа предпочтительных субстратов, проведено измерение ферментативной активности с АМФ при различных условиях, а также разработан метод определения каталитической активности методом ВЭЖХ. Наложение пространственных структур 5'-нуклеотидаз из *Limosilactobacillus reuteri* и других организмов выявило общие консервативные участки, отвечающие за каталитические остатки и координацию металлов.*

Ключевые слова: *5'-нуклеотидаза, *Limosilactobacillus reuteri*, каталитическая активность, АМФ, пробиотики.*

Введение. Фермент 5'-нуклеотидаза (ЕС 3.1.3.5) присутствует во множестве живых организмов, катализируя гидролитическое дефосфорилирование 5'-рибонуклеотидов и 5'-дезоксирибонуклеотидов до соответствующих нуклеозидов и неорганического фосфата [1-3]. В зависимости от источника, 5'-нуклеотидазы характеризуются функциональным разнообразием, различиями в локализации в клетке и молекулярной структуре, а также обладают широкой субстратной специфичностью. Зачастую фермент имеет двухдоменную структуру и требует присутствия двух обычно двухвалентных металлов, однако они отличаются для 5'-нуклеотидаз из различных источников, а также металлы, характерные для нуклеотидаз одного организма, могут ингибировать

активность нуклеотидазы другого. В частности, активность 5'-нуклеотидазы из змеиного (*Vipera lebetina*) яда ингибируется ионами металлов Fe (3+), Cu (2+) и Zn (2+) [4], в то же время 5'-нуклеотидаза *Escherichia coli* в норме содержит ионы цинка и стимулируется добавлением кобальта [5]. Нередки случаи, когда в пределах одного источника существует несколько различных нуклеотидаз, например, мембранных, периплазматических, внутриклеточных и внеклеточных, что указывает на значимость их физиологической роли. Однако, несмотря на своё широкое распространение, важность функций и потенциал в борьбе с различными заболеваниями, существует ограниченное количество работ, посвящённых их изучению [6].

Целью данного исследования является изучение свойств 5'-нуклеотидазы или бифункциональной металлофосфатазы из *L. reuteri* (GenBank: MBU5982646.1) и сравнительный анализ модельной структуры этого фермента с охарактеризованными 5'-нуклеотидазами бактерий.

Основные выводы. В настоящей работе было проведено клонирование полноразмерного варианта гена 5'-нуклеотидазы или бифункциональной металлофосфатазы из *L. reuteri* (GenBank: MBU5982646.1) в плазмиду pET24a в двух вариантах: с последовательностями, кодирующими шесть дополнительных остатков гистидина на N- и C-концах. В связи с тем, что анализ последовательности показал наличие сигнального пептида, дополнительно были получены ещё две аналогичных конструкции без него. Экспрессию рекомбинантного белка проводили в штамме *Escherichia coli* BL21(DE3)pLysS при 20°C, в качестве индуктора добавляли IPTG. В результате были получены все 4 варианта белка в растворимой форме: с гистагами на N- и C-концах и с сигнальным пептидом и без него; наличие 5'-нуклеотидазы подтверждали с помощью MALDI.

Для дальнейшего определения свойств фермента была проведена оптимизация экспрессии и очистки 5'-нуклеотидазы из *Limosilactobacillus reuteri*. В целях оптимизации экспрессии, было проведено несколько экспериментов, различных по температурному режиму и концентрации индуктора, в ходе которых было выяснено, что при повышении температуры индукции до 37°C фермент без сигнальной последовательности терял свою активность, тогда как полученный при 20°C демонстрировал каталитическую активность с АМФ, а увеличение концентрации iPTG с 0,1 mM до 1 mM не привело к повышению уровня экспрессии. Также в рамках оптимизации экспрессии целевого белка в клетках *E. coli* было изучено влияние типа и концентрации добавленных двухвалентных ионов металлов магний и цинка в

концентрации 1 мМ, что незначительно увеличило выход рекомбинантной 5'-нуклеотидазы.

Оптимизация очистки включала в себя метод элюирования белка градиентом от 0% до 100% буфера с имидазолом 500 мМ, в результате чего было выявлено, что часть целевого белка элюируется при содержании в буферном растворе 20 мМ имидазола, а основная часть – при концентрации имидазола 150 мМ. В полученных фракциях целевого продукта были обнаружены примеси; их анализ показал, что происходит частичная деградация белка. Смена штамма-продуцента на *E. coli* NiCo21(DE3) не привела к изменению выхода целевого белка.

С помощью аналитической гель-фильтрации с использованием набора калибровочных белков было проведено определение вторичной структуры, в ходе которой было показано, что вероятно, фермент представляет собой димер общей молекулярной массой 117 кДа, методом дифференциальной сканирующей калориметрии (ДСК) определили температуру плавления – 45,4°C. Спектрофотометрически по свободному фосфату было выявлено, что фермент проявляет активность также с ИМФ, УМФ и ГМФ, однако гидролиз дифосфатов АДФ, УДФ, и ЦДФ 5'-нуклеотидаза из *L. reuteri* не осуществляет. Было проведено измерение ферментативной активности с АМФ фосфатным методом при пяти разных температурах: скорость реакции при 37°C и при 40°C почти не отличается; при 30°C скорость реакции в два раза ниже, чем при 37°C; при 25°C и 50°C 5'-нуклеотидаза почти не проявляет активность. Разработан способ определения каталитической активности методом ВЭЖХ для наиболее предпочтительного субстрата – АМФ. Осуществлен выбор условий разделения АТФ, АМФ и аденозина на данном сорбенте для обращённо-фазовой хроматографии (ОФ ВЭЖХ) Ultisil AQ-C18 Welch (5 мкм). Варьировали состав буферного раствора (аммонийно-ацетатный, фосфатный буферные растворы, рН и концентрацию буферного раствора (5 и 50 мМ), а также изменяли долю элюента (ацетонитрил) в составе подвижной фазы.

Проведено сравнение 5'-нуклеотидазы из *L. reuteri* с 5'-нуклеотидазами из других организмов. Были проанализированы аминокислотные последовательности 5'-нуклеотидаз 25 видов организмов из различных таксономических групп: *Luteococcus japonicus* LSP Lj1 (SJN26923.1), *Planococcus glaciei* (KOF09124.1), *Legionella pneumophila* subsp. *Pneumophila* str. *Philadelphia 1* (4OHF), *Candida albicans* (3C9F.1), *Streptococcus iniae* (WP 003099850.1), *Levilactobacillus brevis* (ARW20960.1), *Limosilactobacillus alvi* (WP 204776085.1), *Limosilactobacillus mucosae* LM1 (AJT50431.1), *Enterocloster bolteae* (WP 323734961.1), *Vibrio cholerae* O1 biovar El Tor str. N16961 (AAF95319.1), *Escherichia coli* (O118), *Corynebacterium glutamicum*

(WP 011896359.1), *Bacillus velezensis* (OBR32521.1), *Nannocystis radiculma* (WP 272003519.1), *Haemophilus influenzae* Rd KW20 (3ZU0), *Salmonella enterica* (AVB07708.1), *Drosophila melanogaster* (4NV0), *Neisseria meningitidis* (6VFS), *Actinomyces* sp. oral taxon 877 str. F0543 (ERH29428.1), *Achromobacter* sp. RTa (KGD92383.1), *Bilophila wadsworthia* (WP 419003424.1), *Lacticaseibacillus paracasei* (BBF73761.1), *Naja atra* (7D0V.1), *Homo sapiens* (4H1S). Выравнивание аминокислотных последовательностей выявило общие консервативные участки, отвечающие за каталитические остатки, включающие два иона металла и диады Asp-His, ответственные за их координацию в активном центре. Анализ модельной структуры целевого белка выявил неупорядоченные участки – аминокислоты 29-47 на N-конце, 645-725 и 737-752 на C-конце. Наложение модельной структуры 5'-нуклеотидазы из *L. reuteri* с разрешёнными структурами 5'-нуклеотидаз из других организмов выявило лучшую сходимость со структурой фермента из *E. coli* (1OI8) (RMSD = 3.141), чем с ферментами из других организмов, не относящихся к лактобактериям, чей RMSD составил от 7.556 до 29.767. Основываясь на сходстве этих двух ферментов как по аминокислотной последовательности, так и по структуре, можно различить домены у 5'-нуклеотидазы из *L. reuteri*, а также предположить, что их функции аналогичны тем же у фермента из *E. coli* (1OI8).

Литература

1. Armenta-Medina, Segovia, Perez-Rueda, Comparative genomics of nucleotide metabolism: a tour to the past of the three cellular domains of life//BMC Genomics, 2014, Comparative genomics of nucleotide metabolism.
2. Zakataeva N.P. Microbial 5'-nucleotidases: their characteristics, roles in cellular metabolism, and possible practical applications//Applied Microbiology and Biotechnology, 2021, T. 105, Microbial 5'-nucleotidases, N 20, C. 7661-7681.
3. KEGG ENZYME: 3.1.3.5. - URL: <https://www.kegg.jp/entry/3.1.3.5> (дата обращения: 11.02.2026).
4. Trummal K, Samel M, Aaspõllu A, Tõnismägi K, Titma T, Subbi J, Siigur J, Siigur E. 5'-Nucleotidase from *Vipera lebetina* venom. Toxicon. 2015 Jan;93:155-63. doi: 10.1016/j.toxicon.2014.11.234.
5. McMillen L, Beacham IR, Burns DM. Cobalt activation of *Escherichia coli* 5'-nucleotidase is due to zinc ion displacement at only one of two metal-ion-binding sites. Biochem J. 2003 Jun 1;372(Pt 2):625-30. doi: 10.1042/BJ20021800.
6. 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 *Lacticaseibacillus*

rhamnosus f and multidrug resistant strain of *Klebsiella pneumonia*, Int. J. Mol. Sci. 22 (2021) 10999.

Список публикаций по теме работы

Статьи

1. A. V. Chernobrovkina, A.V. Gorbovskaia, N.Yu. Chikurova, E.K. Les, A.D. Efremova, E.S. Chichkanova, O.A. Shpigun, V.I. Tishkov, A.A. Pometun, “Development of hydrophilic interaction liquid chromatography method for determining enzymatic activity of cysteine synthase A,” *J. Chromatogr. A*, vol. 1766, p. 466-540, Jan. 2026, doi: 10.1016/j.chroma.2025.466540.

Тезисы докладов

1. А. Д. Ефремова, А. А. Логинова, Н. Н. Мордкович, Н. А. Огорокова, А. Н. Антипов, В. И. Тишков, А. А. Пометун, «ПОЛУЧЕНИЕ И ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА НУКЛЕОТИДАЗЫ ИЗ *LIMOSILACTOBACILLUS REUTERI*» // Сборник тезисов XII международной конференции молодых учёных OpenBio, с. 152-153, 2025, DOI: 10.25205/978-5-4437-1843-9-77

Efremova Anastasia

RESEARCH CENTER OF BIOTECHNOLOGY RAS

FEATURES OF RECOMBINANT 5'-NUCLEOTIDASE FROM *LIMOSILACTOBACILLUS REUTERI*

Abstract. In this study, various properties of recombinant 5'-nucleotidase from a probiotic strain of *Lactobacillus* were determined, and the primary and spatial structures of the protein under study were analyzed. During the experiment, thermal stability was studied using differential scanning calorimetry (DSC), a group of preferred substrates was identified, enzymatic activity with AMP was measured under various conditions, and a method for determining catalytic activity using HPLC was developed. Alignment of the three-dimensional structures of 5'-nucleotidases from *Limosilactobacillus reuteri* and other organisms revealed common conserved regions responsible for catalytic residues and metal coordination.

Keywords: 5'-nucleotidase, *Limosilactobacillus reuteri*, catalytic activity, AMP, probiotics.

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

Зайцев Пётр Евгеньевич

аспирант ФИЦ Биотехнологии РАН 3 года обучения

научная специальность 1.5.4 Биохимия

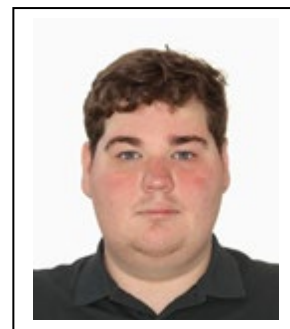
e-mail: pez2000@yandex.ru

Научный руководитель

Жердева Виктория Вячеславовна

кандидат биологических наук, с.н.с

Заведующая лабораторией молекулярного имиджинга



ОЦЕНКА БИОСОВМЕСТИМОСТИ И БИОИНТЕГРАЦИИ ПОРИСТЫХ УГЛЕРОД-УГЛЕРОДНЫХ КОМПОЗИТНЫХ МАТЕРИАЛОВ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МРТ

Аннотация. *Оценка биосовместимости и биоинтеграции композитных имплантируемых материалов необходимо для общей биологической оценки имплантируемых материалов биомедицинского назначения на этапе их доклинических испытаний.*

Целью работы было оценить колонизацию и пролиферацию эукариотических клеток на исследуемых углерод-углеродных композитных материалах с пористой структурой (С-С скаффолдах), контрастируемых парамагнитными агентами (сукцинат марганца) и суперпарамагнитными (наночастицы оксида железа Fe_2O_3), для их визуализации в магнитно-резонансной томографии (МРТ).

Эксперименты in vitro проводили на клеточных линиях A9 (фибробластоподобная клеточная линия) и C2C12 (иммortalизованная клеточная линия миобластов мыши). Цитотоксичность С-С скаффолдов оценивали на мышинных клеточных линиях (фибробластоподобные и миобластоподобные). Клетки инкубировали с наночастицами магнетита и марганца для последующей визуализации на МРТ при адгезионном культивировании и при ротационном перемешивании в присутствии С-С скаффолдов.

Показано, что углерод-углеродные композиты не проявляют признаков цитотоксичности. Биоинтеграция клеток в С-С скаффолды успешно проходит в условиях ротационного культивирования. Контрастирование клеток сукцинатом марганца и суперпарамагнитными наночастицами Fe_2O_3 подтверждается при МРТ-исследовании.

Ключевые слова: *углерод–углеродные композиты, имплантация, МРТ, биоинтеграция, культивирование клеток, цитотоксичность, контрастные частицы.*

Введение

Ключевым свойством имплантируемых материалов выступает их биосовместимость, то есть способность поддерживать миграцию и пролиферацию клеток на его внутренней поверхности. Особое значение колонизация скаффолда приобретает при имплантации таких конструкций в организм для целей реконструктивной хирургии, а также ортопедии, стоматологии.

Биологическая оценка имплантируемых материалов включает множество требований, в том числе прямой и опосредованный контакт изделий и материалов с организмом (в том числе тканями и клетками) *in vitro* и *in vivo* [1].

Одним из способов оценки биологического действия имплантируемых материалов медицинского назначения является оценка жизнеспособности клеток в тестах на цитотоксичность и биосовместимость. Для этого используются МТТ-тест, тесты с использованием флуоресцентных красителей или тесты, основанные на способности клеток метаболизировать вещества [2,3].

Работа включала несколько этапов: культивирование эукариотических клеток с изучаемыми С-С композитами и последующее внедрение в эти клетки контрастных препаратов для визуализации в МРТ.

Методы

Образцы С-С трехмерных композитов были предоставлены МВТУ им. Баумана (ООО «НТМ+», Всеволожск, Россия). Эксперименты *in vitro* проводили на клеточных линиях А9 (фибробластоподобная клеточная линия) и С2С12 (иммортилизованная клеточная линия миобластов мыши) (Российская клеточная коллекция, Институт цитологии РАН, г. С-Петербург, Россия). Клетки выращивали в соответствии с требуемыми параметрами. Продукты деградации материала оценивали на цитотоксичность при не прямом контакте с композитами: суспензии клеток высевали в 6-луночные планшеты (200 тыс. клеток/лунку), через 16–18 часов добавляли стерилизованные скаффолды в полиэтиленовых вставках (SPL, Корея), культивировали 3 суток, анализировали на инвертированном микроскопе и оценивали методом МТТ.

Для мечения клеток проводили инкубацию с Fe_2O_3 в концентрациях 50–300 мкг/мл, инкубировали 24 ч, далее клеточную суспензию исследовали на МРТ. Также проводили культивирование с парамагнитным агентом сукцинатом марганца, который добавляли к клеткам Mn-сукцината в концентрациях 10^{-9} и 10^{-12} моль/л. Меченные контрастными агентами клетки

высаживали на пористые скаффолды при ротационном перемешивании и повторно проверяли жизнеспособность культуры методом МТТ и анализировали в МРТ с использованием импульсных последовательностей T1w (TR/TE 60/15 FA 50 - для сукцината марганца) и T2w (TR/TE 2000/76 FA 50 - для оксида железа), сравнивая с контрольными образцами, не содержащими меток.

Результаты

Через 3 дня выявлено статистически значимое снижение жизнеспособных клеток по сравнению с контролем, что, предположительно, указывает на возможное загрязнение скаффолдов органикой по результатам ранее опубликованных результатов [4]. При этом с 4-ого дня популяция восстанавливалась, а к 7 дню и позднее жизнеспособность клеток не отличалась от контроля; к 15-ому дню выживаемость составила 78–94%. В целом, при 15-дневном культивировании композитов С-С с клетками цитотоксичность не продемонстрирована (Рис.1,2).

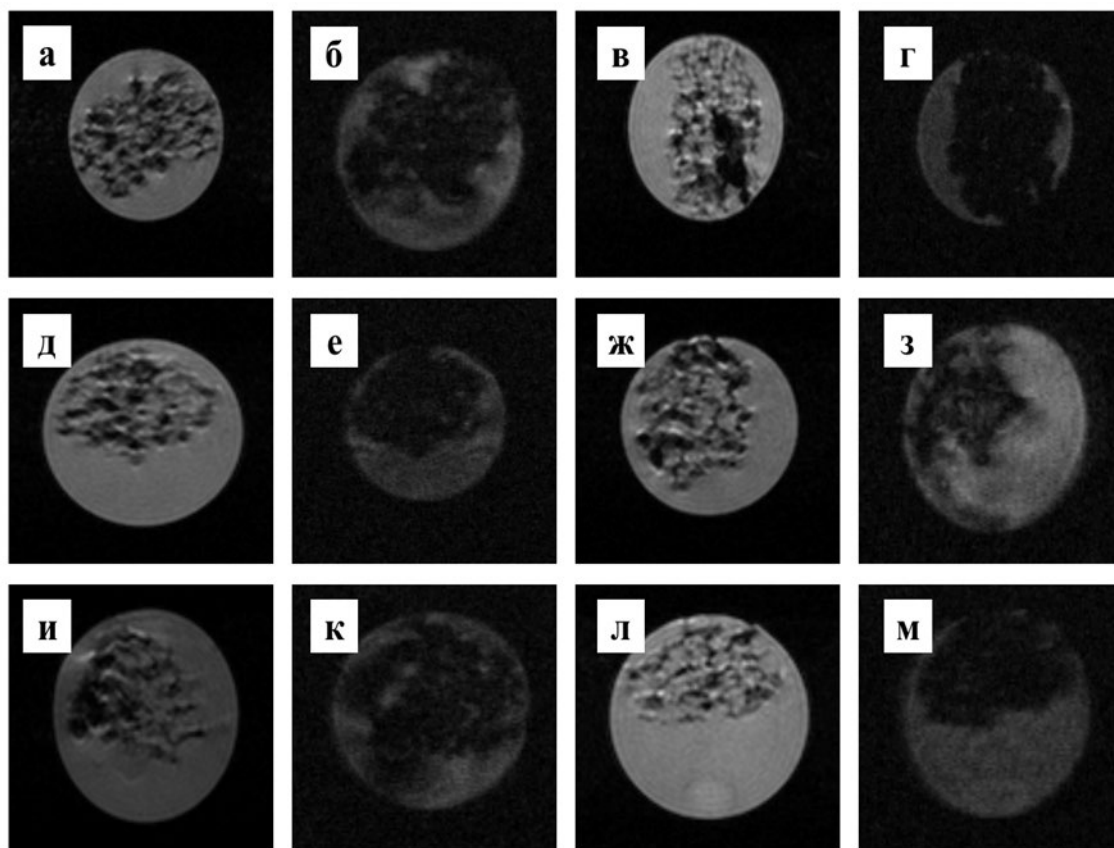


Рис. 1. МРТ изображения образцов: а — скаффолд с добавлением раствора сукцината марганца без клеток T2w-изображение; б — скаффолд с добавлением раствора сукцината марганца без клеток T1w-изображение; в — скаффолд в питательной среде DMEM без добавления сукцината марганца T2w-изображение; г — скаффолд в питательной среде DMEM без добавления сукцината марганца T1w-изображение; д — скаффолд,

инкубированный с линией C2C12 на качалке T2w-изображение; е — скаффолд, инкубированный с линией C2C12 на качалке T1w-изображение; ж — скаффолд, инкубированный с линией C2C12 на 6-луночном планшете T2w-изображение; з — скаффолд, инкубированный с линией C2C12 на 6-луночном планшете T1w-изображение; и — скаффолд, инкубированный с линией A9 на 6-луночном планшете T2w-изображение; к — скаффолд, инкубированный с линией A9 на 6-луночном планшете T1w-изображение; л — скаффолд, инкубированный с линией A9 на качалке T2w-изображение; м — скаффолд, инкубированный с линией A9 на качалке T1w-изображение.

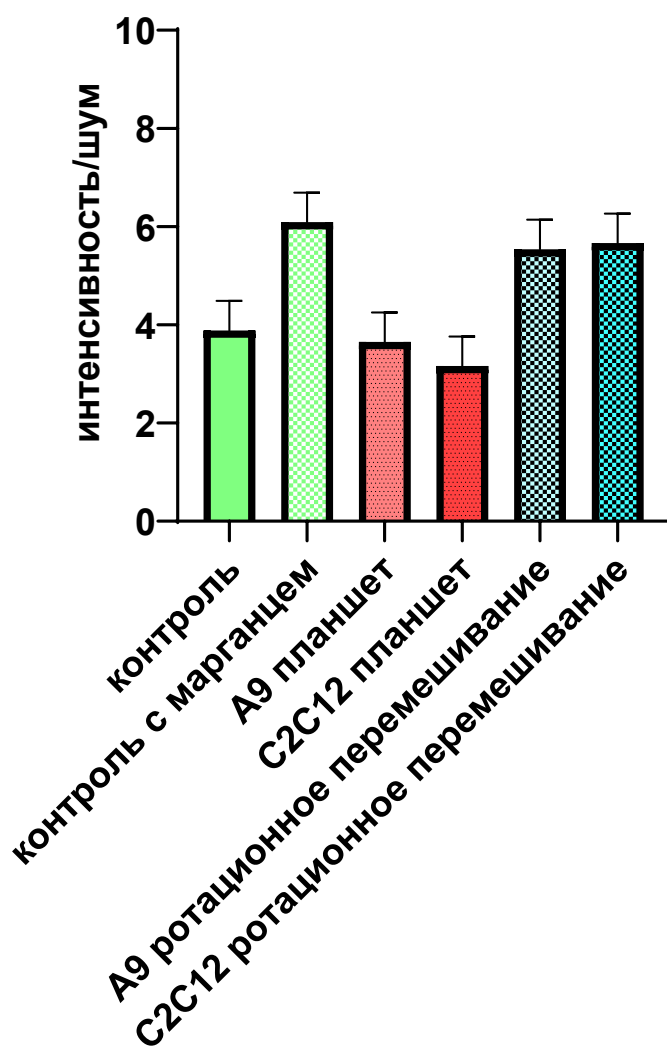


Рис. 2. Интенсивность образцов в режиме T1w (TR/TE 60/15 FA 50) при различных способах инкубирования скаффолдов с клеточными линиями

При МРТ-оценке контрастирования скаффолдов при заселении их клетками с наночастицами оксида железа (суперпарамагнетик, дает гипоинтенсивный сигнал) оптимальной была определена концентрация 50 мкг/мл наночастиц: в ней достигнута наибольшая интеграция в клетки при наименьшей токсичности (Рис.3). При сравнении двух способов инкубации по

результатам МРТ исследования и в тестах на жизнеспособность было показано, что клетки эффективно заселяют скаффолды только при ротационном заселении.

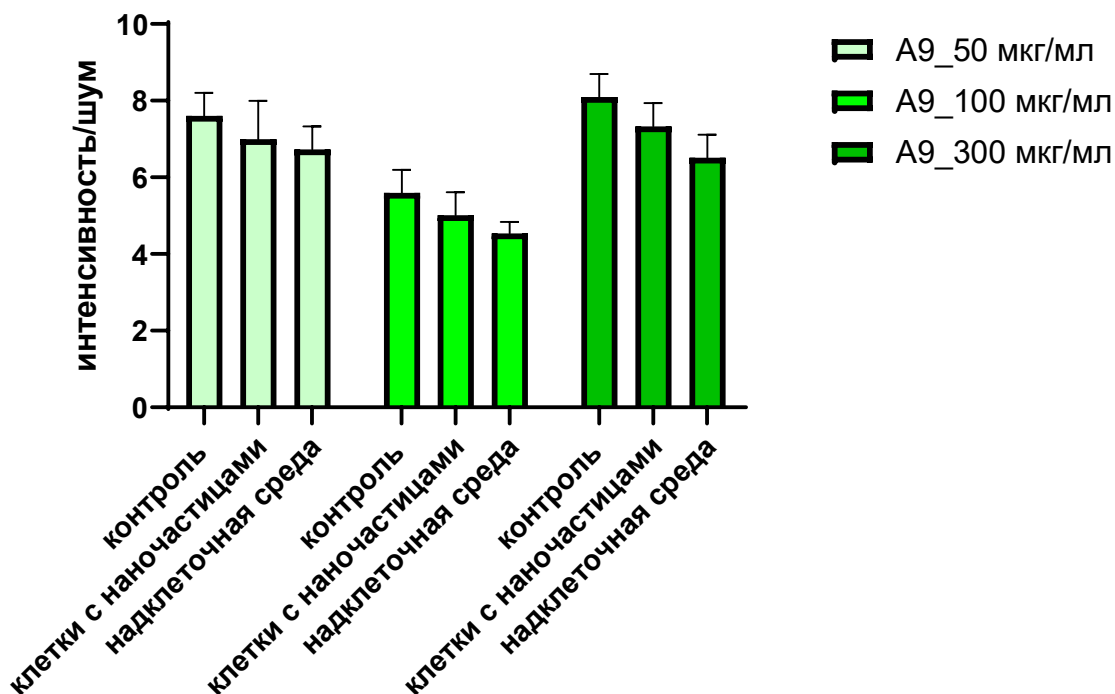


Рис. 3. Интенсивность образцов в режиме T2w (TR/TE 2000/76 FA 50) при концентрациях наночастиц оксида железа 50, 100 и 300 мкг/мл.

Основные выводы

Возможность успешной биоинтеграции клеток в С-С скаффолды была продемонстрирована с помощью МРТ: сукцинат марганца и наночастицы Fe_2O_3 , добавляемые в культуральную среду, включались в клетки, а заселение скаффолда клетками при ротационном перемешивании подтверждалось усилением сигнала в режиме T1w и независимыми МТТ-тестами.

Заселение клетками скаффолдов успешно проходит в условиях ротационного культивирования. При этом не продемонстрировано признаков цитотоксичности продуктов, высвобождающихся при длительном совместном культивировании С-С скаффолдов на основе С-С композитных материалов с клетками. Контрастирование клеток сукцинатом марганца и суперпарамагнитными наночастицами Fe_2O_3 подтверждается при МРТ-исследовании.

Литература

1. ГОСТ ISO 10993-1-2021. Изделия медицинские. Оценка биологического действия медицинских изделий. Часть 1. Оценка и исследования в процессе менеджмента риска. – Введ. 2022–03–01. – Москва: Стандартинформ, 2021. – 44 с.
2. Chetyrkina M. R., Fedorov F. S., Nasibulin A. G. In vitro toxicity of carbon nanotubes: a systematic review //RSC advances. – 2022. – Т. 12. – №. 25. – С. 16235-16256.
3. Rhazouani A. et al. Synthesis and toxicity of graphene oxide nanoparticles: A literature review of in vitro and in vivo studies //BioMed Research International. – 2021. – Т. 2021. – №. 1. – С. 5518999.
4. Zherdeva V. V. et al. Towards MRI Study of Biointegration of Carbon-Carbon Composites with Ca-P Coatings //Nanomaterials. – 2025. – Т. 15. – №. 7. – С. 492.

Список публикаций по теме работы

Статьи

1. Zherdeva V. V. et al. Towards MRI Study of Biointegration of Carbon-Carbon Composites with Ca-P Coatings //Nanomaterials. – 2025. – Т. 15. – №. 7. – С. 492.
2. Nastulyavichus A. A. et al. Noninvasive method of monitoring wound healing processes stimulated by copper nanoparticles //Bulletin of the Lebedev Physics Institute. – 2025. – Т. 52. – №. Suppl 10. – С. S1002-S1009.

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)
2. ХОЛОЭКСПО 2025: XXII Международная конференция по голографии и прикладным оптическим технологиям (Уфа, 8-12 сентября 2025 года): тезисы докладов / Общество с ограниченной ответственностью «Холоэкспо наука и практика». — Москва: Издательство МГТУ им. Н.Э. Баумана, 2025. с. 329-331 (постерный доклад)

Zaitsev Petr Evgenievich
RESEARCH CENTER OF BIOTECHNOLOGY RAS

ASSESSMENT OF BIOCOMPATIBILITY AND BIOINTEGRATION OF POROUS CARBON-CARBON COMPOSITE MATERIALS USING MRI

Abstract. The assessment of biocompatibility and biointegration of composite implantable materials is essential for the overall biological evaluation of biomedical implants during preclinical testing.

The aim of this study was to evaluate the colonization and proliferation of eukaryotic cells on porous carbon-carbon composite materials (C-C scaffolds) labeled with paramagnetic agents (manganese succinate) and superparamagnetic agents (iron oxide nanoparticles, Fe_2O_3) for their visualization via magnetic resonance imaging (MRI).

In vitro experiments were conducted using two cell lines: A9 (fibroblast like cells) and C2C12 (immortalized mouse myoblasts). The cytotoxicity of C-C scaffolds was assessed using murine fibroblast like and myoblast like cell lines. Cells were incubated with magnetite nanoparticles and manganese succinate for subsequent MRI visualization under adhesive culture conditions and during rotational mixing in the presence of C-C scaffolds.

The results demonstrated that carbon-carbon composites exhibit no signs of cytotoxicity. Successful cell biointegration into C-C scaffolds were achieved under rotational culture conditions. The contrast enhancement of cells using manganese succinate and superparamagnetic iron oxide nanoparticles (Fe_2O_3) was confirmed by MRI.

Keywords: carbon-carbon composites, implantation, MRI, biointegration, cell culture, cytotoxicity, contrast agents.

Игнатенко Александр Викторович

аспирант ФИЦ Биотехнологии РАН 3 года обучения

научная специальность 1.5.11 Микробиология

E-mail: ignatenko5aiav@gmail.com

Научный руководитель

Хижняк Татьяна Владимировна

доктор биологических наук,

зав. лаб. экологии и геохимической деятельности

микроорганизмов, главный научный сотрудник



ВОССТАНОВЛЕНИЕ ХРОМАТА НОВЫМИ ГАЛОАЛКАЛОФИЛЬНЫМИ БАКТЕРИЯМИ

Аннотация. В данной работе представлены результаты исследования новых штаммов бактерий хроматредукторов, выделенных из осадков соленых щелочных озер Кулундинской степи (Алтайский Край, Россия). Завершено описание нового представителя рода *Salisediminibacterium* способного эффективно восстанавливать хромат в анаэробных условиях *Salisediminibacterium chromatireducens* sp. nov. Для выделенного в 2025 году представителя нового рода семейства *Bacillaceae* эффективного хроматредуктора штамм CrAc4 получены данные по его основным экофизиологическим параметрам роста (рН, соленость, температура). Проведены исследования процессов хроматредукции в проточных и отливно-доливных биореакторах с использованием обоих штаммов при культивировании их чистых культур и в бинарном сообществе.

Ключевые слова: хроматредукторы, галоалкалофилы, очистка сточных вод, биотехнологии, биореакторы.

Хром широко используется в машиностроении при производстве сплавов, антикоррозионных покрытий, а так же в широком спектре различных химических производств. Активное использование соединений хрома ведет к образованию большого количества отходов [1]. Главную опасность представляет преобладающий в отходах Cr(VI) который обладает мутагенным и канцерогенным действием на живые организмы [2]. Жидкие отходы можно очистить химическими, электрохимическими и сорбционными методами, но зачастую они нерентабельны при низких концентрациях Cr(VI) [3]. Биологическое восстановление токсичного растворимого Cr(VI)

галоалкалофильными бактериями в щелочных условиях с осаждением в форме $\text{Cr}(\text{OH})_3$ может оказаться новым эффективным способом очистки.

В 2023 г. из образца смешанных донных осадков содовых озер Кулундинской степи (Алтайский Край, Россия) нами был выделен штамм MB1000 [4]. В ходе исследований было определено его филогенетическое положение и проведены необходимые для валидного описания исследования его морфологии, физиологии и биохимии. На основе полученных данных подготовлена к публикации статья с описанием его в качестве нового вида *Salisediminibacterium chromatireducens* sp. nov.

Из отобранных летом 2024 г. в ходе экспедиции осадков карбонатных и хлоридных соленых озер Кулундинской степи нами был выделен еще один эффективный хроматредуктор получивший обозначение CrAc4. Результаты секвенирования гена 16S рРНК показали, что данный представитель семейства *Bacillaceae* вероятно образует отдельную филогенетическую ветку на уровне рода. Сходство нуклеотидной последовательности с ближайшими описанными видами *Salipaludibacillus aurantiacus* и *Salipaludibacillus agaradhaerens* составляет соответственно 97,6% и 96,8%. Результаты исследований основных экофизиологических параметров показывают, что штамм CrAc4 является умеренным галофилом (оптимумом роста 0,5 М Na^+), алкалофилом (оптимум по pH 9.3), мезофилом (оптимум 35 °C). Способен аэробно расти на дрожжевом экстракте. В анаэробных условиях эффективно растет и восстанавливает Cr(VI) используя дрожжевой экстракт в качестве донора электронов. В сравнении с *S. chromatireducens* MB1000 при культивировании в схожих условиях имеет более высокие скорости роста и способен накапливать большую биомассу. При совместном культивировании обоих штаммов в аэробных условиях в присутствии Cr(VI) в качестве акцептора и лактата в качестве донора электронов образуется устойчивое бинарное сообщество с соотношением 1 к 10 между штаммом MB1000 и CrAc4. Скорость восстановления Cr(VI) в бинарной культуре в 2-4 раза выше, чем при культивировании штамма MB1000 в чистой культуре.

Опираясь на предыдущие эксперименты по масштабированию процесса хроматредукции в лабораторных биореакторах с использованием штамма *S. chromatireducens* MB1000 [5], была разработана схема биореакторной установки, отработаны основные режимы работы в проточном и отливно-доливном автоматизированном режиме (рис. 1). Проведены исследования культивирования штамма *S. chromatireducens* MB1000 в отливно-доливном режиме в колбах объемом 800 мл с заменой раз в сутки 25% объема среды на свежую с конечной концентрацией 20 мг Cr(VI)/л. Время работы составило 20 сут. За время работы культура восстановила 488 мг Cr(VI). Средняя скорость

восстановления составила 1.24 мг Cr(VI)/л*час. Показана возможность отделения культуральной жидкости от осадка путем низкоскоростного центрифугирования или с помощью седиментационной колонны до 1 м высотой.

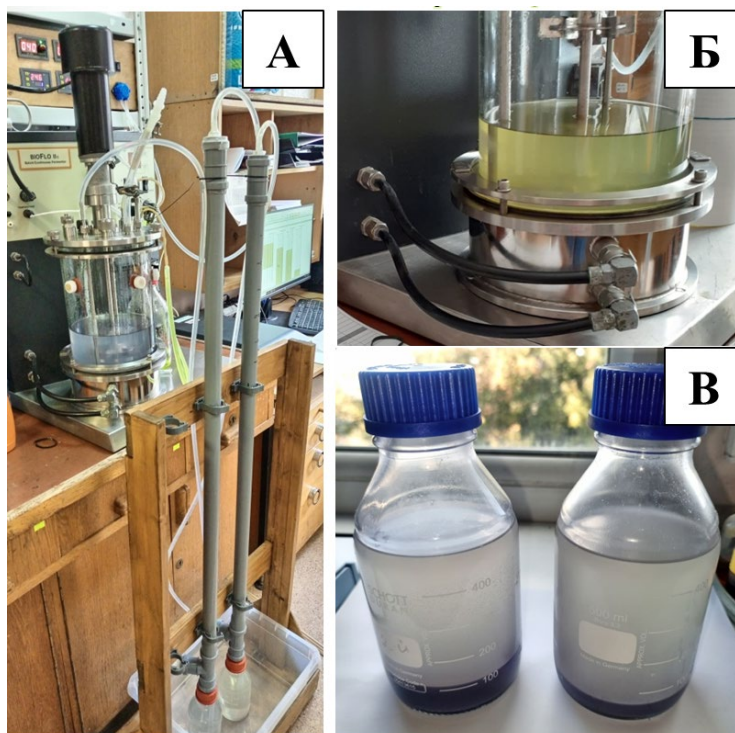


Рис. 1. Хроматоочищающая лабораторная установка. А – общий вид; Б – зона биореактора; В – осадок $\text{Cr}(\text{OH})_3$, накопленный в колонных седиментации.

Основные выводы:

За отчетный период завершено описание штамма MB1000. Подготовлена к публикации статья с описанием его в качестве нового вида *Salisediminibacterium chromatireducens* sp. nov. Проведены работы по определению основных экофизиологических параметров роста для нового штамма хроматвосстанавливающих бактерий CrAc4. Проведены первые исследования по культивированию чистой культуры *S. chromatireducens* MB1000 в лабораторной биореакторной установке по очистке модельных щелочных растворов от токсичного хромата в проточных и отливно-доливных условиях.

Литература

1. Водяницкий Ю.Н. Тяжелые и сверхтяжелые металлы и металлоиды в загрязненных почвах // 2009. М.: ГНУ Почвенный институт им. В.В. Докучаева Россельхозакадемии.

2. Pushkar B., Sevak P., Parab S., Nilkanth N. Chromium pollution and its bioremediation mechanisms in bacteria: A review // Journal of Environmental Management. 2021. V. 287. 112279

3. Barrera-Diaz C.E., Lugo-Lugo V., Bilyeu B. A review of chemical, electrochemical and biological methods for aqueous Cr(VI) reduction // Journal of Hazardous Materials. 2012. V. 223-224. P. 1-12.

4. 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.

5. 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.

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).

3. Игнатенко А.В., Хижняк Т.В. Восстановление Cr(VI) новыми галоалкалофильными штаммами. От пробирки до лабораторной установки. 5-й Российский микробиологический конгресс (устный доклад).

Ignatenko Alexandr Victorovich
RESEARCH CENTER OF BIOTECHNOLOGY RAS

**CHROMATE-REDUCING PROCESS BY NEW
HALOALKALOPHILIC BACTERIA**

Abstract. This paper presents the results of a study of new strains of chromate-reducing bacteria isolated from the sediments of saline alkaline lakes of the Kulunda Steppe (Altai Territory, Russia). The description of a new representative of the genus *Salisediminibacterium* capable of effectively reducing chromate under anaerobic conditions *Salisediminibacterium chromatireducens* sp. nov. has been completed. New data of main ecophysiological growth parameters (pH, salinity, temperature) were obtained for the effective chromate-reducing strain CrAc4 (new genus from the *Bacillaceae* family isolated in 2025). Chromate-reducing processes in continuous and batch culture bioreactors have been studied using both strains in pure cultures and in a binary community.

Keywords: chromatireductors, haloalkalophiles, wastewater treatment, biotechnologies, bioreactors.

Клюшин Георгий Сергеевич

аспирант ФИЦ Биотехнологии РАН 3 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



ЭКСТРЕМОФИЛЬНЫЕ МИКРОБНЫЕ СООБЩЕСТВА КАК ИСТОЧНИКИ НОВЫХ ГЛУБОКИХ ФИЛОГЕНЕТИЧЕСКИХ ЛИНИЙ ЭЛЕКТРОАКТИВНЫХ ПРОКАРИОТ И БАЗА ДЛЯ СОЗДАНИЯ АВТОНОМНЫХ ИСТОЧНИКОВ ТОКА

Аннотация. *Новые перспективы в электромикробиологии открываются при изучении состава и электрокаталитических свойств микробных сообществ экстремальных местообитаний. В данном исследовании были определены электрокаталитические свойства и состав прокариотных сообществ холодной экосистемы донных осадков прибрежной зоны Белого моря и горячей экосистемы осадков горячего источника Солнечный (Камчатка). Удельная сила и мощность тока осадочного МТЭ Белого моря достигали 384 мА/м² и 25 мВт/м², а те же величины для осадочного МТЭ горячего источника в максимуме составили 54 мА/м² (ток короткого замыкания) и 6,47 мВт/м². На электродах обоих осадочных МТЭ в процессе их работы накопились прокариоты, способные к внеклеточному переносу электронов, в том числе, представители некультивируемых таксонов рода *Ca. Tenderia* из холодных морских осадков и филума *CALINM01* из осадка горячего источника.*

Ключевые слова: *осадочные МТЭ, экстремофилы, электрогены, электротрофы, психрофилы, термофилы.*

Электроактивные микроорганизмы (электрогены и электротрофы) используются в различных типах биоэлектрохимических систем, которые могут служить источниками непрерывного электрического питания различных автономных устройств. Ключевым типом таких биоэлектрохимических систем являются осадочные микробные топливные элементы (МТЭ). Принцип работы осадочных МТЭ заключается в том, что микроорганизмы-электрогены окисляют органические или неорганические доноры электронов и передают электроны на поверхность анода, от которого

под действием разности потенциалов электроны движутся на катод, где их потребляют электротрофные прокариоты и передают на конечный наиболее высокопотенциальный акцептор (O_2 , CO_2 , NO_3^- и др.) [1].

Большинство электромикробиологических исследований по осадочным МТЭ посвящено изучению мезофильных микробных сообществ осадочных отложений умеренных и субтропических широт. Однако в последнее время растет интерес к исследованиям электрокаталитических свойств микробных сообществ экстремальных экотопов, прежде всего, связанных с температурными экстремумами - холодные и горячие местообитания. Обусловлен данный тренд расширением физико-химических границ использования осадочных МТЭ, сравнением силы и мощности тока, генерируемого осадочными МТЭ холодных, умеренных и горячих экосистем, а также возможностью накопления и выделения новых экстремофильных электроактивных прокариот, многие из которых относятся к некультивируемым филогенетическим линиям различного таксономического ранга [2].

Целью данного исследования было изучение состава электроактивных микробных сообществ холодной и горячей экосистем и сравнение их электрокаталитических характеристик с помощью осадочных МТЭ.

В качестве холодной экосистемы были выбраны донные осадки прибрежной зоны Кандалакшского залива Белого моря. Данная экосистема по своим физико-химическим параметрам являлась классической для установки осадочного МТЭ, так как сочетала анаэробную зону в донных осадках и аэробную зону придонной морской воды. В анаэробной зоне находился анод, в аэробной - катод.

Для оценки уровня максимально возможного по силе и мощности электрического тока, который способен генерироваться в данной экосистеме, электрическая цепь осадочного МТЭ была замкнута накоротко (с минимальным сопротивлением до 5 Ом). Электрохимические условия экосистемы (насыщенная растворимым кислородом аэробная зона и сильно восстановленная анаэробная зона осадка) позволяли сохранять разность потенциалов при сильных токах и минимальном сопротивлении. За 23 дня мониторинга электрокаталитических характеристик микробного сообщества максимальные удельные сила тока и мощность достигли 384 mA/m^2 и 25 mWt/m^2 соответственно.

После проведения измерений осадочный МТЭ на Белом море полгода продолжал находиться в режиме замкнутой электрической цепи с минимальным сопротивлением, затем была определена структура микробных сообществ морского грунта, анода и катода. Было установлено, что среди

доминантов (доля в сообществе $>1\%$) в прокариотном сообществе анода произошло накопление типичных электроактивных бактерий *Ca. Tenderia* (некультивируемые) и *Geopsychrobacter*, а также увеличение доли таксонов *Thiomicrothabdis*, *Thiomicrospiraceae*, *Desulfuromusa*, *Psychromonas* и *Cyclobacteriaceae*, многие представители которых обладают способностью к внеклеточному переносу электронов (ВПЭ). На катоде по сравнению с грунтом сильно увеличилась доля родов *Pseudomonas* и *Woeseia*, некоторые представители которых также обладают механизмами ВПЭ и описаны как электротрофы.

Горячая экосистема была представлена осадочными отложениями горячего источника Солнечный кальдеры вулкана Узон (Камчатка). По своим физико-химическим условиям данная экосистема отличалась от классической электромикробиологической, так как состояла из 2-х анаэробных зон, различающихся по окислительно-восстановительному потенциалу, который определялся формой нахождения железа в осадке и в воде над ним. В осадке железо было растворимым и восстановленным, а в воде окисленным нерастворимым. В такой экосистеме для сохранения разности потенциалов между анодом и катодом электрическую цепь осадочного МТЭ замыкали с внешним сопротивлением на 10 кОм. Для изучения электрокаталитических характеристик микробного сообщества был сконструирован многоуровневый осадочный МТЭ. Суть его устройства заключалась в том, что конструкция позволяла размещать 4 анода на разной глубине от поверхности осадка источника, а 4 связанных с ними катода располагались на одном уровне сразу под поверхностью воды. Каждый анод был связан в цепь со своим катодом, позволяя совмещать в одной конструкции 4 отдельных осадочных МТЭ. Аноды были пронумерованы от 1 до 4 снизу вверх. После установки аноды 1, 2 и 3 находились в осадке полностью, а анод 4 был в толще воды.

Многоуровневый осадочный МТЭ работал в горячем источнике Солнечный 12 дней. За это время наиболее высокие значения напряжения, силы тока и максимумов мощности наблюдались для 2-й и 3-й пар электродов с анодами 2 и 3, соответственно, расположенными в средней и верхней части осадочной толщи источника. Максимум удельной силы тока для 2-й пары электродов составил $1,4 \text{ мА/м}^2$, а для 3-й пары $1,5 \text{ мА/м}^2$ при замкнутой на 10 кОм цепи. В режиме разомкнутой цепи измеряли максимально возможную мощность и ток короткого замыкания, уменьшая сопротивление с 10 кОм до минимального в единицы Ом, соответствующего сопротивлению осадочного МТЭ на Белом море, с помощью полевого потенциостата. Максимальные удельные мощность и ток короткого замыкания достигли $6,47 \text{ мВт/м}^2$ и 54 мА/м^2 .

После завершения инкубирования осадочного МТЭ в горячем источнике в структуре микробных сообществ анодов 2 и 3 среди доминантов было

обнаружено накопление электрогенов рода *Thermincola*, а также представителей других родов, способных осуществлять ВПЭ посредством железоредукции (*Thermodesulfovibrio*, *Sulfurihydrogenibium*, *Thermoanaerobaculum*, *Paludibaculum*) и межвидового переноса электронов (*Syntrophorhabdus*).

В дальнейшем аноды 2 и 3 из многоуровневого МТЭ инкубировали *in vitro* в электрохимических Н-ячейках (среда: анаэробная вода источника Солнечный; субстрат: смесь формиат, ацетат и пируват; температура: +55°C, потенциалы: -20 и -50 мВ относительно AgCl электрода сравнения). В результате с теми же анодами добились генерации более высоких токов: до 9 мА (253 мА/м²) и 10 мА (290 мА/м²) для анодов 2 и 3, соответственно. Дальнейшее потенциостатирование анодов в лабораторных электрохимических ячейках привело к преобладанию в их структурах прокариотных сообществ таксонов, представители которых способны осуществлять различные варианты ВПЭ: электрогены (*Carboxydotherrmus*, *Carboxydocella*), железоредукторы (*Paradesulfitobacterium*, *Desulfotomaculum*, *Coriobacteriia*, *Ignavibacteriales*, *Thermoanaerobaculum*, *Paludibaculum*, *Thermodesulfovibrio*, *Thermus*), электросинтрофы (*Synergistaceae*).

Последующие 3 пересева с анода на анод и потенциостатирование позволили накопить на аноде 2 представителя рода *Carboxydocella* до 54% в прокариотном сообществе, а на аноде 3 - представителя некультивируемого нового филума CALINM01 с долей 38% в сообществе.

Основные выводы. Полученные результаты исследований электрокаталитических характеристик психрофильного и термофильного микробных сообществ демонстрируют, что микробные сообщества экстремальных местообитаний могут обеспечивать генерацию достаточно высоких по силе и мощности электрических токов осадочными МТЭ. Генерация более высоких по удельной силе токов осадочным МТЭ холодной экосистемы Белого моря объясняется, прежде всего, различием физико-химических условий обеих экосистем, что превалирует над фактором более высокой метаболической активности и, как следствие, электроактивности термофилов по сравнению с психрофилами. В обоих осадочных МТЭ произошло селективное накопление электроактивных прокариот на углеводородных электродах. Работа с осадочными МТЭ в экстремальных экосистемах показала, что психрофильные и термофильные электроактивные микробные сообщества содержат редких некультивируемых прокариот, таких как *Ca. Tenderia* в донных отложениях Белого моря и CALINM01 в осадках горячего источника Солнечный.

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. Dopson M., Ni G., Sleutels T.H. Possibilities for extremophilic microorganisms in microbial electrochemical systems // J. FEMS Microbiology Reviews. -2015. 40(2):164-81.

Список публикаций по теме работы

Статьи

1. Ключин Г.С., Гогов А.С., Колоский А.Е., Строева А.Р., Елизаров И.М., Ключина 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
RESEARCH CENTER OF BIOTECHNOLOGY RAS

EXTREMOPHILIC MICROBIAL COMMUNITIES AS SOURCES OF DEEP NEW PHYLOGENETIC LINES OF ELECTROACTIVE PROKARYOTES AND A BASE FOR THE CREATION OF AUTONOMOUS CURRENT SOURCES

Abstract. New perspectives in electromicrobiology are opening up when studying the composition and electrocatalytic properties of microbial communities in extreme habitats. In this study, the electrocatalytic properties and composition of prokaryotic communities of the cold ecosystem of bottom sediments of the coastal zone of the White Sea and the hot ecosystem of precipitation of the Solnechny hot spring (Kamchatka) were determined. The specific strength and current power of the sedimentary MFC of the White Sea reached 384 mA/m² and 25 mW/m², and the same values for the sedimentary MFC of the hot spring reached a maximum of 54 mA/m² (short-circuit current) and 6.47 mW/m². Accumulation of prokaryotes capable of extracellular electron transfer was achieved on the electrodes of both sedimentary MFCs, including representatives of uncultivated taxa: *Ca.Tenderia* from cold marine sediments and phylum CALINM01 from the sediment of a hot spring.

Keywords: sedimentary MFCs, extremophile, electrogens, electrotrophs, psychrophiles, thermophiles.

Лайкова Александра Алексеевна

аспирант ФИЦ Биотехнологии РАН 3 года обучения

научная специальность: 1.5.11 Микробиология

e-mail: laykova2011@yandex.ru

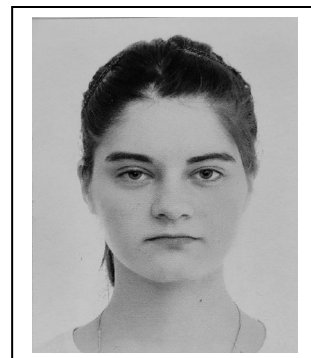
Научный руководитель

Литти Юрий Владимирович

кандидат биологических наук

с.н.с., заведующий лабораторией микробиологии

антропогенных мест обитания



ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ ЭЛЕКТРОПРОВОДЯЩИХ И ИНЕРТНЫХ МАТЕРИАЛОВ-НОСИТЕЛЕЙ НА ПРОЦЕСС ТЕМНОВОЙ ФЕРМЕНТАЦИИ В БИОФИЛЬТРАХ С ВОСХОДЯЩИМ ПОТОКОМ

Аннотация. Работа посвящена изучению биотехнологического потенциала проводящих (карбонового войлока, железной ваты) и непроводящих (полиэфирный войлок) материалов-носителей в непрерывной темновой ферментации (ТФ) полусинтетической сточной воды анаэробным микробным сообществом при увеличении нагрузки по органическому веществу. Оптимальная нагрузка для наибольшей эффективности ТФ составила 33,3 г ХПК/л/сут, причем параметры процесса для обоих использованных войлоков оказались сопоставимыми. Результаты применения электрохимических, микробиологических и аналитических методов позволяют предположить, что основным механизмом стимуляции ТФ при внесении карбонового войлока является проводимость материала наряду с интенсификацией синтеза внеклеточных полимерных веществ, в то время как для полиэфирного войлока это обусловлено улучшенным биообращением. Перспективы исследования связаны с масштабированием ТФ и возможностью комбинаций материалов-носителей.

Ключевые слова: биоводород, темновая ферментация, анаэробные биофильтры, материалы-носители, биопленки, микробное сообщество.

Получение чистого биотоплива наряду с утилизацией органических отходов входит в число основных задач современной биотехнологии. Анаэробный процесс темновой ферментации (ТФ) является одним из способов получения биоводорода и представляет большой интерес для исследователей в силу невысоких затрат, простоты организации и возможности применения

различных подходов к стимуляции выхода целевого продукта [2]. Одним из подходов к оптимизации ТФ является внесение в среду инкубации различных носителей, что стимулирует иммобилизацию активной биомассы и образование биопленок, а также внеклеточный перенос электронов в случае проводящих материалов. Несмотря на наблюдаемый положительный эффект материалов-носителей в различных исследованиях, механизмы их влияния на ТФ до сих пор слабо изучены. Цель работы заключается в оценке влияния материалов-носителей различной природы на биотехнологические, физико-химические и микробиологические параметры системы ТФ при непрерывном сбрасывании полусинтетической сточной воды на основе раствора кормовой патоки с добавлением минеральных солей.

Эксперимент проводили в анаэробных реакторах типа биофильтр с восходящим потоком при температуре $55 \pm 1^\circ\text{C}$. В реакторы загружали материалы: карбоновый войлок (РКВ), полиэфирный войлок (РПВ) либо железную вату (РЖВ) в двух повторностях. В качестве инокулята был использован эффлюент кислотогенного реактора [3], в качестве субстрата – имитированный сток сахарного производства на основе кормовой патоки. Исследование включало 5 этапов, каждый из которых характеризовался постепенным повышением нагрузки по органическому веществу (ОВ) от 3,7 до 88,8 г ХПК/л/сут.

Согласно результатам анализа биотехнологических параметров, на начальных этапах во всех реакторах отмечалось образование метана, тогда как при повышении нагрузки наблюдалось преобладание процессов ТФ. Наибольший выход (до $72,0 \pm 5,9$ мл H_2 /г ХПК/сут) и скорость продукции водорода (до $2062,1 \pm 225,9$ мл H_2 /л/сут) были достигнуты на стадиях S-III и S-IV для РКВ и РПВ, причем результаты были сопоставимы для проводящего и инертного войлоков. В РЖВ метаногенез происходил на протяжении всего эксперимента, что свидетельствует о недостаточной эффективности использованного носителя для ТФ. При повышении нагрузки по ОВ до 88,8 г ХПК/л/сут наблюдалось снижение pH и ингибирование ТФ, в особенности, в случае добавления инертного носителя. Профиль растворимых продуктов метаболизма указывает на преобладание лактата среди органических кислот, что, вероятно, обусловлено типом субстрата.

Анализ морфологии и топологии биопленок показал, что в РПВ происходит более активное, равномерное и устойчивое обрастание носителя по сравнению с РКВ. При этом активность электронтранспортных систем микробного сообщества РКВ была в среднем выше, чем у РПВ (более чем на 150% на стадии S-IV), что может указывать на вклад проводимости КВ в эффективность ТФ, поскольку степень обрастания материалов КВ и ПВ на

этой стадии была сопоставима. Данные о толщине биопленок, количестве и соотношении внеклеточных полимерных компонентов позволяют предположить, что белки в составе биопленки в РПВ выполняют преимущественно структурную (каркасную) функцию, в то время как в РКВ представлены преимущественно редокс-белками, которые играют роль во внеклеточном переносе электронов [1]. Значения электрохимической емкости биопленок на КВ и ПВ (до 11,42 мФ/см²) также были сопоставимы, однако биопленка на КВ характеризовалась более высокой проводимостью. Предположительно, биопленка в РПВ способна накапливать заряд на поверхности, несмотря на отсутствие проводимости материала, в то время как в случае РКВ можно предположить стимулирующее воздействие проводимости на ТФ за счет усиления обмена электронами между клетками и носителем.

Микробное сообщество на протяжении эксперимента было в основном представлено продуцентами водорода, способными к продукции водорода из лактата (*Clostridium sensu stricto* 12, *Prevotella*, *Caproiciproducens*) наряду с молочнокислыми бактериями, относительная численность которых возрастала в том числе и при наиболее высокой нагрузке (88,8 г ХПК/л/сут). На основании результатов прогнозирования метаболических функций по базе данных KEGG, наиболее высокая относительная численность генов продукции водорода из лактата была отмечена в РПВ (до 180 КО-единиц), а также было показано присутствие генов гидрогеназ и метаболизма ключевых интермедиатов ТФ.

Эффективность применения войлоков при оптимальной нагрузке по ОВ предполагает, что непроводящие материалы представляют выгодную альтернативу для стимуляции ТФ за счет улучшенного обрастания, в то время как проводящие имеют преимущества за счет стимуляции переноса электронов и синтеза внеклеточных полимерных компонентов. Полученные результаты представляют ценность с точки зрения оптимизации ТФ субстратов, богатых углеводами, выявления подходящих параметров культивирования в непрерывных условиях, а также характеристики используемых материалов-носителей.

Основные выводы:

1. Наилучшие показатели продукции Н₂ были сопоставимы для электропроводящего (карбонового) и инертного (полиэфирного) войлоков при нагрузках по ОВ 14,8 г ХПК/л/сут и 33,3 г ХПК/л/сут;

2. Анализ концентраций растворимых продуктов метаболизма (до 125,1 мМ лактата) и предполагаемых метаболических путей свидетельствует о наличии лактатного пути ТФ;

3. Проводимость карбонового войлока оказывает положительное влияние на эффективность продукции водорода (активность ЭТС до 1,41 мг/мг/ч). Стимуляция со стороны полиэфирного войлока обусловлена преимущественно эффективностью образования биопленок;

4. В ходе повышения нагрузки по ОВ наблюдалась сукцессия микробного сообщества в сторону обогащения молочнокислыми бактериями (*Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Olsenella*) и продуцентами биоводорода из лактата (*Clostridium sensu stricto* 12, *Prevotella*, *Caproiciproducens*).

Литература

1. Cheng J., Li H., Ding L., Zhou J., Song W., Li Y.-Y., Lin R. Improving hydrogen and methane co-generation in cascading dark fermentation and anaerobic digestion: The effect of magnetite nanoparticles on microbial electron transfer and syntrophism//Chemical Engineering Journal. – 2020. – Т. 397. – С. 125394.

2. Jain R., Panwar N.L., Jain S.K., Gupta T., Agarwal C., Meena S.S. Biohydrogen production through dark fermentation: an overview//Biomass Conversion and Biorefinery. – 2024. – Т. 14. – С. 12699–12724.

3. Laikova A.A., Kovalev A.A., Kovalev D.A., Zhuravleva E.A., Shekhurdina S.V., Litti Y.V. The feasibility of single-stage biohythane production in a semi-continuous thermophilic bioreactor: Influence of operating parameters on the process kinetics and microbial community dynamics//International Journal of Hydrogen Energy. – 2024. – Т. 55. – С. 1486–1494.

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., Litti Y. The intracellular accumulation of iron coincides with enhanced biohydrogen production by *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* // Chemical Engineering Journal. – 2024. – Т. 497. – С. 154961.

Тезисы докладов

1. A.A. Laikova, P.D. Biryuchkova, S.V. Shekhurdina, E.A. Zhuravleva, A.A. Ivanenko, N.G. Loiko, A.A. Kovalev, D.A. Kovalev, Y.V. Litti. The accumulation of iron in *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* cells coincides with increased biohydrogen production. International Conference on New

Horizons in Biotechnology (Trivandrum, India, 26-29 November 2023) – 345 с. (постерный доклад, диплом за лучший постер).

2. A. Laikova, E. Zhuravleva, S. Shekhurdina, A. Ivanenko, E. Andreev, N. Loiko, A. Kovalev, D. Kovalev, V. Fedina, S. Alferov, Y. Litti. 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).

3. A. Laikova, A. Tamoshinskaya, E. Zhuravleva, S. Shekhurdina, A. Ivanenko, N. Loiko, N. Popova, A. Kovalev, Y. Litti. The effect of the electrically conductive and non-conductive carrier materials on dark fermentation in upflow biofilters. International Conference “Biological Sciences and Environmental Solutions for the Achievement of Sustainable Development Goals” (Yerevan, Armenia, 24-26 September 2025) – 223 с. (устный доклад).

Laikova Alexandra Alexeevna
RESEARCH CENTER OF BIOTECHNOLOGY RAS

**THE EFFECT OF ELECTRICALLY CONDUCTIVE AND NON-
CONDUCTIVE CARRIER MATERIALS ON DARK FERMENTATION IN
UPFLOW BIOFILTERS**

Abstract. This study examines the biotechnological potential of conductive (carbon felt, iron wool) and non-conductive (polyester felt) carrier materials in continuous dark fermentation (DF) of semi-synthetic wastewater by a microbial community with increasing organic loading rate (OLR). The optimal OLR for maximum DF efficiency was 33.3 g COD/L/day, with the observed comparable performance for the both felts applied. The results of electrochemical, microbiological, and analytical methods suggest that the primary stimulation mechanism for carbon felt is the material's conductivity, along with enhanced synthesis of extracellular polymeric substances, while for polyester felt, this is due to improved biofouling. Future research opportunities lie in scaling up dark fermentation and exploring the possibility of combining carrier materials.

Keywords: biohydrogen, dark fermentation, anaerobic biofilters, carrier materials, biofilms, microbial community.

Работа выполнена при поддержке РНФ (грант №25-64-00027)

Рассомахина Наталья Вадимовна

аспирант ФИЦ Биотехнологии РАН 3 года обучения

научная специальность 1.5.4 Биохимия

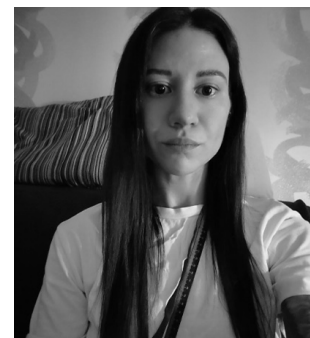
e-mail natalia.rassomahina@ya.ru

Научный руководитель

Жердева Виктория Вячеславовна

кандидат биологических наук,

зав. лабораторией молекулярного имиджинга



ИЗУЧЕНИЕ ПРОТИВООПУХОЛЕВОГО ОТКЛИКА НА ИНГИБИТОРЫ ПРОТЕИНКИНАЗ НА БИОЛОГИЧЕСКИХ МОДЕЛЯХ РАКА

Аннотация. Современная онкология демонстрирует парадигмальный сдвиг от органно-ориентированной классификации злокачественных новообразований к молекулярно-генетической, обусловленный консервативностью ключевых сигнальных путей канцерогенеза независимо от тканевой принадлежности опухоли. В данном контексте стратегия репозиционирования ингибиторов протеинкиназ приобретает особую значимость как инструмент ускоренного внедрения персонализированных терапевтических схем. Цель исследования — обоснование новых показаний для применения соединений, первоначально разработанных для терапии карцином молочной железы и гемобластозов, в лечении солидных и гематологических опухолей с альтернативными локализациями. В рамках настоящего исследования была проведена оценка антипролиферативного эффекта двух новых ингибиторов протеинкиназ группы FMS-подобной тирозинкиназы (FLT3), производные 2-амино-1-бензотиофен-3-карбоксилата, полученных в лаборатории биомедицинской химии ФИЦ Биотехнологии РАН). Скрининг проводился на панели коммерческих клеточных линий, стратифицированных по гистогенетической принадлежности: карцинома предстательной железы, рак молочной железы, гематологические злокачественные новообразования и гастроинтестинальные стромальные опухоли (GIST). Результаты *in vitro*-тестирования позволили отобрать наиболее чувствительную клеточную линию A549 с последующей валидацией терапевтического потенциала соединений на ксенографтах *in vivo* на иммунодефицитных мышах линии nude. Таким образом, полученные результаты подтверждают парадигму молекулярного перепрофилирования, а именно, возможности таргетного

ингибирования различных типов новообразований независимо от первичной локализации опухоли.

Ключевые слова: *ингибиторы протеинкиназ, рак, канцерогенез, 2d клеточные линии, ксенографты опухолей.*

Введение

Современная парадигма репозиционирования лекарственных препаратов опирается на системный фармакологический скрининг вновь синтезированных соединений на широком спектре экспериментальных моделей злокачественных новообразований. Методологический подход базируется на интегрированном алгоритме: предварительный биоинформатический анализ и предиктивное моделирование молекулярных мишеней с последующим комплексным доклиническим тестированием на стратифицированных панелях клеточных линий и ксенотрансплантатных моделях. Научное обоснование стратегии опирается на феномен конвергенции онкогенных драйверов: различные гистологические типы новообразований зависимы от гиперактивации идентичных киназных путей, что обуславливает возможность таргетного ингибирования независимо от первичной локализации опухоли [1]. Реализация данного подхода создает методологическую основу для разработки гистологически-независимых (tumor-agnostic) протоколов, оптимизирующих выбор терапии на основе молекулярного профиля опухоли. Интеграция данных, полученных в стандартизированных двумерных (2D) клеточных культурах и *in vivo* моделях, позволяет на ранних этапах разработки комплексно оценить потенциальную противоопухолевую активность и селективность кандидатов.

Методы

Культивирование 2d линий

Культивирование проводили в среде DMEM GluMax, дополненной 10% фетальной бычьей сывороткой (FBS, Bioserva, США) и 1% раствором пенициллина/стрептомицина (Панэко), в условиях 37 °C, 5% CO₂ и насыщенной влажности. Все линии после разморозки были протестированы на заражение микоплазмой с использованием набора MycoReport (Евроген).

МТТ тест

Приготовление растворов исследуемых соединений. Ингибиторы протеинкиназ 340 и 143 (производные 2-amino-1-benzothiophene-3-carboxylate из коллекции биологически активных соединений ФИЦ) растворяли в диметилсульфоксиде (ДМСО) до получения материнских стоковых растворов с концентрацией 10 мМ. Аликвоты стоковых растворов хранили при

температуре $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$; размораживание проводили непосредственно перед проведением эксперимента. Рабочие концентрации препаратов (100, 50, 10, 1 и 0,1 мкМ) получали последовательным разведением стока в полной культуральной среде. Максимальная конечная концентрация ДМСО в лунке не превышала 1%, что, согласно данным литературы и результатам пилотных тестов, не оказывало цитотоксического эффекта на исследуемые клеточные линии.

Постановка эксперимента на адгезивных культурах. Клетки вносили в 96-луночные планшеты и инкубировали в стандартных условиях ($37\text{ }^{\circ}\text{C}$, 5% CO_2) в течение 24 ч для обеспечения адгезии и выхода на экспоненциальную фазу роста. По истечении этого срока питательную среду полностью удаляли и добавляли по 100 мкл свежей среды, содержащей исследуемые соединения в заданных концентрациях. Схема посева предусматривала наличие контрольных рядов: «нулевой» ряд (среда без клеток для коррекции фонового поглощения) и ряд контроля растворителя (клетки + максимальная концентрация ДМСО). Каждый вариант концентрации для каждого препарата тестировали в 8 повторностях (технические реплики).

Постановка эксперимента на суспензионных культурах. Для линий, растущих в суспензии, применяли метод со-инкубации. Рабочие растворы препаратов готовили с двукратным превышением целевых концентраций (200, 100, 20, 2 и 0,2 мкМ). В лунки планшета, содержащие по 100 мкл клеточной суспензии, спустя 24 часа после посева, добавляли по 100 мкл соответствующего раствора препаратов. Таким образом, за счет разведения 1:1 достигались финальные концентрации: 100, 50, 10, 1 и 0,1 мкМ. Контрольные группы и количество повторностей формировали аналогично протоколу для адгезивных культур.

Детекция жизнеспособности (МТТ-тест). После 48 часов инкубации с препаратами в лунки вносили раствор тетразолиевого красителя МТТ (3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолий бромид): для адгезивных культур — 10 мкл рабочего раствора (на общий объем 100 мкл в лунке); для суспензионных культур — 20 мкл рабочего раствора (на общий объем 200 мкл в лунке). Планшеты инкубировали в течение 2 ч при $37\text{ }^{\circ}\text{C}$, 5% CO_2 для формирования кристаллов формазана. Лизис клеток и растворение кристаллов проводили дифференцированно: для суспензионных культур: планшеты центрифугировали, надосадочную жидкость аккуратно удаляли, затем в каждую лунку добавляли по 100 мкл ДМСО и инкубировали на орбитальном шейкере в течение 10 мин до полного растворения осадка. Для адгезивных культур: надосадок не удаляли, в лунки напрямую вносили по 200 мкл ДМСО до полного растворения кристаллов.

Регистрация результатов и статистический анализ. Оптическую плотность (ОП) измеряли на планшетном спектрофотометре, используя основной фильтр 530 нм (пик поглощения формазана) и референсный фильтр 590 нм (для вычета оптических неоднородностей планшета). Процент жизнеспособности клеток рассчитывали по формуле:

$$\text{Viability, \%} = (\text{ADMSO} - \text{Ablank}) / (\text{Asample} - \text{Ablank}) \times 100\%$$

Где A sample, DMSO, blank – ОП в лунках с препаратом, растворителем, пустой ряд соответственно

In vivo скрининг

Исследуемые соединения. В работе оценивали противоопухолевую активность двух синтезированных ингибиторов протеинкиназ (кодированные обозначения: 340 и 143). Навески соединений массой 140 мг гомогенизировали с 2,8 мл полисорбата-80 (Tween® 80) до получения стабильной суспензии. Приготовленные формы хранили при температуре +4 °C и использовали в экспериментах в течение 10 суток; перед введением препараты термостатировали до комнатной температуры (22–24 °C) для стандартизации вязкости и биодоступности.

Клеточная культура. Человеческая линия аденокарциномы легкого A549 получена из Американской коллекции типовых культур (ATCC, Манассас, США) через Совместный исследовательский центр «Коллекция клеток позвоночных» (Институт цитологии РАН, Россия). Клетки культивировали в среде RPMI-1640 (Paneco, Россия), дополненной 10% фетальной бычьей сывороткой (FBS, Bioserva, США) и 1% раствором пенициллина/стрептомицина, в условиях 37 °C, 5% CO₂ и насыщенной влажности. Для экспериментов использовали клетки не старше 4-го пассажа после разморозки.

Модель ксенотрансплантата. Эксперименты проведены на иммунодефицитных мышах линии BALB/c nude (самки, возраст 8 недель, масса 20–22 г), полученных из питомника «Пушино» (Россия), контракт № 2824/22-Т(УНУ) от 26.12.2022. Формирование подкожных ксенотрансплантатов осуществляли путем инъекции 3×10^6 клеток A549 в 0,1 мл фосфатно-солевого буфера (DPBS) в левую подлопаточную область. После инокуляции животные находились под наблюдением в течение 28–30 суток для контроля приживаемости и роста опухолевых узлов.

Этическое регулирование. Исследование одобрено Локальным этическим комитетом Исследовательского центра биотехнологии РАН и выполнено в соответствии с международными принципами гуманного

обращения с лабораторными животными (директива 2010/63/ЕС, рекомендации ARRIVE).

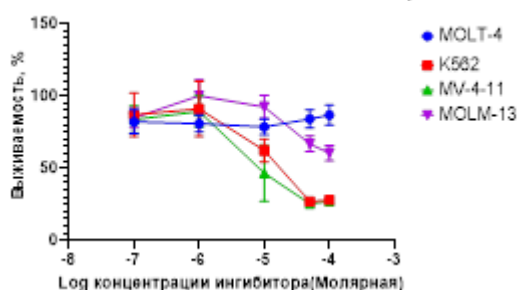
Результаты

Для оценки антипролиферативной активности соединений 340 и 143 рассчитывали процент жизнеспособности клеток относительно контроля (ДМСО) и определяли значения полумаксимальной ингибирующей концентрации (IC_{50}). Данные были стратифицированы по гистогенетическим подгруппам: карцинома предстательной железы, рак молочной железы, гематологические злокачественные новообразования, гастроинтестинальные стромальные опухоли (GIST), аденокарцинома лёгкого, остеосаркома, рак шейки матки.

Дозозависимый эффект. Оба соединения демонстрировали статистически значимое снижение жизнеспособности клеток в диапазоне концентраций 10 - 100 мкМ ($p < 0,05$, ANOVA) (рис.1).

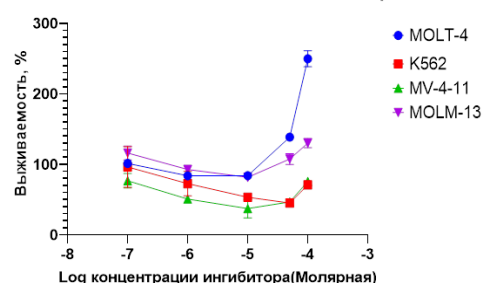
Гистогенетическая специфичность и сравнительная эффективность. Наиболее выраженная чувствительность была выявлена для соединения 340 отмечена в подгруппе гастреоинтерстициальных опухолей и аденокарциномы легких. Соединение 340 проявило более широкий спектр активности и более высокую ингибирующую способность.

гематологические злокачественные новообразования



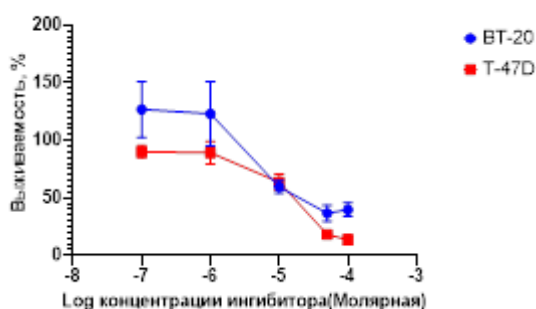
а

гематологические злокачественные новообразования



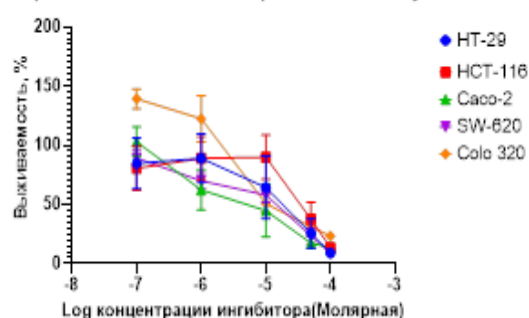
б

Рак молочной железы



в

гастроинтестинальные стромальные опухоли



г

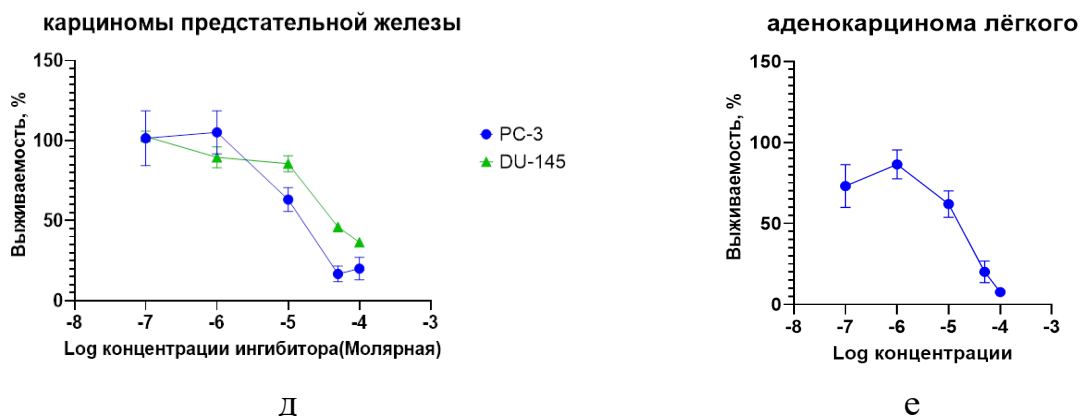


Рис. 1. Дозозависимый эффект выживаемости клеток при тестировании соединений 143 и 340 (10–100 мкМ): а — соединение 340; б — соединение 143.; а – соединение 340; б - соединение 143; в-е – соединение 340.

Таким образом, на основании полученных данных для дальнейшего *in vivo*-тестирования на ксенотрансплантатных моделях отобрана линия аденокарциномы легких A549, демонстрировавшая *in vitro* наилучший баланс между чувствительностью к терапии и широтой противоопухолевого отклика во всем диапазоне концентраций ингибиторов 340 и 143.

Для определения объёма опухоли в экспериментах на животных с помощью внешнего штангенциркуля измеряли наибольший продольный диаметр (длину) и наибольший поперечный диаметр (ширину). Объём опухоли на основании измерений штангенциркулем рассчитывали по модифицированной эллипсоидной формуле [1, 2]:

Для расчёта торможения роста опухоли (ТРО, TGI) мышей группировали в когорты, обозначенные как респондеры (g1) — животные с положительной реакцией на терапию — и нон респондеры (g2) — животные без ответа или со слабым ответом на терапию. Контрольную группу подразделяли на положительный контроль и отрицательный контроль, соответствующие медленному и агрессивному росту опухоли соответственно.

На рисунке 2 представлен средний процент торможения роста опухоли (%), рассчитанный по в соответствии с [1]:

$$TGI, \% = (V_{\text{control}} - V_{\text{experiment}}) / V_{\text{control}} \times 100; I_i = V_i / V_0,$$

где:

- i — день эксперимента;
- V_0 — объём опухоли в день начала лечения;
- V_i — объём опухоли на i -й день эксперимента.

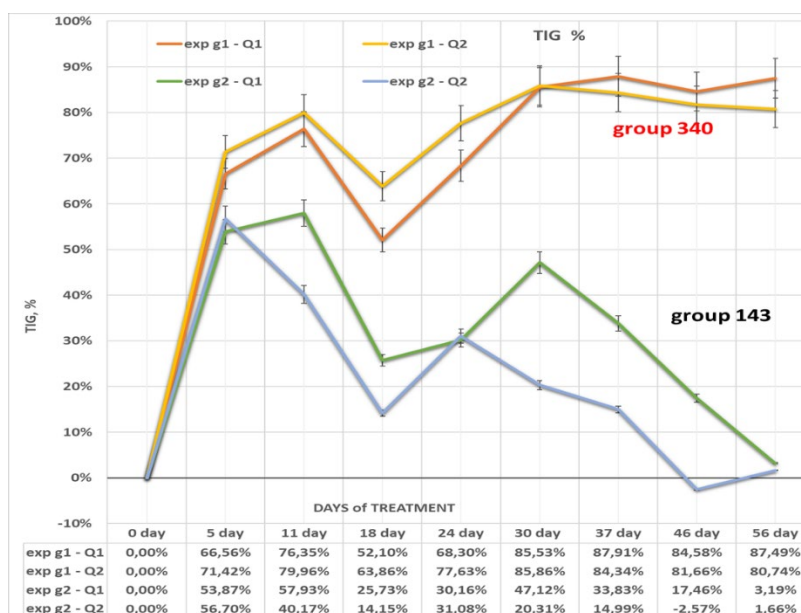


Рис. 2. Среднее значение торможения роста опухоли (ТРО, %) в подкожном ксенографте аденокарциномы легкого на мышах линии nude для групп: для g2 (n = 3), для g1 (n = 4). ТРО в процентах (%).

Основные выводы

Наиболее выраженная чувствительность к соединению 340 была выявлена в подгруппах гастероинтерстициальных опухолей и аденокарциномы лёгких. Соединение 340 продемонстрировало более широкий спектр противоопухолевой активности и более высокую ингибирующую способность по сравнению с другим тестируемым соединением 143.

Ксенографты на основе аденокарциномы лёгких A549 (полученные на иммунодефицитных мышах линии nude) показали наиболее выраженный отклик на противоопухолевую терапию соединением 340. Этот результат согласуется с данными, полученными в экспериментах на клеточной культуре аденокарциномы лёгкого A549: в условиях *in vitro* соединение 340 также проявило значительную активность в отношении клеток этой линии.

Таким образом, полученные результаты подтверждают парадигму молекулярного перепрофилирования, а именно, возможности таргетного ингибирования различных типов новообразований независимо от первичной локализации опухоли.

Литература

1. Lobanov V. et al. Protein Kinase Inhibitors: Synthesis and Molecular Repurposing in Three-Dimensional Cancer Models PKI //Chemical Biology & Drug Design. – 2025. – Т. 106. – №. 5. – С. e70195.

2. Jensen M. M. et al. Tumor volume in subcutaneous mouse xenografts measured by microCT is more accurate and reproducible than determined by ¹⁸F-FDG-microPET or external caliper //BMC medical imaging (Online). – 2008. – Т. 8.

Список публикаций по теме работы

1. Жердева В. В. и др. Снижение экспрессии генов цитоскелета в опухолевых клетках при лентивирусной трансдукции //Молекулярная генетика, микробиология и вирусология. – 2025. – Т. 43. – №. 1. – С. 30-37.

2. Lobanov V. et al. Protein Kinase Inhibitors: Synthesis and Molecular Repurposing in Three-Dimensional Cancer Models PKI //Chemical Biology & Drug Design. – 2025. – Т. 106. – №. 5. – С. e70195.

Rassomakina Natalia Vadimovna
RESEARCH CENTER OF BIOTECHNOLOGY RAS

INVESTIGATION OF THE ANTITUMOR RESPONSE INDUCED BY PROTEIN KINASE INHIBITORS USING BIOLOGICAL CANCER MODELS

Abstract. Modern oncology is demonstrating a paradigm shift from organ-oriented classification of malignant neoplasms to a molecular genetic one, driven by the conservatism of key signaling pathways in carcinogenesis regardless of the tissue origin of the tumor. In this context, the strategy of repurposing protein kinase inhibitors gains particular significance as a tool for accelerating the implementation of personalized therapeutic regimens.

The aim of the study is to substantiate new indications for the use of compounds originally developed for the treatment of breast carcinomas and hemoblastoses in the therapy of solid and hematological tumors with alternative localizations.

Within the framework of this study, we assessed the antiproliferative effect of two novel protein kinase inhibitors from the FMS like tyrosine kinase (FLT3) group, synthesized at the Laboratory of Biomedical Chemistry of the RC of Biotechnology RAS. The screening was carried out on a panel of commercial cell lines stratified by histogenetic origin: prostate carcinoma, breast cancer, hematological malignancies, and gastrointestinal stromal tumors (GIST).

The results of in vitro testing allowed us to select the most sensitive cell line, A549, followed by validation of the therapeutic potential of the compounds in in vivo xenograft models using immunodeficient nude mice.

Keywords: protein kinase inhibitors, cancer, carcinogenesis, xenograft tumor models.

Шехурдина Светлана Витальевна

аспирант ФИЦ Биотехнологии РАН 3 года обучения

научная специальность 1.5.11 Микробиология

e-mail: sh.sweeta@yandex.ru

Научный руководитель

Литти Юрий Владимирович

кандидат биологических наук,

зав. лабораторией,

с.н.с. лаборатории микробиологии антропогенных мест обитания



ВЛИЯНИЕ МОДИФИКАЦИИ БИОАНОДА НА БЕЗНИТРИТНОЕ УДАЛЕНИЕ АММОНИЯ АНАММОКС-СООБЩЕСТВОМ В МИКРОБНОЙ ЭЛЕКТРОЛИЗНОЙ ЯЧЕЙКЕ

Аннотация. *Сложность поддержания стабильного уровня нитритов в сточных водах препятствуют быстрому запуску и широкому применению технологий на основе процесса анаммокс. В этом исследовании анаммокс-процесс был совмещен с микробной электролизной ячейкой для изучения влияния приложенного напряжения на эффективность безнитритного удаления азота. Результаты показали, что модификация биоанода позволяет преодолеть ограничения низкой эффективности переноса электронов за счет увеличения поляризационной емкости и снижения сопротивления переноса заряда, а подача напряжения может способствовать не только повышению эффективности удаления азота, но и усилить перенос электронов и метаболическую активность анаммокс-сообщества.*

Ключевые слова: *анаэробное окисление аммония, микробная электролизная ячейка, модифицированные карбоновые электроды, эффективность удаления азота, внеклеточный перенос электронов, приложенное напряжение.*

Анаэробное окисление аммония (анаммокс) в настоящее время считается одной из наиболее эффективных технологий удаления азота из сточных вод. Однако широкое внедрение этой технологии затруднено отсутствием нитрита в сточных водах и сложностью поддержания его стабильного уровня за счет процессов частичной нитрификации или денитрификации, которые, в свою очередь, также требуют затрат на аэрацию или внесения источника органического углерода [1]. В связи с этим возникает

необходимость поиска новых решений, направленных на повышение стабильности процесса и снижение эксплуатационных расходов.

Недавнее открытие способности анаммокс-бактерий использовать альтернативные, в том числе нерастворимые, акцепторы электронов открыло перспективу интеграции анаммокс-процесса с микробной электролизной ячейкой (МЭЯ). МЭЯ объединяет микробный метаболизм с электрохимическими реакциями, обеспечивая окисление аммония биоанодом. Кроме того, подача напряжения может способствовать образованию более плотной биопленки на поверхности биоанода, что важно для сокращения расстояния при переносе электронов, увеличения скорости роста клеток и повышения активности ключевых ферментов процесса анаммокс [2]. Однако, эффективность МЭЯ может быть невысокой из-за ограничений в эффективности переноса электронов, что требует поиска подходящего материала для биоанода или его дополнительной модификации.

Целью данной работы являлось изучение влияния модификации биоанода, а также приложенного напряжения в МЭЯ, совмещенной с процессом анаммокс, на эффективность безнитритного удаления аммония.

МЭЯ представляли собой стеклянные трехэлектродные однокамерные ячейки объемом 300 мл. В качестве материала биоанода использовался карбоновый войлок, который предварительно подвергался четырем различным вариантам предобработки для усиления донорно-акцепторных свойств и электрохимической активности: контроль без модификации (МЭЯ №1), модификация нейтральным красным (МЭЯ №2), окислительно-термическая модификация (МЭЯ №3) и модификация оксидом Ni-Fe-PEDOT (МЭЯ №4). Инкубацию проводили при комнатной температуре (23-26°C) в трёх повторностях, со скоростью перемешивания 100 об/мин. Исследование включало несколько этапов: предварительный этап для оценки возможности электрохимического окисления аммония в абиотических условиях; нулевой этап (S-0) для иммобилизации и адаптации биомассы на поверхности биоанода при подаче среды, содержащей ~50 мг N-NH₄/л и ~60 мг N-NO₂/л; и этап с электростимуляцией (S-I) для оценки влияния приложенного напряжения 300 мВ на эффективность удаления аммонийного азота при подаче среды без нитрита и с концентрацией аммония ~78 мг N-NH₄/л.

Электрохимическая характеристика биоанодов показала более высокие значения силы тока и рост поляризационной емкости МЭЯ №2 и №4, по сравнению с МЭЯ №1 и №3. Это существенно изменило состав поверхности и улучшило гидрофильные свойства материалов. Для биоанода МЭЯ №1 было отмечено самое высокое сопротивление переноса заряда (22,1 Ом·см²), в то время как у МЭЯ №2 и №4 значения снижались до 2,2 и 0,8 Ом·см²,

соответственно. Полученные результаты показывают, что биоаноды МЭЯ №2 и №4 обладают лучшими электрохимическими характеристиками для повышения скорости переноса электронов.

Результаты предварительного этапа показали, что электрохимическое окисление аммония в NO_3^- или NO_2^- в абиотических условиях не происходило. На этапе S-0 лучшие значения средней степени удаления азота показали МЭЯ с модифицированными войлоками. Эффективность удаления азота составила $77,6 \pm 2,8\%$ для МЭЯ №2, $77,3 \pm 3,9\%$ для МЭЯ №3 и $74,0 \pm 3,4\%$ для МЭЯ №4, в то время как для МЭЯ №1 – $39,2 \pm 3,3\%$. Тем не менее, разница между различными вариантами модификаций оказалась незначительной. Это свидетельствует об успешной иммобилизации биомассы и формировании устойчивой биоплёнки, что подтверждается результатами микроскопии. При подаче напряжения 300 мВ лучшие результаты по средней эффективности безнитритного удаления азота составили $71,4 \pm 2,4\%$, $69,1 \pm 1,9\%$ и $67,9 \pm 6,9\%$ в МЭЯ №4, №2 и №3, соответственно, что существенно выше $36,1 \pm 3,3\%$ в МЭЯ №1. Средняя максимальная сила тока составила $4,2 \pm 1,4$ мА, $7,3 \pm 2,4$ мА, $5,6 \pm 2,3$ мА и $13,7 \pm 3,2$ мА для МЭЯ №1-№4, соответственно. Данные свидетельствуют об успешной модификации биоанода и, вероятно, накоплении большой доли электроактивных бактерий, повышающих метаболическую активность анодной биопленки. Однако, несмотря на лучшую эффективность удаления азота и высокие анодные токи, для МЭЯ №4 отмечена наименьшая электропроводность биомассы, что вероятно связано с синергетическим эффектом сочетания активного оксидного слоя и проводящего полимерного покрытия, облегчающего перенос электронов от клеток на анод. Это также согласуется с результатами анализа активности системы переноса электронов с увеличением активности на 209,7% в МЭЯ №2 ($0,33 \pm 0,02$ мг/мг/ч), 170,9% в МЭЯ №3 ($0,23 \pm 0,01$ мг/мг/ч) и 11,9% ($0,12 \pm 0,006$ мг/мг/ч) в МЭЯ №4 по сравнению с контролем ($0,11 \pm 0,008$ мг/мг/ч).

Анализ морфологии и топологии биоанодов показал формирование более плотных биопленок за счет преобладания α -экзополисахаридов, формирующих каркас матрикса, и значительное количество редокс-белков, ассоциированных с клетками и включенными в матрикс. Это согласуется с наибольшей концентрацией цитохромов *c*-типа в МЭЯ №4 ($1174,2 \pm 31,1$ мг/г ОВ), МЭЯ №2 ($505,1 \pm 27,3$ мг/г ОВ) и МЭЯ №3 ($359,9 \pm 35,1$ мг/г ОВ), что было выше на 331,5%, 85,6% и 32,3%, соответственно, по сравнению с МЭЯ №1 ($272,1 \pm 23,9$ мг/г ОВ). Для изучения изменений в метаболизме и их взаимосвязи с цитохромом *c*-типа в электроактивном анаммокс-сообществе была определена активность ключевого фермента – гидразиндегидрогеназы (ГДГ). ГДГ является крупнейшим растворимым мультигемовым цитохромным

комплексом *c*-типа, который осуществляет превращение гидразина в N_2 и служит индикатором метаболической активности анаммокс-бактерий. Так, удельная активность ГДГ была самой низкой в МЭЯ №1 и составила $8,3 \pm 1,1$ мкмоль восстановленного цитохрома *c*/(г ОВ·мин) и возрастала до $19,2 \pm 1,4$, $13,4 \pm 0,7$ и $10,4 \pm 0,5$ мкмоль восстановленного цитохрома *c*/(г ОВ·мин) в МЭЯ №4, №2 и №3, соответственно.

Основные выводы. Модификация биоанодов улучшает электрохимические характеристики поверхности войлока, облегчая перенос электронов от клеток на электрод. Наблюдаемое удаление азота имеет исключительно микробную природу и связано с деятельностью электроактивного анаммокс-сообщества. При подаче напряжения эффективность удаления азота в безнитритных условиях сопоставима с удалением на адаптационном этапе. Наибольшая эффективность процесса (71,4% удаления азота) достигнута при использовании анода, модифицированного оксидом Ni-Fe-PEDOT. Комбинированный эффект подачи напряжения и биоанодных модификаций повысил активность ключевого фермента, эффективность переноса электронов и секрецию цитохромов *c*-типа. В перспективе планируется продолжение работы с постепенно повышающимся напряжением и оценка экспрессии ключевых генов, связанных с переносом электронов.

Литература

1. Huang J., Wen S., Shi B., Wang Y., Sun C., Zhang D., Han W., Lü T., Xu X., Wang, H. Ammonia oxidation with bicarbonate as an electron acceptor: An energy-saving process to accumulate nitrite for potential anammox in wastewater // Journal of Water Process Engineering. – 2024. – Vol. 68. – P. 106421.
2. Sun A., Liu X., Zhang S., Yang Q., Huang S., Zhang N. Enhancing nitrogen removal efficiency and anammox metabolism in microbial electrolysis cell coupled anammox through different voltage application // Bioresource Technology. – 2023. – Vol. 384. – P. 129283.

Список публикаций по теме работы

Статьи

1. Shekhurdina S., Zhuravleva E., Laikova A., Andreev E., Loiko N., Ivanenko A., Popova N., Kryukov E., Kovalev A., Kovalev D., Vivekanand V., Eliseev A., Litti Y. Methanogenic degradation of volatile fatty acids can be enhanced by using highly conductive materials or by forming electroactive biofilms on non-conductive materials // Science of the Total Environment. – 2025. – Vol. 1002. – P. 180642.

Тезисы докладов

1. S.V. Shekhurdina, E.A. Zhuravleva, A.A. Laikova, E.A. Andreev, N.G. Loiko, A.A. Ivanenko, A.A. Kovalev, D.A. Kovalev, Y.V. Litti. 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 on Innovations in Biotechnology for Sustainability (November 23-25, 2024; New Delhi, India) // Abstract book, p. 164-165 (постерный доклад, сертификат за лучший постерный и устный доклад).
2. S. Shekhurdina, E. Zhuravleva, A. Laikova, A. Ivanenko, V. Usova, Y. Litti. Alleviation mechanisms of Mg^{2+} assisted anammox process under salt stress for the carbon-free removal of nitrogen from saline wastewater. The Xi'an Carbon Meeting, An International Meeting on Carbon Pollution, Sequestration and Conversion to Energy and Chemicals (October 16-18, 2025; Xi'an, China) // Abstract book, p. 32 (постерный доклад).

Shekhurdina Svetlana Vitalievna RESEARCH CENTER OF BIOTECHNOLOGY RAS

THE EFFECT OF BIOANODE MODIFICATION ON THE NITRITE ABSENT REMOVAL OF AMMONIUM BY THE ANAMMOX COMMUNITY IN A MICROBIAL ELECTROLYSIS CELL

Abstract. The difficulty of maintaining stable nitrite levels in wastewater prevents the rapid launch and widespread use of technologies based on the anammox process. In this study, the anammox process was combined with a microbial electrolysis cell to study the effect of applied voltage on the efficiency of nitrite-free nitrogen removal. The results showed that the modification of the bioanode allowed overcoming the limitations of low electron transfer efficiency by increasing polarization capacitance and reducing charge transfer resistance, while voltage supply not only increased nitrogen removal efficiency, but also enhanced electron transfer and metabolic activity in the anammox community.

Keywords: anaerobic ammonium oxidation, microbial electrolysis cell, modified carbon electrodes, nitrogen removal efficiency, extracellular electron transfer, applied voltage.

Ефремова Кристина Валерьевна

аспирант ФИЦ Биотехнологии РАН 2 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



СОСТАВ МИКРОБНОГО СООБЩЕСТВА БИОФИЛЬТРА: ОПРЕДЕЛЕНИЕ И ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ПРОВЕРКА

Аннотация. *Выбросы загрязняющих веществ от предприятий жилищно-коммунального хозяйства являются серьезной проблемой, особенно в густонаселенных районах. Расширение городских территорий и последовательное повышение нормативных требований к качеству атмосферного воздуха делают особенно востребованными технологии очистки отходящих газов канализационных насосных станций и очистных сооружений.*

На данном этапе работы был определен состав микробного сообщества биокатализатора биофильтра с орошаемым слоем и проведена его экспериментальная проверка на модельных газовых смесях, содержащих сероводород и летучие органические соединения. В ходе исследования выявлен оптимальный состав микробного сообщества, метаболическая активность которого по данным газоанализа обеспечила эффективность удаления сероводорода 98,7% и летучих органических соединений 71-100%.

Ключевые слова: *биофильтрация, сероводород, летучие органические соединения, газовоздушные выбросы, микробное сообщество.*

Проблема очистки газовоздушных выбросов предприятий жилищно-коммунального хозяйства (ЖКХ) от дурнопахнущих и токсичных соединений стоит особенно остро в условиях растущей урбанизации. В группе загрязнителей, образующихся на объектах водоотведения и переработки отходов, доминируют такие соединения, как сероводород, аммиак и широкий перечень летучих органических соединений (ЛОС) [2]. Среди доступных технологий очистки биофильтры с орошаемым слоем (ВТФ) выделяются высокой эффективностью и экологической безопасностью, поскольку в их

основе лежит естественная деструкция загрязняющих веществ (ЗВ) иммобилизованными микроорганизмами-деструкторами [1]. Ключевым элементом данных систем является биокатализатор – насадочный материал с закрепленным на нем микробным сообществом. От состава и метаболической активности этого сообщества главным образом зависит производительность и стабильность всего биофильтра [4]. В связи с этим, определение микробных сообществ, адаптированных к конкретному профилю выбросов, является актуальной задачей, решение которой позволяет интенсифицировать процессы биофильтрации. Целью работы на данном этапе являлось определение оптимального состава микробного консорциума для биокатализатора ВТФ и его экспериментальная проверка в лабораторных испытаниях на модельных газовых смесях.

В настоящем исследовании был разработан ВТФ с двумя пространственно разделенными секциями для удаления ЛОС и H_2S . Испытания оптимального консорциума проводились на экспериментальном ВТФ в условиях, аналогичных ожидаемым на муниципальном очистном сооружении. Воздушный выброс моделировался путем подмешивания H_2S от баллона в воздушный поток от емкости объемом 65 л, которая постоянно была наполнена на 85-90% объема смесью отходов в соотношении 2:1 (объем/объем) полужидкого ила избыточного биологических очистных сооружений хозяйственно-бытовых и смешанных сточных вод и жидкого осадка муниципальных сточных вод городских очистных сооружений. Насадки ВТФ (открытопористый пенополиуретан в первой секции и невытянутое капроновое волокно – во второй) служили инертным носителем для закрепления микроорганизмов и формирования биопленки.

Проведены продолжительные испытания лабораторного экспериментального биофильтра в течение 162 сут. Причем первые 90 сут секция очистки от ЛОС работала как отдельная, для изучения удаления ЛОС как отдельных загрязнителей без потенциального перекрестного ингибирования присутствием H_2S . Далее, в течение 72 сут исследовалась одновременная очистка H_2S и ЛОС комбинированными секциями биофильтра.

Образцы биологического материала для анализа сообщества получали из насадок лабораторного экспериментального биофильтра. Также были проведены анализы сообществ пылевых фильтров реального воздушного выброса и конденсата каплеотбойника на сборном воздуховоде от четырех первичных отстойников сточных вод муниципального очистного сооружения. В качестве материала для анализа сообщества использовали полученные из биофильтров суспензии, осажденные центрифугированием. Профиль сообществ микроорганизмов биофильтра определяли по 16S рРНК.

Основные выводы. Получены консорциумы активных микроорганизмов, служащие возможным источником целевых штаммов сероокисляющих бактерий и гетеротрофных культур микроорганизмов, участвующих в деградации ЛОС. Установлено, что сообщество секции очистки от ЛОС сформировалось в результате длительной и многоэтапной адаптации. Переход к новым условиям привел к полной перестройке микробного сообщества: с доминирующих родов *Brevibacterium* 24,2%, *Rhodococcus* 10,4% и *Ochrobactrum* 3,8% на новые *Paracoccus* 39%, *Brevundimonas* 10%, *Pusillimonas* 5%, при сохранении *Ochrobactrum* на том же уровне. Это свидетельствует о высокой адаптационной способности сообщества к смене питательной среды и типу загрязнителей, сохраняя при этом высокую общую эффективность. Сообщество секции очистки от H_2S сформировалось спонтанно, несмотря на целенаправленную инокуляцию чистой насадки нейтральными сероокисляющими бактериями. Тем не менее, удалось получить структуру сообщества, ориентированного на утилизацию сероводорода и s-содержащих соединений, вероятно, за счет деятельности представителей родов *Paracoccus*, *Sphingopyxis*, *Brevundimonas*, *Aequorivita*, *Pseudaminobacter*, *Alcaligenes*, *Bordetella* и *Xanthomonas*.

Показано, что состав бактериальных сообществ проб, свидетельствующий об условиях культивирования и источниках биомассы, кардинально влияет на формирование доминирующих таксонов. Исходная проба биомассы пылевого воздушного фильтра реального воздушного выброса на сборном воздуховоде от четырех первичных отстойников сточных вод муниципального очистного сооружения (АО «Мосводоканал», Москва, Россия) характеризовалась более широким спектром таксонов, при этом значительные доли занимали облигатные и факультативные анаэробы (*Romboutsia* 22%, *Clostridium* 4%, *Methanoculleus* 1%) и в целом отражала специфический состав сообществ сточных вод канализационных сооружений. Дальнейшее создание селективных условий позволило сформировать целевую группу микроорганизмов, использующих серу как основной источник энергии. Сообщество, полученное из конденсата каплеотбойника на сборном воздуховоде от четырех первичных отстойников сточных вод муниципального очистного сооружения (АО «Мосводоканал», Москва, Россия), представляет собой специфический состав сообщества, адаптированного к кислым условиям (*Acidocella* 31% и *Acidithiobacillus* 5%). Наличие *Acidithiobacillus* (*Acidithiobacillus thiooxidans* при совпадении 77%), классического сероокисляющего микроорганизма, подтверждает потенциальную способность сообщества к окислению серы и s-содержащих соединений, в том числе сероводорода.

Установлено, что средняя эффективность удаления (ЭУ) по H_2S лабораторного экспериментального биофильтра составила $98,7 \pm 1,6\%$, ЭУ по ЛОС за период наблюдения 54 сут составила $71 \pm 10\%$ – по данным газохроматографического анализа и 100% – по данным замеров массовой концентрации газоанализатором.

Литература

1. Barbusiński, K. Removal of Odors (Mainly H_2S and NH_3) Using Biological Treatment Methods / K. Barbusiński, A. Parzentna-Gabor, D. Kasperczyk // Clean Technol. – 2021. – Vol. 3, iss. 1. – P. 138–155.
2. Czarnota, J. Wastewater Treatment Plants as a Source of Malodorous Substances Hazardous to Health, Including a Case Study from Poland / J. Czarnota, A. Masłoń, R. Pajura // Int. J. Environ. Res. Public Health. – 2023. – Vol. 22, iss. 7. – P. 5379.
3. Removal of terpenes in the presence of easily degradable compounds during biofiltration of gas emissions from composting of municipal solid waste / V. Zhukov [et al.] // Journal of Environmental Management. – 2024. – Vol. 372. – P. 123162.
4. Synthetic microbial consortia to enhance the biodegradation of compost odor by biotrickling filter / Q. Su [et al.] // Bioresour Technol. – 2023. – Vol. 387. – P. 129698.

Efremova Kristina Valerevna

RESEARCH CENTER OF BIOTECHNOLOGY RAS

MICROBIOLOGICAL PURIFICATION OF AIR EMISSIONS FROM HOUSING AND UTILITY ENTERPRISES

Abstract. Pollutant emissions from housing and utilities are a serious problem, especially in densely populated areas. The expansion of urban areas and the consistent tightening of air quality regulations make exhaust gas treatment technologies from sewage pumping stations and treatment facilities particularly in demand.

At this stage of the study, the composition of the microbial community of the wet-bed biofilter's biocatalyst was determined and experimentally tested using model gas mixtures containing hydrogen sulfide and volatile organic compounds. The study identified the optimal microbial community composition, whose metabolic activity, according to gas analyzer data, ensured a hydrogen sulfide

removal efficiency of 98.7% and a volatile organic compound removal efficiency of 71-100%.

Keywords: biofiltration, hydrogen sulfide, volatile organic compounds, gas-air emissions, microbial community.

Исследования проводятся в рамках выполнения проекта Технология биофильтрации воздушных выбросов НЦМУ «Высокотехнологичная биоэкономика».

Илясов Игорь Олегович

Аспирант ФИЦ Биотехнологии РАН 2 года обучения

научная специальность 1.5.4 Биохимия

e-mail: ilyasov.igor.99@mail.ru

Научный руководитель

Бойко Константин Михайлович

кандидат биологических наук

с.н.с. лаборатории инженерной энзимологии



**СТРУКТУРНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ПРИ РАЗРАБОТКЕ
ТЕРАПЕВТИЧЕСКИХ АНТИТЕЛ И ИММУНОГЕНОВ:
ОПРЕДЕЛЕНИЕ МЕХАНИЗМА НЕЙТРАЛИЗАЦИИ
ТЯЖЕЛОЦЕПОЧЕЧНЫХ АНТИТЕЛ К КЛОСТРИДИЙНОМУ
ТОКСИНУ И ГЕМАГГЛЮТИНИНУ ГРИППА, РАЦИОНАЛЬНАЯ
ОПТИМИЗАЦИИ АНТИГЕНА ДЛЯ ВАКЦИНОПРОФИЛАКТИКИ
ВИЧ**

Аннотация. Структурное исследование комплексов нейтрализующих антител с их мишенями не только существенно расширяет возможности оценки их терапевтического потенциала, но и позволяет провести оптимизацию антител и направленный дизайн новых антиген-связывающих агентов, а также компонентов рекомбинантных вакцин. В данной работе описывается структурное исследование следующих нейтрализующих антител с их целевыми мишенями с потенциалом практического медицинского применения: антитела A3.2 и F12.2 к токсину B *Clostridioides difficile*, а также антитело G2.3 к гемагглютинирующему вирусу гриппа H1N1. Также приведены текущие результаты по структурно-ориентированному дизайну белка E_{nv} ВИЧ-1 с целью создания вакцинного кандидата для специфической активной иммунопрофилактики ВИЧ-1 инфекции.

Ключевые слова: моноклональные антитела, однодоменные антитела, широконейтрализующие антитела, грипп, гемагглютинин, TcdB, ВИЧ, *Clostridioides difficile*.

Объем мирового рынка моноклональных антител превышает 300 миллиардов долл. США, они являются эффективным средством для профилактики и лечения ряда инфекционных заболеваний. Особый интерес представляют тяжелоцепочечные антитела, найденные у представителей сем. *Camelidae*, лишенные легких цепей и имеющие более компактный антигенсвязывающий участок в сравнении с каноническими антителами

позвоночных. Изолированные переменные домены тяжелоцепочечных антител (однодоменные антитела) способны лучше распознавать труднодоступные эпитопы, обладают относительно высокой стабильностью и низкой стоимостью производства. 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, предложить механизм нейтрализации и создать базис для последующей оптимизации антитела и улучшения его свойств.

Целью данной работы является получение и структурная характеристика комплексов нейтрализующих антител с их целевыми мишенями, имеющими потенциал практического медицинского применения. Предметом исследования стали следующие объекты: тяжелоцепочечное антитело A3.2 и однодоменное антитело F12.2 к различным доменам токсина В *Clostridioides difficile* (TcdB), тяжелоцепочечное антитело G2.3 к гемагглюнину вируса гриппа N1H1 и широконейтрализующее антитело VRC01 к поверхностному белку Env вируса иммунодефицита человека 1 (ВИЧ-1). Для каждого из объектов исследования были поставлены следующие задачи:

1. Получить антиген и антитело в количествах и с чистотой, необходимых для последующих структурных исследований, выделить и охарактеризовать соответствующий комплекс антиген-антитело биохимическими и физико-химическими (электронная микроскопия в варианте негативного окрашивания) методами.

2. Получить криоЭМ данные для указанных комплексов, провести их первичную обработку, 3D-реконструкцию и уточнение полученных структур, а также их сравнительный анализ.

1. Антитела к токсину В *Clostridioides difficile*. *Clostridioides difficile*-ассоциированная инфекция (CDI) является одной из самых распространенных внутрибольничных инфекций и основной причиной антибиотик-ассоциированной диареи. Известно, что уровни сывороточных антител к ключевым факторам патогенности, токсинам А и В, снижают тяжесть первичной CDI, в связи с чем иммунотерапия может стать перспективным методом лечения этого заболевания. Ранее в НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи была получена панель однодоменных антител к токсину В, среди которых клоны A3.2 и F12.2 оказались одними из самых активных в подавлении цитотоксического действия токсина В. При этом эпитопы и механизмы нейтрализации указанных антител были неизвестны. Для прояснения

указанных вопросов методом криоЭМ были получены структурные данные для комплексов антител с полноразмерным токсином.

На двух полученных криоЭМ картах комплексов инаktivированного TcdB (aTcdB) с антителами A3.2 (среднее разрешение 3.6 Å) и F12.2 (3.43 Å) хорошо детализируется структурная организация токсина B, состоящего из четырех доменов: N-концевого гликозилтрансферазного домена, аутопротеазного домена, домена доставки и C-концевого домена CROPs. По данным анализа структур эпитоп антитела A3.2 локализован в высококонсервативном сайте на поверхности четырехспирального участка гликозилтрансферазного домена, а эпитоп антитела F12.2 был выявлен на поверхности фрагмента домена CROPs. Полученные структурные данные позволили идентифицировать остатки, участвующие в образовании эпитопа, провести детальный анализ интерфейса взаимодействия и предложить механизм нейтрализации токсина указанными антителами.

2. Антитело G2.3 к гриппу H1N1. Сезонный грипп считается одной из самых распространенных и контагиозных респираторных инфекций, вызывая около 650 000 смертей ежегодно, причем большинство зарегистрированных случаев приходится на грипп A (H1N1 и H3N2). В настоящее время основным средством борьбы с инфекцией остается вакцинопрофилактика, однако, ее применение имеет ряд ограничений, для которых иммунотерапия может стать хорошим альтернативным решением. Одной из мишеней для широконейтрализующих антител является поверхностный тримерный вирусный белок гемагглютинин (HA) с умеренно консервативными областями в области «стеблевого» домена (SD). Ранее в НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи была получена серия однодоменных антител к SD, среди которых клон G2.3 оказался одним из самых аффинных и широконейтрализующих. Для структурных исследований был получен комплекс антитела G2.3 с HA H1N1. По результатам криоЭМ эксперимента была проведена реконструкция структуры комплекса с разрешением 2.53 Å. Полученные данные позволили картировать антиген и идентифицировать остатки, участвующие в образовании интерфейса антиген-антитело. Также было показано, что в эпитопе G2.3 находится консервативный сайт N-гликозилирования, гликан которого, по-видимому, способен взаимодействовать с антителом.

3. Широконейтрализующее антитело VRC01 к тримерному белку Env ВИЧ-1. Одним из многообещающих подходов разработки вакцины против ВИЧ-1 является структурно-ориентированный дизайн иммуногенов на основе консенсусных последовательностей вариантов ВИЧ-1, направленный на повышение аффинности к известным предшественникам широконейтрализующих антител (гермлайн-вариантам антител), таких как

линия VRC01. В НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи был создан иммуноген на основе консенсусной последовательности российских штаммов ВИЧ-1 (CON-RUS SOSIP-v.9.3_GT01), с которым эффективно связывается антитело VRC01, но не его гермлайн-вариант. Получение структурных данных для комплекса CON-RUS SOSIP-v.9.3_GT01 с VRC01 позволит сформулировать предложения для рациональной модификации антигена с целью увеличения аффинности к нему гермлайн-варианта VRC01.

По данному направлению было проведено предварительное структурное исследование полученного антигена, CON-RUS SOSIP-v.9.3_GT01, методом просвечивающей электронной микроскопии с негативным контрастированием. Анализ 2D-классов полученных изображений показал, что белок находится в тримерной форме и преимущественно в закрытой конформации, распознаваемой антителом VRC01. Получены криоЭМ данные для антигена, обработка которых проводится в настоящее время. Получен комплекс CON-RUS SOSIP-v.9.3_GT01 с антителом VRC01 для проведения криоЭМ эксперимента.

Основные выводы

1. Получены криоЭМ структуры комплекса аТcdB с антителами A3.2 и F12.2 со средним разрешением 3.6Å и 3.4Å соответственно. На основе полученных данных картированы эпитопы, охарактеризованы детали взаимодействия и предложен механизм нейтрализации.
2. Получена структура тримера гемагглютиниона с антителом G2.3 с разрешением 2.5 Å. Анализ структуры позволил охарактеризовать эпитоп, предложить механизм нейтрализации и объяснить роль найденных эскейп-мутаций.
3. Выделен и структурно охарактеризован иммуноген на основе консенсусной последовательности поверхностного белка Env российских штаммов ВИЧ-1 (CON-RUS SOSIP-v.9.3_GT01). Получен комплекс антигена с антителом VRC01 для криоЭМ исследований.

Список публикаций по теме работы

Статьи

1. Favorskaya I. A. et al. Production and Structural-Functional Characterization of a Recombinant HIV-1 Env Trimer Based on the Consensus Sequence of the Most Prevalent Strains in the Russian Federation //Russian Journal of Bioorganic Chemistry. – 2026. – Т. 52. – №. 3. – С. 80.
2. Ilyasov. I.O. et al. Structural basis of influenza A virus neutralization by broadly reactive single-domain antibody G2.3 recognizing glycosylated epitope

within hemagglutinin stem domain // International Journal of Biological Macromolecules. – 2026. (Minor revision).

Тезисы

1. Илясов И.О. и др. Исследование механизма нейтрализации вируса гриппа А однодоменным антителом G2.3 // Сборник трудов Курчатовского геномного форума 2025 — 2025: Сб. тез. / ФГБУ «Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт». – Москва: НИЦ «Курчатовский институт», 2025. – С.256-257

Ilyasov Igor Olegovich
RESEARCH CENTER OF BIOTECHNOLOGY RAS

STRUCTURAL STUDIES IN THE DEVELOPMENT OF THERAPEUTIC ANTIBODIES AND IMMUNOGENS: DETERMINATION OF THE MECHANISM OF NEUTRALIZATION OF HEAVY-CHAIN ANTIBODIES TO CLOSTRIDIODES TOXIN AND INFLUENZA HEMAGGLUTININ, RATIONAL OPTIMIZATION OF ANTIGEN FOR HIV VACCINATION

Abstract. Structural studies of neutralizing antibody complexes with their targets not only significantly expand the possibilities for assessing their therapeutic potential but also enable antibody optimization and targeted design of new antigen-binding agents, as well as recombinant vaccine components. This paper describes the structural study of the following neutralizing antibodies with their target proteins with potential for practical medical application: A3.2 and F12.2 to *Clostridioides difficile* toxin B as well as G2.3 to the hemagglutinin of the H1N1 influenza virus. Current results on the structure-based design of the HIV-1 Env protein are also presented, with the aim of creating a vaccine candidate for specific active immunoprophylaxis of HIV-1 infection.

Key words: monoclonal antibodies, single-domain antibodies, broadly neutralizing antibodies, influenza, hemagglutinin, TcdB, HIV, *Clostridioides difficile*.

Колесов Денис Эдуардович

аспирант ФИЦ Биотехнологии РАН 2 года обучения
научная специальность 1.5.3 Молекулярная биология
e-mail: 52ru111@mail.ru

Научный руководитель

Рузов Алексей Сергеевич

кандидат биологических наук, профессор
с.н.с, руководитель группы РНК-эпигенетики и
механизмов геномной стабильности



СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ РАСПРЕДЕЛЕНИЯ R-ПЕТЕЛЬ В КЛЕТКАХ ПЛОСКОКЛЕТОЧНОГО РАКА ШЕЙКИ МАТКИ

Аннотация. Выполнено полногеномное профилирование R-петель (DRIP-seq) и модификации N6-метиладенозина в составе РНК-компонентов R-петель (DIP-m6A) в линии SiHa (плоскоклеточный рак шейки матки, эктодермальное происхождение), а также полнотранскриптомное секвенирование линии SK-UT-1B (лейомиосаркома матки, мезодермальное происхождение). Проведен сравнительный анализ распределения R-петель и паттернов m6A-модификаций между различными типами клеток. Показана связь наличия в генах R-петель с уровнем их экспрессии.

Ключевые слова: R-петли, N6-метиладенозин (m6A), комплекс BAF (SWI/SNF), опухолевые линии, DRIP-seq.

R-петли — трехцепочечные структуры, состоящие из гибрида ДНК-РНК и смещенной цепи одноцепочечной ДНК, — играют двойственную роль в биологии клетки: они участвуют в регуляции транскрипции, но при этом являются потенциальным источником геномной нестабильности [1]. Геномное распределение R-петель специфично для различных типов клеток и может быть связано с процессами злокачественной трансформации. Важную роль в регуляции стабильности R-петель играет модификация N6-метиладенозина (m6A) в составе их РНК-компонента [2]. Показано, комплекс ремоделирования хроматина BAF (SWI/SNF), мутирующий примерно в 20% всех видов рака у человека, вовлечен в контроль формирования и разрешения R-петель [3], однако механизмы этой регуляции остаются невыясненными.

Целью данной работы является установление причинно-следственной связи между активностью комплекса BAF и пространственной организацией

R-петель в геноме. В качестве модельной опухолевой линии использовались клетки SiHa (плоскоклеточный рак шейки матки). Для данной линии выполнено картирование R-петель и модификаций РНК при помощи иммунопреципитации с антителами S9.6 и anti-m6A соответственно. Полученные наборы данных использовались для сравнения с линией HAP1 и плюрипотентными клетками человека.

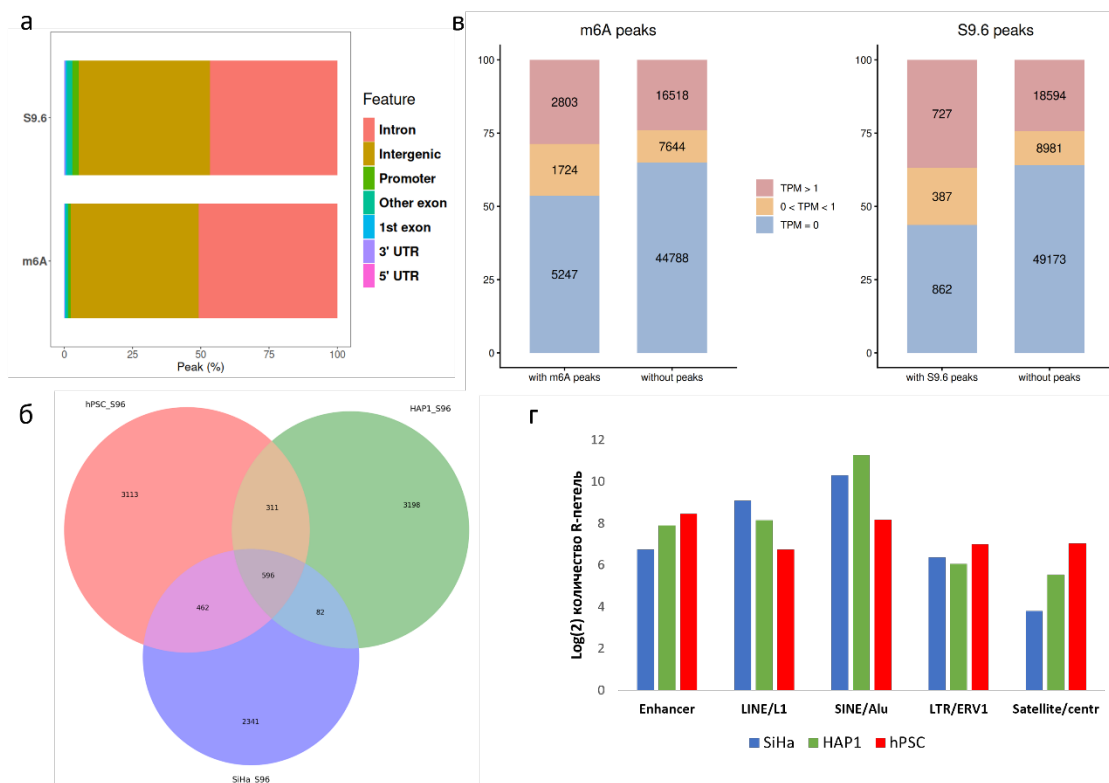


Рис 1. Распределение m6A и R-петель в клеточных линиях. а) Геномная аннотация пиков m6A и S9.6. Представлено относительное распределение пиков по функциональным областям генома: интроны, межгенные регионы, промоторы, экзонные области, 5'- и 3'-нетранслируемые области (UTR), а также первые экзоны. б) Диаграммы Венна для R-петель в клеточных линиях hPSC, HAP1 и SiHa, пересекающиеся области соответствуют общим пикам. в) Связь наличия m6A- и S9.6-пиков с уровнем транскрипции генов. Гены разделены на группы в зависимости от уровня экспрессии. г) Сопоставление геномных координат R-петель для линий hPSC, HAP1 и SiHa с элементами генома из аннотации hg38.

Попарное сравнение профилей R-петель в трех клеточных линиях выявило низкое сходство между образцами: для каждой пары общими являлись только 19-28% пиков, при этом наиболее низкое сходство обнаруживается между образцами опухолевых линий (индекс Жаккара 0.21). В целом, от 75% пиков в каждой линии были уникальными, что свидетельствует о сильной зависимости распределения R-петель от клеточного контекста.

Среди генов, ассоциированных с пиками, увеличивается доля транскрипционно-активных локусов, а также снижается доля генов, для которых экспрессия не детектируется (TPM = 0). Для обоих типов сигналов наблюдается преимущественная локализация пиков в межгенных регионах и интронах, которые составляют основную долю обнаруженных участков связывания.

В раковых клетках наблюдается значительное накопление R-петель в ретротранспозонах SINE/Alu и LINE/L1, что может отражать дерепрессию мобильных элементов и сопутствующий репликативный стресс — ключевой фактор геномной нестабильности при канцерогенезе. В то же время, в hPSC большее количество R-петель присутствует на эндогенных ретровирусных элементах LTR/ERV1, что согласуется с литературными данными о необходимости этих повторов для поддержания плюрипотентности.

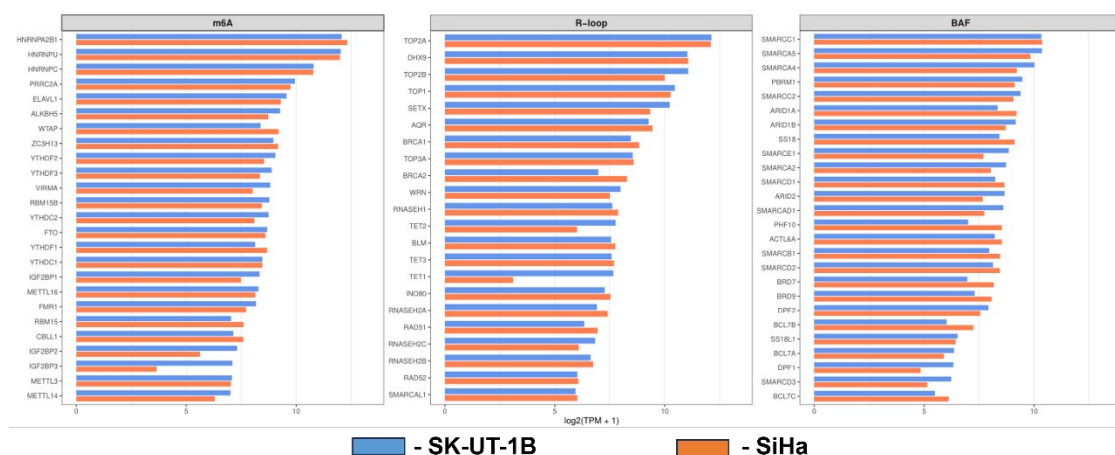


Рис 2. Сравнение уровней экспрессии панелей генов для связанных с m6A-модификацией РНК, R-петлями и комплексом BAF генов в линиях SiHa и SK-UT-1B.

Для линий SiHa и SK-UT-1B дополнительно было выполнено полнотранскриптомное секвенирование для оценки экспрессии генов, отвечающих за метаболизм m6A-РНК, ДНК:РНК-гибридов, а также генов, соответствующих субъединицам комплекса BAF.

Показаны уровни экспрессии ключевых компонентов, участвующих в установке, распознавании и удалении m6A-модификации. Наиболее высокий уровень экспрессии демонстрируют гены, соответствующие белкам из семейства гетерогенных ядерных рибонуклеопротеинов, которые регулируют жизненно важные клеточные процессы, включая сплайсинг мРНК, транспорт и стабилизацию транскриптов. Отмечен высокий уровень экспрессии генов, участвующих в регуляции топологии ДНК (TOP2A и TOP1) и умеренный для RNaseH1, отвечающей за разрешение R-петель. Среди компонентов

комплекса BAF наблюдается высокий уровень экспрессии как структурных (SMARCC1) субъединиц, так и каталитических АТФаз (SMARCA2 /SMARCA4), а также субъединиц, отвечающих за распознавание ДНК и гистонов (ARID1A /ARID1B).

Подробная характеристика роли ядерного белка HNRNPA2B1, а также отдельных субъединиц комплекса BAF в метаболизме R-петель будет являться предметом дальнейших исследований.

Основные выводы

Выполнено полногеномное картирование R-петель и модификаций m⁶A в линии SiHa, проведено сравнение с линиями HAP1 и плюрипотентными клетками человека (hPSC). Показано, что распределение R-петель сильно зависит от типа клеток и коррелирует с уровнем экспрессии генов. Для линий SiHa и SK-UT-1B выявлены наиболее высокоэкспрессируемые гены, соответствующие субъединицам комплекса BAF и белкам, отвечающим за метаболизм m⁶A-РНК и R-петель.

Литература

1. Li F. и др. R-Loops in Genome Instability and Cancer // *Cancers* (Basel). 2023. Т. 15, № 20. С. 4986.
2. Abakir A., Ruzov A. A model for a dual function of N⁶-methyladenosine in R-loop regulation // *Nat Genet*. 2024. Т. 56, № 10. С. 1995–1998.
3. Kadoch C., Crabtree G. R. Mammalian SWI/SNF chromatin remodeling complexes and cancer: Mechanistic insights gained from human genomics // *Sci Adv*. 2015. Т. 1, № 5. С. e1500447.

Denis Eduardovich Kolesov

RESEARCH CENTER OF BIOTECHNOLOGY RAS

COMPARATIVE GENOME-WIDE ANALYSIS OF R-LOOP DISTRIBUTION IN SQUAMOUS CELL CARCINOMA

Abstract. We performed genome-wide profiling of R-loops (DRIP-seq) and N⁶-methyladenosine (m⁶A) modifications in the RNA component of R-loops (DIP-m⁶A) in the SiHa cell line (cervical squamous cell carcinoma, ectodermal origin). Additionally, we conducted whole-transcriptome sequencing of the SK-UT-1B cell line (uterine leiomyosarcoma, mesodermal origin). We found that

R-loop distribution and m⁶A modification patterns in SiHa are cell-type specific, and that the presence of R-loops in genes correlates with their expression levels.

Keywords: R-loops, N⁶-methyladenosine (m⁶A), BAF (SWI/SNF) complex, tumour cell lines, DRIP-seq.

Работа выполнена при поддержке РФФИ (грант № 22-65-00022)

Косякова Анастасия Игоревна

аспирант ФИЦ Биотехнологии РАН 2 года обучения

научная специальность 1.5.11 Микробиология

e-mail: AnastasiaaKosyakova@yandex.ru

Научный руководитель

Буракова Ольга Сергеевна

кандидат биологических наук

с.н.с. лаборатории реликтовых микробных

сообществ



ФИКСАЦИЯ АЗОТА И АНОКСИГЕННЫЙ ФОТОСИНТЕЗ У НЕГЕТЕРОЦИСТНОЙ ЦИАНОБАКТЕРИИ SODALINEMA SP. P-1104

Аннотация. В работе были исследованы особенности фиксации атмосферного азота и аноксигенного фотосинтеза у негетероцистной цианобактерии *Sodalinema* sp. P-1104, выделенной из содового озера. Показано, что азотфиксация осуществляется только при чередовании световых и темновых фаз как в аэробных, так и в анаэробных условиях. Установлено, что добавление сульфидов стимулирует азотфиксацию, а в условиях ингибирования оксигенного фотосинтеза может полностью ее обеспечивать за счет аноксигенного фотосинтеза. Также, радиоизотопным методом была подтверждена способность штамма к сульфид-зависимому фотосинтезу. Филогенетический анализ генов, кодирующих нитрогеназу, указывает, что межфилумный горизонтальный перенос *nif*-оперона мог произойти в содовых условиях от натронофильных сульфатредуцирующих бактерий семейства *Desulfonatronovibrionaceae*.

Ключевые слова: цианобактерии, содовые озера, азотфиксация, натронофильные цианобактерии, аноксигенный фотосинтез.

Цианобактерии являются ключевыми первичными продуцентами и азотфиксаторами в содовых озерах. Несмотря на наличие генов азотфиксации у ряда негетероцистных натронофильных цианобактерий, их функциональная активность и физиологические особенности фиксации атмосферного азота остаются неизученными. Особый интерес представляет род *Sodalinema*, представители которого широко распространены в содовых и соленых щелочных водоемах по всему миру и обладают нитрогеназным опероном анаэробного («desulfo») типа, приобретенным в результате горизонтального переноса генов от сульфатредуцирующих бактерий.

Цель работы заключалась в установлении способности негетероцистной цианобактерии *Sodalinema* sp. P-1104, выделенной из содового озера и обладающей нитрогеназой анаэробного типа, к азотфиксации и аноксигенному фотосинтезу, а также в выяснении влияния сульфида на эти процессы. Диазотрофную активность оценивали методом ацетиленредукции, а способность к аноксигенному фотосинтезу – методом ассимиляции радиоактивно меченого углерода в форме бикарбоната ($\text{H}^{14}\text{CO}_3^-$).

В результате впервые показано, что *Sodalinema* sp. P-1104 способна к фиксации атмосферного азота в лабораторной культуре. Причем исключительно при чередовании световой и темновой фаз инкубирования (Kosyakova et al., 2025).

Филогенетический анализ *nifHDK* генов показал, что *nif*-гены натрофильных и галофильных штаммов *Sodalinema*, а также нескольких других родов цианобактерий (преимущественно галофильных), относятся к отдельной подгруппе среди представителей *Desulfobacterota* и формируют отдельный подкластер с сульфатредуцирующими бактериями семейства *Desulfonatronovibrionaceae*, распространенными в содовых озерах (Рис. 1). Полученные данные указывают на то, что межфилумный горизонтальный перенос *nif*-оперона мог произойти в содовых условиях (Kosyakova et al., 2025).

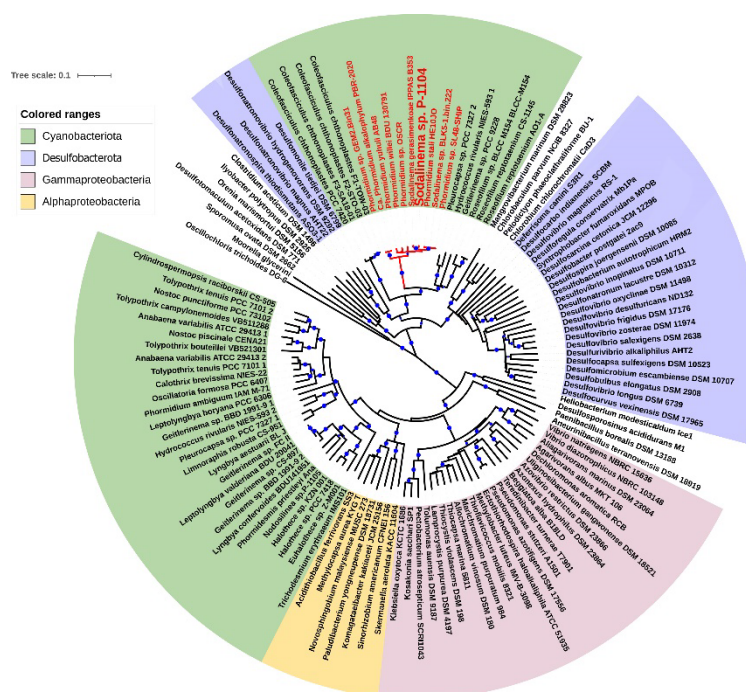


Рис. 1. Филогенетическое дерево транслированных аминокислотных последовательностей генов *nifHDK*. Синие точки обозначают бутстрэп поддержку >80%. Представители рода *Sodalinema* выделены красным цветом.

Установлено, что сульфид стимулирует фиксацию азота как в аэробных, так и в анаэробных условиях (Рис. 2). В аэробных условиях этот эффект, вероятно, связан с химическим удалением кислорода, что создает благоприятные условия для нитрогеназы. В анаэробных условиях с добавлением диурана, сульфид выступает в качестве донора электронов для аноксигенного фотосинтеза, обеспечивая энергетическую поддержку азотфиксации.

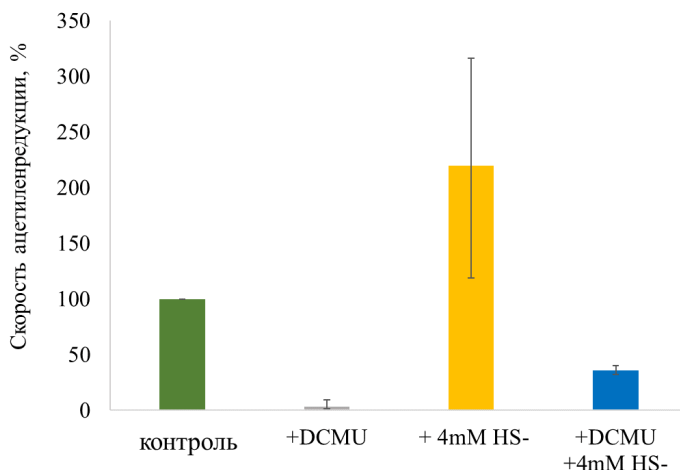


Рис. 2. Влияние добавления диурана/или сульфида на скорость ацетиленредукции штаммом *Sodalinema* sp. P-1104. Скорость ацетилена в контроле без добавок была принята за 100%. DCMU – добавление диурана, 4mM HS – добавление 4 мМ сульфида.

Также в ходе работы была установлена способность *Sodalinema* sp. P-1104 к сульфид-зависимому аноксигенному фотосинтезу. В геноме найден ген *sqc*, кодирующий фермент сульфидхионредуктазу, окисляющий сульфид и восстанавливающий пластохиноны. Кроме этого, по аминокислотной последовательности SQR представителей *Sodalinema* относится ко II типу с низкой аффинностью к сульфиду. Методом фотоассимиляции $\text{H}^{14}\text{CO}_3^-$ установлено, что добавление сульфида не ингибировало включение метки, а при ингибировании оксигенного фотосинтеза диуроном (DCMU) добавление сульфида инициировало включение метки. Причем, в условиях аноксигенного фотосинтеза (при совместном добавлении диурана и сульфида) произошло изменение соотношения ассимилированного углерода между включённым в биомассу (БМ) и в растворенное органическое вещество (РОВ) в сторону преимущественной экскреции в виде РОВ (Рис. 3).

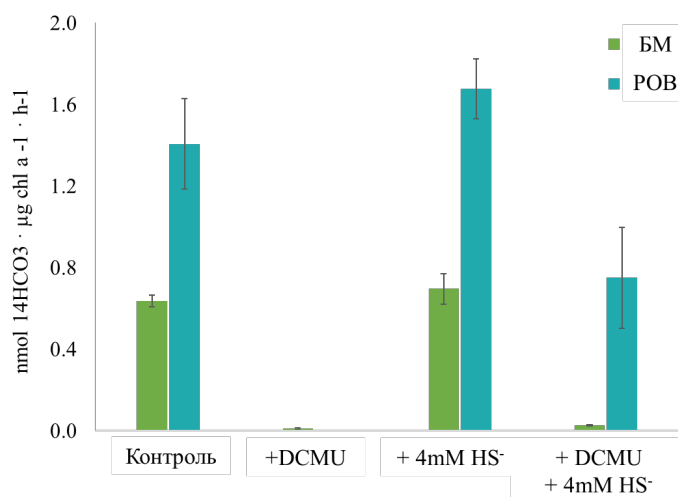


Рис. 3. Эффект диурона и/или сульфида на фотоассимиляцию $\text{H}^{14}\text{CO}_3^-$ штаммом *Sodalinema* sp. P-1104. БМ – включение в биомассу, POB – в растворенное органическое вещество. Контроль – вариант без добавок, DCMU – добавление диурона, 4mM HS⁻ – добавление 4 мМ сульфида.

Таким образом, впервые получены прямые экспериментальные данные о фиксации азота и аноксигенном фотосинтезе негетероцистной натронофильной цианобактерией рода *Sodalinema*.

Основные выводы

1. Филогенетический анализ *nif*-генов указывает на вероятный горизонтальный перенос от натронофильных сульфатредуцирующих бактерий семейства *Desulfonatronovibrionaceae*, распространенные в содовых озерах;
2. Азотфиксация возможна только при чередовании световой и темновой фаз инкубирования;
3. Штамм *Sodalinema* sp. P-1104 способен осуществлять аноксигенный фотосинтез, опосредованный ферментом SQR;
4. Сульфид стимулирует азотфиксацию как в аэробных условиях (за счёт удаления кислорода и аноксигенного фотосинтеза), так и в анаэробных условиях (является донором электронов для аноксигенного фотосинтеза).

Литература

1. Kosyakova A.I., Rusanov, I.I., Tourova, T.P., Zakharova, E.E., Sorokin, D.Y., Pimenov, N.V., Burakova, O.S. Nitrogen fixation and anoxygenic photosynthesis in filamentous non-heterocystous cyanobacterium of the genus *Sodalinema* isolated from soda lake //Plants. – 2025. – Т. 14. – №. 23. – С. 3558.

Список публикаций по теме работы

Статьи

1. Kosyakova A.I., Rusanov, I.I., Tourova, T.P., Zakharova, E.E., Sorokin, D.Y., Pimenov, N.V., Burakova, O.S. Nitrogen fixation and anoxygenic photosynthesis in filamentous non-heterocystous cyanobacterium of the genus *Sodalinema* isolated from soda lake //Plants. – 2025. – Т. 14. – №. 23. – С. 3558.

Тезисы докладов

1. Косякова А.И., Русанов И.И., Турова Т.П., Сорокин Д.Ю., Пименов Н.В., Самылина О.С. Фиксация азота и аноксигенный фотосинтез у негетероцистной цианобактерии из содового озера // 5-й Российский микробиологический конгресс: сборник тезисов докладов, место издания ВолгГМУ, Волгоград, с. 88 (устный)

Kosyakova Anastasia Igorevna

RESEARCH CENTER OF BIOTECHNOLOGY RAS

**NITROGEN FIXATION AND ANOXYGENIC PHOTOSYNTHESIS IN
NON-HETEROCYSTOUS CYANOBACTERIUM
SODALINEMA SP. P-1104**

Abstract. In this study, the features of nitrogen fixation and anoxygenic photosynthesis were investigated in the non-heterocystous cyanobacterium *Sodalinema* sp. P-1104 isolated from a soda lake. It was shown that nitrogen fixation occurs only under a light/dark cycle in both aerobic and anaerobic conditions. Sulfide addition was found to stimulate nitrogen fixation and, under inhibition of oxygenic photosynthesis, to fully support it via anoxygenic photosynthesis. The ability of the strain to perform sulfide-dependent photosynthesis was confirmed using labeled carbon assimilation. Phylogenetic analysis of nitrogenase genes suggests a possible horizontal transfer of *nif* genes from natronophilic sulfate-reducing bacteria of the family Desulfonatronovibrionaceae in soda environment.

Keywords: cyanobacteria, soda lakes, nitrogen fixation, natronophilic cyanobacteria, anoxygenic photosynthesis.

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

Макарова Анна Олеговна

аспирант ФИЦ Биотехнологии РАН 2 года обучения

научная специальность: 1.5.6 Биотехнология

e-mail: anna.makarova0@yandex.ru

Научный руководитель

Федоров Алексей Николаевич

доктор биологических наук,

г.н.с. лаборатории молекулярной биотехнологии



ИЗУЧЕНИЕ ОЛИГОМЕРИЗАЦИИ БЕЛКА ПИРУВАТ-ФОРМИАТ ЛИАЗЫ В (PflB) *E. coli in vivo*

Аннотация. До сих пор остается неизвестным механизм приобретения четвертичной структуры гомоолигомерами, а именно происходит ли олигомеризация ко- или посттрансляционно. Ранее на основании данных протеома *E. coli* были определены критерии для выбора белков, предположительно осуществляющих котрансляционную олигомеризацию, в качестве первого объекта для изучения была выбрана пируват-формиат лиаза B (PflB) *E. coli*.

На втором этапе был разработан подход, позволяющий дифференцировать ко- и посттрансляционные механизмы олигомеризации PflB, основанный на ко-экспрессии двух форм *pflB* (нативной *pflB* и *pflB*, слитой на N-конце с тиоредоксином). На очищенных препаратах белков была выбрана и оптимизирована система нативного электрофореза, которая позволила определить посттрансляционный путь формирования димера PflB.

Ключевые слова: фолдинг белков, гомоолигомеризация, пируват-формиат лиаза B.

Механизмы олигомеризации белковых комплексов, несмотря на обилие публикаций в данной области, остаются не до конца выясненными. Наше исследование направлено на изучение процесса олигомеризации белков, а именно происходит ли образование гомоолигомеров в процессе котрансляционной олигомеризации или после завершения трансляции [1,3].

На основании анализа совокупности протеомных данных нами была выдвинута идея проверки возможности реализации котрансляционного образования четвертичной структуры белковых комплексов на примере пируват-формиат лиазы *E. coli* (PflB) [2,4]. Был разработан и реализован уникальный подход к изучению процесса олигомеризации димера PflB из

субъединиц, основанный на получении двух форм белка (нативной PflB и Trx-PflB, белка PflB, слитого на N-конце с тиоредоксином). При одновременной продукции белков PflB и TrxPflB в клетке могут получиться димеры белков разного состава. При котрансляционной олигомеризации образуются димеры, состоящие из одинаковых форм белка ((PflB)₂ и (Trx-PflB)₂), а при олигомеризации в цитоплазме после полного синтеза субъединиц на рибосоме - в том числе гибриды двух форм ((PflB)₂, PflB/Trx-PflB и (Trx-PflB)₂).

Для получения разного уровня экспрессии ген *pflB* был клонирован в вектора pACYC-Duet, pRSF-Duet и pET-15b, характеризующихся разным количеством копий плазмиды на клетку, под контроль индуцибельного T7lac-промотора. Аналогичные конструкции были получены для гена *trxPflB*. Для индуцированной экспрессии генетических вариантов *pflB* (pRSF-pflB, pACYC-pflB и pET-pflB) в штамме *E. coli* BL21(DE3) были оптимизированы температура и время культивирования. Очистка целевого белка PflB была проведена методом Ni-NTA аффинной хроматографии. Аналогичным образом был получен белок Trx-PflB.

Для проверки механизма олигомеризации PflB была осуществлена совместная продукция двух форм белка (PflB и TRX-PflB) при ко-экспрессии соответствующих генов, локализованных на разных плаزمидях, в одной клетке (pRSF-TRX-pflB и pACYC-pflB). После очистки коэкспрессированных белков нативное состояние белковых комплексов было проанализировано методом нативного электрофореза.

Критическим этапом работы стал подбор оптимальной системы для анализа нативного состояния белковых комплексов. С этой целью были апробированы различные системы нативного электрофореза в полиакриламидном геле: синий нативный электрофорез (BNE), нативный электрофорез высокого разрешения (hrCNE) и диск-электрофорез в нативных условиях в различных модификациях. Наилучшее разрешение и четкость полос были достигнуты при использовании модифицированного протокола hrCNE, который и был применен для дальнейшего анализа состава олигомерных форм. В ходе электрофоретического анализа образцов, полученных после ко-экспрессии обеих форм белка, было выявлено присутствие трех дискретных полос. Две из них по электрофоретической подвижности соответствовали гомодимерам (PflB)₂ и (Trx-PflB)₂. Наличие третьей полосы с промежуточной подвижностью однозначно свидетельствует об образовании гибридного димера, состоящего из двух субъединиц (PflB/Trx-PflB). При совместной очистке двух отдельно экспрессированных форм белка

обмена субъединицами не было выявлено, что доказывается отсутствием промежуточной полосы на электрофореграмме.

Формирование гибридных олигомеров в условиях ко-экспрессии доказывает, что субъединицы PflB способны свободно взаимодействовать друг с другом после завершения их трансляции. Полученные данные позволяют сделать вывод о том, что олигомеризация гомоолигомерного комплекса PflB осуществляется посттрансляционно, после диссоциации с рибосомы новосинтезированных субъединиц PflB.

Основные выводы

1. Разработана оригинальная экспериментальная стратегия, основанная на сравнительном анализе олигомерного состава при ко-экспрессии двух форм пируват-формиат лиазы В (*pflB*), позволяющая дифференцировать ко- и посттрансляционный пути формирования комплекса.
2. Осуществлена эффективная экспрессия и ко-экспрессия *pflB* и *trxpflB* в штамме *E. coli* BL21(DE3) с последующей очисткой соответствующих белков металл-аффинной хроматографией.
3. Выбрана и оптимизирована система нативного электрофореза высокого разрешения (hrCNE) для детекции различных олигомерных состояний белка PflB.
4. Установлен посттрансляционный механизм формирования четвертичной структуры пируват-формиат лиазы В.

Литература

1. Bertolini M., Fenzl K., Kats I. et al. Interactions between nascent proteins translated by adjacent ribosomes drive homomer assembly // Science, 2021. Vol. 371. P. 57–64.
2. Schmidt A. et al. The quantitative and condition-dependent Escherichia coli proteome // Nat Biotechnol. Nature Publishing Group, 2016. Vol. 34, № 1. P. 104–110.
3. Shieh Y.-W., Minguez P., Bork P. et al. Operon structure and cotranslational subunit association direct protein assembly in bacteria // Science, 2015. Vol. 350. P. 678–680.
4. Wiśniewski J.R., Rakus D. Quantitative analysis of the Escherichia coli proteome // Data Brief. Elsevier Inc., 2014. Vol. 1. P. 7–11.

Список публикаций по теме работы

Тезисы

1. Горшкова М.А., Макарова А.О., Плеханова Н.С., Юркова М.С., Федоров А.Н. “ИЗУЧЕНИЕ БИОСИНТЕТИЧЕСКОГО СВОРАЧИВАНИЯ БЕЛКА ПИРУВАТ-ФОРМИАТ ЛИАЗЫ *ESCHERICHIA COLI* IN VIVO”, XXXVIII международная зимняя молодёжная научная школа "ПЕРСПЕКТИВНЫЕ НАПРАВЛЕНИЯ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКОЙ БИОЛОГИИ И БИОТЕХНОЛОГИИ", Сборник тезисов. Москва, 2026.
2. Горшкова М.А., Макарова А.О., Плеханова Н.С., Юркова М.С., Федоров А.Н. “Ко-трансляционная или посттрансляционная сборка? Анализ механизма фолдинга и олигомеризации пируват-формат лиазы В *Escherichia coli* в клетке”, 29-я Пушинская школа-конференция молодых ученых с международным участием «Биология – наука XXI века», Сборник тезисов. Пушино, 2026.

Makarova Anna Olegovna

RESEARCH CENTER OF BIOTECHNOLOGY RAS

INVESTIGATION OF OLIGOMERIZATION OF PYRUVATE FORMATE LYASE B (PflB) PROTEIN in *E. coli* in vivo

Abstract. The mechanism of acquisition of the quaternary structure by homooligomers remains unknown, namely, whether oligomerization occurs co- or posttranslationally. Previously, criteria for the selection of proteins suspected of carrying out cotranslational oligomerization were determined based on the data of the *E. coli* proteome. Pyruvate formate lyase B (PflB) of *E. coli* was selected as the first object for study.

At the second stage, an approach was developed that makes it possible to differentiate the co- and post-translational mechanisms of PflB oligomerization based on the co-expression of two forms of *pflB* (native *pflB* and *pflB* fused with thioredoxin at the N-terminus). A native electrophoresis system was selected and optimized on purified protein preparations, which made it possible to determine the posttranslational pathway for the formation of the PflB dimer.

Keywords: protein folding, homooligomerization, pyruvate formate lyase B.

Маркелова Екатерина Евгеньевна

*аспирант ФИЦ Биотехнологии РАН 2 года обучения
научная специальность 1.5.8 Математическая биология,
биоинформатика*

e-mail: markelova.ke@gmail.com

Научный руководитель

Ступников Алексей Ильич

*кандидат физико-математических наук
научный сотрудник НОЦ по биоинженерии*



АНАЛИЗ ПОПУЛЯЦИОННО-СПЕЦИФИЧНЫХ ИММУННЫХ ИЗМЕНЕНИЙ ПРИ ДИАБЕТЕ 2 ТИПА В РОССИИ

Аннотация. Сахарный диабет 2 типа (СД2) является полигенным заболеванием с высокой межиндивидуальной и межпопуляционной гетерогенностью механизмов патогенеза. Генетическая предрасположенность, особенности иммунных и метаболических процессов в разных популяциях могут определять доминирующие механизмы патогенеза заболевания. В работе был проведён анализ особенностей СД2 на основе секвенирования РНК отдельных (scRNA-seq) мононуклеаров периферической крови (РВМС) у пациентов с СД2 и контрольной группы из трех этнических популяций России: татар, чеченцев и якутов. На данном этапе полученные результаты демонстрируют как общие, так и популяционно-специфичные изменения иммунного ответа, включая различия в активности сигнальных путей, регуляторных модулей и трансляционных процессов.

Ключевые слова: диабет 2 типа, популяционная генетика, РВМС, секвенирование РНК отдельных клеток, scRNA-seq, иммунная регуляция, 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-специфичные 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. Были установлены наборы однонуклеотидных полиморфизмов (ОНП) со значимо отличающейся частотой в определённых популяциях, а также были обнаружены значительные различия в распределениях значений "разделённых" шкал генетического риска, характеризующих склонность пациента к определённым механизмам развития/протекания СД2 [4].

В продолжение работы первого года аспирантуры был проведен углубленный анализ одноклеточных транскриптомов РВМС, что позволило детально изучить влияние СД2 на различные иммунные линии и выявить популяционно-зависимые паттерны иммунной дисфункции. Данные прошли строгую фильтрацию качества и интеграцию с использованием метода *mrVI*, что позволило учитывать вариабельность между донорами, популяциями и статусом заболевания. Первичная аннотация клеток была выполнена с помощью *RCAv2* с последующей ручной корректировкой субкластеров, что обеспечило высокую точность идентификации всех основных типов иммунных клеток и их подтипов.

Дифференциальная представленность клеточных типов была оценена с помощью библиотеки *Milopy* на *kNN*-графах с учётом пола, возраста и взаимодействия популяция*СД2, позволяя выявить локальные изменения в клеточных состояниях. Дифференциальная экспрессия генов была проанализирована с использованием *DESeq2* по псевдобалк-суммированию с коррекцией батчей методом *ComBat-seq*. Активность сигнальных путей была оценена с использованием метода *ULM* на базе коллекций *Hallmark*, *KEGG*, *Reactome*, *WikiPathways* и *GO*, а анализ регуляторных сетей был проведён с помощью *pySCENIC* и *AUCell*. Такой комплексный подход позволил выявить согласованные и популяционно-специфичные изменения как на уровне отдельных клеточных линий, так и на системном уровне.

Анализ показал, что СД2 сопровождается глубокой трансформацией как врождённого, так и адаптивного иммунитета, и характер этих изменений зависит от популяционной принадлежности. У татар была выявлена системная провоспалительная перестройка, включающая активацию *TNF α /NF- κ B*, *IL6–JAK–STAT3*, интерферонных и стресс-ответных путей в моноцитах, NK-, T- и В-клетках, при этом подавлялись митохондриальные и трансляционные процессы. *CD4⁺* Т-клетки татар с СД2 продемонстрировали усиление цитотоксических программ, включая повышенную экспрессию *GNLY*, *GZMH*, *GZMB*, *TGFB1* и *NKG7*, что отражает смещение функционального профиля в сторону эффекторной активности. У чеченцев иммунные изменения были менее выраженными и преимущественно избирательными. Моноциты демонстрировали частичную активацию интерферон-зависимых и сосудисто-ориентированных программ, включая ремоделирование внеклеточного матрикса и ангиогенез. Т- и В-клетки показывали ограниченную активацию воспалительных и стресс-ответных путей, что указывает на частично включённую иммунную программу, менее согласованную по сравнению с татарской популяцией. У якутов выявлен альтернативный паттерн иммунной реакции при СД2, характеризующийся подавлением классических

воспалительных сигнатур и включением специализированных метаболических и трансляционных процессов. CD16⁺ и CD14⁺ моноциты якутов проявляли активность S100-сигналинга, способствующего межклеточной коммуникации, что может отражать адаптивный ответ на хронический метаболический стресс. Аналогичные тенденции наблюдались в НК-, Т- и В-клетках, демонстрируя согласованную, но отличную от других популяций траекторию иммунного ремоделирования.

Таким образом, анализ scRNA-seq данных на данном этапе показал, что сходные клинические проявления СД2 формируются различными иммунными механизмами, зависящими от популяции. Эти результаты подчеркивают необходимость учета этнической принадлежности при оценке иммунных нарушений и при разработке персонализированных терапевтических стратегий, а также предоставляют фундамент для дальнейшего мультиомиксного анализа и изучения взаимодействия генетических, иммунных и метаболических факторов при СД2. Дальнейшая комплексная интеграция геномных, транскриптомных и эпигеномных данных позволит более детально охарактеризовать особенности СД2, свойственные разным популяциям России.

Основные выводы

Секвенирование единичных клеток было проведено успешно, результаты обработаны, соотнесены с метаданными, полученными из анкетирования участников, и с данными генотипирования. Результаты работы подтверждают наличие популяционно-специфичных иммунных изменений при СД2: системного провоспалительного ответа у татар, более умеренной сосудисто-ориентированной иммунной активации у чеченцев, альтернативной адаптивной траектории у якутов. Анализ подчеркивает важность учета популяционной принадлежности при оценке иммунных нарушений и разработке персонализированных подходов к терапии 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. T. 383, № 9922. С. 1068–1083.
2. Wesolowska-Andersen A. и др. 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. T. 3, № 1. С. 100477.
3. Sirugo G., Williams S. M., Tishkoff S. A. The Missing Diversity in

Human Genetic Studies // Cell. Elsevier, 2019. Т. 177, № 1. С. 26–31.

4. Markelova E. E. и др. Genetic and phenotypic heterogeneity of type 2 diabetes across Russian ancestry groups // Front. Endocrinol. Frontiers, 2025. Т. 16.

Список публикаций по теме работы

Статьи

1. Markelova E. E. и др. Genetic and phenotypic heterogeneity of type 2 diabetes across Russian ancestry groups // Front. Endocrinol. Frontiers, 2025. Т. 16.

Тезисы докладов

1. Applying deep learning to analyze and predict the effects of chemical perturbations on single cell transcriptome. // IV Международная научная конференция Future of Biomedicine 2025. Владивосток, Россия. Сентябрь 16-22, 2025.

2. Predicting Single-Cell Gene Expression Responses to Small Molecules: A Comparative Analysis of Deep Learning Methods. // 12-я Московская конференция по вычислительной молекулярной биологии (MCCMB). Москва, Россия. Июль 31 - Август 3, 2025.

3. Предсказание изменений экспрессии генов в единичных клетках РМЖ в ответ на пертурбации с помощью методов глубокого обучения. // VII Всероссийская конференция «Опухолевые маркеры: молекулярно-генетические и клинические аспекты». Бердск, Россия. Июль 28-30, 2025.

Markelova Ekaterina Evgenievna
RESEARCH CENTER OF BIOTECHNOLOGY RAS

ANALYSIS OF POPULATION-SPECIFIC IMMUNE ALTERATIONS IN TYPE 2 DIABETES IN RUSSIA

Abstract. Type 2 diabetes mellitus (T2D) is a polygenic disorder characterized by high inter-individual and inter-population heterogeneity of pathogenic mechanisms. Genetic predisposition, as well as specific immune and metabolic programs, may define the dominant pathogenic pathways. In this study, single-cell RNA sequencing (scRNA-seq) of peripheral blood mononuclear cells (PBMC) was performed in patients with T2D and healthy controls across three Russian populations: Tatars, Chechens, and Yakuts. Results revealed both shared and population-specific immune alterations, including differences in signaling

pathway activity, regulatory module activation, and translational programs, highlighting population-dependent immune remodeling in T2D.

Keywords: type 2 diabetes, population genetics, PBMC, single-cell RNA sequencing, scRNA-seq, immune regulation, populations of Russia, Tatars, Chechens, Yakuts.

Пихтерева Валерия Александровна

аспирант ФИЦ Биотехнологии РАН 2 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



ВЫДЕЛЕНИЕ И ОПИСАНИЕ НОВЫХ ЖЕЛЕЗОРЕДУКТОРОВ ИЗ ВОДОНОСНЫХ ГОРИЗОНТОВ КАВКАЗСКИХ МИНЕРАЛЬНЫХ ВОД

Аннотация. Диссимиляционные железоредукторы играют ключевую роль в биогеохимическом цикле железа, восстанавливая минералы посредством внеклеточного переноса электронов (ЕЕТ). Несмотря на широкое филогенетическое распространение ЕЕТ, молекулярные механизмы этого процесса детально изучены лишь на двух модельных организмах — *Geobacter sulfurreducens* и *Shewanella oneidensis*. Предсказание способности к внеклеточному переносу электронов на основе метагеномных данных сопряжено с высоким риском ошибок из-за ограниченности наших знаний о функциональной роли генов у большинства микроорганизмов. Целью настоящей работы является экспериментальное изучение особенностей дыхательного метаболизма анаэробных прокариот, трансформирующих минералы железа, с использованием лабораторной коллекции и новых изолятов.

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

Железо - четвёртый по распространённости элемент земной коры. Его биогеохимический цикл неразрывно связан с активностью микроорганизмов. Предполагается, что трансформация соединений железа - один из древнейших путей хемосинтеза, возникший на ранних этапах эволюции прокариотной биосферы Земли (Заварзин, 2004). Большая часть Fe(III) в природных условиях присутствует в форме труднорастворимых оксидов и гидроксидов, и только в кислых средах (pH <3) его растворимость значительно возрастает (Schwertmann & Cornell, 2000). Следовательно, в большинстве природных экосистем (почвы, донные осадки, подземные воды) микробная трансформация железа практически полностью осуществляется внеклеточно.

Окислительно-восстановительные реакции с участием соединений железа характеризуются высоким энергетическим выходом, вследствие чего микроорганизмы их трансформирующие широко распространены в различных местообитаниях (Wang et al., 2025). Основным механизмом микробного восстановления и окисления минералов железа в природных условиях является внеклеточный перенос электронов (extracellular electron transfer, EET). В восстановительной ветви биогеохимического цикла железа ключевую роль играют диссимиляционные железоредукторы, в процессе жизнедеятельности которых образуются такие широко распространённые в природе минералы, как магнетит (Fe_3O_4), сидерит (FeCO_3) и минералы группы зеленой ржавчины (green rust) (Walker, 1987).

В последние годы становится очевидным, что способность к EET широко распространена у представителей различных филогенетических групп прокариот (Digel et al., 2024). Так, данные сравнительной геномики подтвердили наличие генов, участвующих в EET, не только у классических объектов исследования этого механизма - представителей родов *Geobacter* и *Shewanella*, но и у других таксономических групп прокариот, включая некоторых монодермных бактерий (Gavrilov et al., 2021). К сожалению, наше понимание молекулярных механизмов EET по-прежнему базируется на детальном изучении всего двух модельных дидермных организмов — *Geobacter sulfurreducens* и *Shewanella oneidensis* (Digel et al., 2024). Это приводит к тому, что предсказание способности к внеклеточному переносу электронов только на основе метагеномных данных на современном этапе сопряжено с высоким риском ошибок, поскольку отсутствует возможность корректной интерпретации функциональной роли многих выявленных генов у микроорганизмов разных функциональных групп, не связанных с металлоредукцией (Digel et al., 2024).

Расширение знаний о механизмах восстановления минералов железа и разнообразии микроорганизмов, осуществляющих этот процесс, имеет важное значение для различных областей биотехнологии — от биоремедиации до создания микробных топливных элементов (Logan et al., 2019). Настоящее исследование направлено на экспериментальное изучение особенностей дыхательного метаболизма анаэробных прокариот, трансформирующих минералы железа, с использованием чистых культур, выделенных из природных местообитаний.

В рамках диссертационной работы из пробы воды, добываемых из скважины 1-бис-э Ессентукского месторождения минеральных вод, была получена накопительная, а затем чистая культура железовосстанавливающей бактерии, обозначенной как штамм Ez-97. Клетки данной бактерии

представляли подвижные неспорообразующие палочки с грамтрицательной клеточной стенкой. Штамм Ez-97 рос в диапазоне температур от 25 до 58 °С с оптимумом при 55°С. Рост при 20 и 60°С отсутствовал. Диапазон pH роста при Т 55 °С составлял от 5,3 до 7,9 с оптимумом в интервале 6,8–7,1. При pH ниже 5,1 или выше 8,1 рост не наблюдался. Бактерия не нуждалась в хлориде являясь галотолерантом - рост наблюдался при концентрациях NaCl от 0 до 7% с оптимумом 0–0,2%. Новый штамм являлся облигатным хемоорганогетеротрофом, способным к брожению и анаэробному дыханию. Субстратами для роста могли служить арабиноза, галактоза, глюкоза, ксилоза, мальтоза, манноза, рамноза, фруктоза, целлобиоза, альгинат, аморфный хитин, галактан, гуаровая камедь, декстрин, камедь рожкового дерева, КМЦ, крахмал, ксантановая камедь, ксилан, маннан, пектин (цитрусовый), говяжий экстракт, дрожжевой экстракт, желатин, пептон, ацетат, лактат, пируват. Штамм Ez-97 не был способен к литоавтотрофному росту в атмосфере H₂/CO₂. В процессе анаэробного дыхания с использованием ацетата как субстрата, микроорганизм использовал в качестве акцептора электронов ферригидрит или Fe(III)-цитрат, арсенат, элементарную серу, тиосульфат, нитрит. Добавление кислорода в газовую фазу ингибировало рост микроорганизма. Основными продуктами брожения на глюкозе были ацетат, лактат, H₂ и CO₂. Штамм Ez-97 оказался резистентен к стрептомицину, полимиксину В и канамицину. Рифампицин, ампициллин и бензилпенициллин полностью подавляли рост штамма. Для установления таксономического положения выделенной бактерии было проведено секвенирование ее генома. Филогенетический анализ показал, что штамм Ez-97 представляет новый вид в роде *Melioribacter*. На основании выявленных характерных фенотипических отличий, нами было предложено название *Melioribacter aerophobius* sp. nov..

В прошлый отчетный период из пробы вод, добываемых из скважины 47 Нагутского месторождения минеральных вод, была получена накопительная культура термофильных железоредуцирующих бактерий, использующих в качестве донора и акцептора электронов H₂ и синтезированный ферригидрит, соответственно. Профилирование сообщества по гену 16S рРНК выявило накопление фило типа, относящегося к недавно описанному порядку *Anaerosomatales* (Khomyakova et al., 2022). Методом предельных разведений и варьированием температуры инкубирования была получена чистая культура штамма Ng-26. Для уточнения таксономического положения, был отсеквенирован геном микроорганизма и проведен филогенетический анализ, установивший, что штамм Ng-26 представляет новый род в семействе *Anaerosomataceae* (Khomyakova et al., 2022). Физиологическое описание данного микроорганизма запланировано на следующий год.

Также в подотчетный период был проведен поиск и выявление геномных детерминант окисления и восстановления железа у представителей порядка *Anaerosomatales* класса *Coriobacteriia*. Порядок *Anaerosomatales* представляет собой новую группу монодермных актиномицетов, большинство представителей которых являются типичными органотрофами. Однако выделенный ранее штамм *Parvivirga hydrogeniphila* демонстрирует нехарактерный для этой группы метаболизм, поскольку эта бактерия является облигатным диссимиляционным железоредуктором, использующим только водород или формиат в качестве субстрата (Khomyakova et al., 2022). Это делает представителей порядка *Anaerosomatales* уникальной моделью для изучения эволюции и механизмов внеклеточного переноса электронов у монодермных бактерий.

В работе использовались метагеномы, полученные из накопительных культур, выделенных из проб лечебных грязей озера Тамбукан (Pikhtereva et al., 2024) и воды и песчаных осадков Горячинских азотных терм (Байкальская рифтовая зона) (Zavarzina et al., 2024). Ключевым фактором, позволившим осуществить накопление представителей порядка *Anaerosomatales*, стали селективные условия: в качестве акцептора электронов использовали ферригидрит, а единственным донором электронов служили молекулярный водород или формиат. Филогенетический анализ показал, что большинство детектированных филотипов представляют собой новые, ранее не культивируемые виды, роды и семейства порядка *Anaerosomatales*. Характерный генный кластер с мультигеновыми белками, содержащий специфическую последовательность гем-связывающих мотивов (14, 6, 20, 13, 7), ранее выдвинутый в качестве генетической детерминанты железоредукции для *Parvivirga hydrogeniphila* (одного из двух культивируемых представителей данного порядка) (Khomyakova et al., 2022), был обнаружен у всех исследуемых филотипов. Эти белки локализованы внеклеточно и проявляют сходство с хинол-оксидазами и цитохромами внешней мембраны других железоредуцирующих бактерий. Особый интерес представляют филотипы из лечебных грязей озера Тамбукан, формирующие отдельную кладу и содержащие уникальные мультигеновые белки с рекордно высоким числом гем-связывающих мотивов — до 69. При этом изолят *Anaerosoma tenue* - второй культивируемый представитель данного порядка, не способный к железоредукции (Khomyakova et al., 2022), содержит только мультигеновые белки с числом мотивов менее 24, что указывает на корреляцию между структурой этих белков и функциональными возможностями бактерий.

Основные выводы

1. Классическими микробиологическими и хемотаксономическими методами проведено полное физиологическое описание штамма Ez-97. На основании проведенного молекулярного анализа предложен новый вид *Melioribacter aerophobius* sp. nov..

2. Из пробы Нагутского месторождения минеральных вод выделена в чистую культуру термотолерантная железоредуцирующая бактерия, штамм Ng-26, по данным проведенного молекулярного анализа, представляющая новый род в семействе *Anaerosomataceae*.

3. Из накопительных культур литотрофных железоредукторов, полученных из проб географически и геохимически удаленных местообитаний, получены геномы 8 некультивируемых представителей порядка *Anaerosomatales*. С помощью биоинформатического анализа у выявленных филотипов обнаружены геномные детерминанты, обеспечивающие способность к внеклеточному переносу электронов.

Литература

1. Заварзин Г.А. Лекции по природоведческой микробиологии. М. : Наука, 2004.
2. Digel L., Bonn   R., Aiyer K. Are all microbes electroactive? // Cell Reports Physical Science. 2024. Vol. 5, № 9. Article 102200. DOI: 10.1016/j.xcrp.2024.102200.
3. Gavrilov S.N., Zavarzina D.G., Elizarov I.M., Tikhonova T.V., Dergousova N.I., Popov O., Lloyd J.R., Knight D., El-Naggar M.Y., Pirbadian S., Leung K.M., Robb F.T., Zakhartsev M.V., Bretschger O., Bonch-Osmolovskaya E.A. Novel extracellular electron transfer channels in a Gram-positive thermophilic bacterium // Frontiers in Microbiology. 2021. Vol. 11. Article 3349.
4. 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. Article 1047580.
5. Logan B.E., Rossi R., Ragab A., Saikaly P.E. Electroactive microorganisms in bioelectrochemical systems // Nature Reviews Microbiology. 2019. Vol. 17, № 5. P. 307–319.
6. 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 (Russian

Federation). 2024. Vol. 93, Suppl 1. P. S28–S34. DOI: 10.1134/S002626172460931X.

7. Schwertmann U., Cornell R.M. Iron Oxides in the Laboratory: Preparation and Characterization. 2nd ed. Weinheim : Wiley-VCH, 2000. 188 p.

8. Walker J.C.G. Was the Archaean biosphere upside down? // Nature. 1987. Vol. 329, № 6141. P. 710–712.

9. Wang G., et al. Dissimilatory iron-reducing microorganisms: The phylogeny, physiology, applications and outlook // Critical Reviews in Environmental Science and Technology. 2025. Vol. 55, № 2. P. 73–98. DOI: 10.1080/10643389.2024.2382498.

10. Zavarzina D.G., Klyukina A.A., Merkel A.Y., Maslova T.A., Maslov A.A. Alkalothermophilic Iron-Reducing Bacteria of the Goryachinsk Thermal Water Basin // Microbiology (Russian Federation). 2024. Vol. 93, № 6. P. 864–875. DOI: 10.1134/S0026261724606845.

Список публикаций по теме работы

Статьи

1. 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.

2. Пихтерева В. А., Гаврилов С. Н., Клюкина А. А., Меркель А. Ю., Чистякова Н. И., Комлева Д. И., Лебединский А. В., Щетинин А. М., Подосокорская О. А., Заварзина Д. Г. Железоредакция у представителей семейства *Melioribacteraceae*: метаболические особенности и генетические детерминанты внеклеточного переноса электронов //Микробиология. – 2026. – Т. 95. – №. 1. – С. 34-50.

Тезисы

1. Пихтерева В.А., Клюкина А.А., Меркель А.Ю., Заварзина Д.Г. 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)

2. Пихтерева В.А., Гаврилов С.Н., Клюкина А.А., Меркель А.Ю., Чистякова Н.И., Комлева Д.И., Подосокорская О.А., Заварзина Д.Г.

Железоредукция у представителей семейства Melioribacteraceae: метаболические особенности и генетические детерминанты внеклеточного переноса электронов. 5-й Российский Микробиологический Конгресс. 29 сентября – 3 октября 2025 года, Волгоград, Россия (Постерный доклад).

Pikhtereva Valeria Alexandrovna

RESEARCH CENTRE OF BIOTECHNOLOGY RAS

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

Abstract. Dissimilatory iron-reducing microorganisms play a key role in the biogeochemical iron cycle by reducing minerals via extracellular electron transfer (EET). Despite the wide phylogenetic distribution of EET, the molecular mechanisms of this process have been studied in detail only in two model organisms, *Geobacter sulfurreducens* and *Shewanella oneidensis*. Predicting EET capabilities based on metagenomic data carries a high risk of errors due to limited knowledge of the functional roles of genes in the majority of microorganisms. The aim of this work is an experimental study of the respiratory metabolism features of anaerobic prokaryotes that transform iron minerals, using natural isolates.

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

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

Салова Варвара Дмитриевна

аспирант ФИЦ Биотехнологии РАН 2 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



ВЫДЕЛЕНИЕ НОВЫХ ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ ФИЛУМА *VERRUCOMICROBIOTA* ИЗ НАКОПИТЕЛЬНЫХ КУЛЬТУР 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 второго года была направлена на получение новых изолятов этих бактерий из накопительных культур с метанокисляющими микроорганизмами и их изучение.

Ключевые слова: *Verrucomicrobiota*, семейство *Opitutaceae*, ассоциированные с метанотрофами бактерии, *Prostheco bacter*.

Филум *Verrucomicrobiota* – одна из широко распространенных филогенетических групп бактерий, большинство представителей которой являются аэробными или анаэробными гетеротрофами. Особенно многочисленны бактерии этой группы в почвах, пресных и морских экосистемах, а также встречаются в микробиоме различных животных и человека [2]. Тем не менее, число полученных в чистых культурах и охарактеризованных веррукомикробов остается крайне малым, что во многом связано с трудностями их выделения и культивирования. Целью этого исследования является расширение спектра культивируемых представителей филума *Verrucomicrobiota* и изучение их физиологии и метаболического потенциала.

Исследования второго года были направлены на выделение в чистые культуры и изучение характеристик новых изолятов веррукомикробов из накопительных культур с метанотрофными бактериями. В работе решались следующие задачи: 1) Анализ накопительных культур с метанооксидающими микроорганизмами с помощью фазово-контрастной микроскопии и профилирования по V4 участку гена 16S рРНК; 2) Подбор условий для получения изолятов веррукомикробов и установление их таксономического положения с помощью определения и сравнительного анализа полной последовательности гена 16S рРНК.

Ранее из биореактора с метанооксидающими микроорганизмами был выделен новый представитель этого филума, штамм Vm1, относящийся к роду *Oleiharenicola* семейства *Opitutaceae* [1]. Все представители этого семейства имеют морфологию небольших кокков и диплококков (0.35-1.2 мкм). Методом фазово-контрастной микроскопии исследовали ряд накопительных культур с метанооксидающими микроорганизмами на наличие ультрамелких кокков. Отобранные пять накопительных культур были проанализированы с помощью профилирования по V4 участку гена 16S рРНК. Метанотрофный компонентам этих культур был представлен бактериями родов *Methylobacter*, *Methylobacter* и *Methylobacter*. Во всех накопительных культурах были обнаружены представители филума *Verrucomicrobiota*, составляющие от 0.86% до 15.9% всех полученных последовательностей (здесь и далее). В числе представителей этого филума во всех накопительных культурах присутствовали веррукомикробы семейства *Opitutaceae* (0.69-14.17%), в двух накопительных культурах были также выявлены *Verrucomicrobiaceae* (0.95-1.05%) и *Terrimicrobiaceae* (0.17-0.46%), в одной – *Methylacidiphilaceae* (1.56%), а в трех культурах также присутствовали – некультивируемые представители порядка *Victivallales* (0.04-0.36%).

Для выделения, поддержания и проведения физиологических тестов представителей семейства *Opitutaceae* использовали минеральную среду mNMS с добавлением глюкозы (250 мг/л), пептона (200 мг/л), дрожжевого экстракта (200 мг/л), pH 7. В качестве желирующего агента применяли фитагель (6.5 г/л). Чашки инкубировали в течение 1-2 месяцев в эксикаторах с содержанием 30 об. % метана в газовой фазе. В общей сложности было получено пять новых изолятов веррукомикробов: штаммы A3, E5, 2B4, T2 и T4. Все полученные изоляты формировали небольшие полупрозрачные колонии диаметром до 2 мм. Все штаммы были представлены диплококками или кокками диаметром 0,5-1,2 мкм. Сравнительный анализ последовательности гена 16S рРНК показал их принадлежность к семейству *Opitutaceae* (Рис. 1). Для большинства изолятов ближайшим

филогенетическим родственником являлась *Oleiharenicola alkalitolerans* NVT^T, выделенная из хвостохранилища нефтеносных песков [4], со сходством последовательностей гена 16S рНК от 97.37 до 98.67% в зависимости от штамма. Штамм Т4 обнаруживал 97.52% сходства последовательностей гена 16S рНК с *Lacunisphaera limnophila* IG 16b^T, выделенной из озерной воды [3].

Из двух накопительных культур, где по молекулярным данным присутствовали веррукомикробы рода *Prostheco bacter*, на разбавленной среде R2A с заменой агара на фитагелель (6.5 г/л) удалось получить два новых изолята, штаммы Pr1 и Pr3, с характерной веретенновидной морфологией клеток и колониями ярко-желтого цвета. Молекулярная идентификация на основе гена 16S рНК показала, что полученные штаммы идентичны между собой, а наиболее близким видом к ним является *Prostheco bacter fluviatilis* HAQ-1^T (Рис. 1), со сходством последовательностей гена 16S рНК 98.7%.

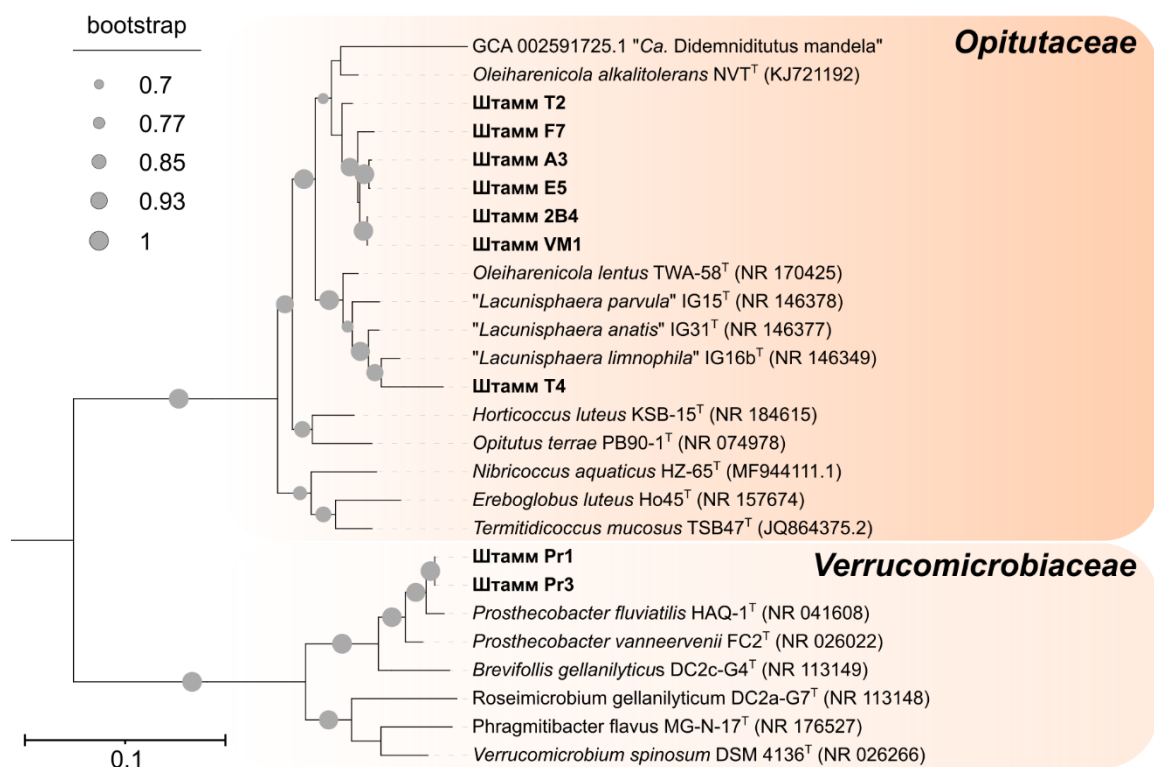


Рис.1 – Дендрограмма, построенная на основе результатов сравнительного анализа последовательностей генов 16S рНК полученных изолятов веррукомикробов и других представителей семейств *Opitutaceae* и *Verrucomicrobiaceae*. Маркер – 0.1 замена на нуклеотидную позицию.

Таким образом, в результате работы были выделены 5 штаммов рода *Oleiharenicola* семейства *Opitutaceae* и 2 штамма рода *Prostheco bacter* семейства *Verrucomicrobiaceae*.

Основные выводы:

1. На основе профилирования по V4 региону гена 16S рНК было показано, что представители филума *Verrucomicrobiota* присутствуют во всех исследуемых накопительных культурах метанооксиляющих микроорганизмов, а их последовательности составляют от 0.86% до 15.9% всех полученных фрагментов генов 16S рНК.

2. Сравнительный анализ последовательности гена 16S рНК полученных изолятов показал их принадлежность к филуму *Verrucomicrobiota*, из которых штаммы A3, E5, 2B4, T2 относятся к роду *Oleiharenicola* семейства *Opitutaceae*, штамм T4 – к роду *Lacunisphaera* семейства *Opitutaceae* и штаммы Pr1 и Pr3 – к роду *Prostheco bacter* семейства *Verrucomicrobiaceae*.

Литература

1. Danilova O.V., Salova V.D., Oshkin I.Y., Naumoff D.G., Ivanova A.A., Suzina N.E., Dedysh S.N. Isolation of ultra-small opitutaceae-affiliated verrucomicrobia from a methane-fed bioreactor //Microorganisms. – 2025. – V. 13. – №. 8. – P. 1922.

2. Hedlund B.P. Phylum XXIII. *Verrucomicrobia* phyl. nov //Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. – Springer, New York, 2010. – P. 795-841.

3. 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.

4. 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.

Список публикаций по теме работы

Статьи

1. Danilova O.V., **Salova V.D.**, Oshkin I.Y., Naumoff D.G., Ivanova A.A., Suzina N.E., Dedysh S.N. Isolation of ultra-small opitutaceae-affiliated verrucomicrobia from a methane-fed bioreactor //Microorganisms. – 2025. – V. 13. – №. 8. – P. 1922.

Тезисы докладов

1. Салова В.Д., Данилова О.В., Сузина Н.Е., Дедыш С.Н. Новые веррукомикробы рода *Oleiharenicola*: физиологические характеристики и анализ геномов // Сборник тезисов докладов 5-го Российского микробиологического конгресса (г. Волгоград, 29 сентября – 3 октября 2025 г.) / под ред. Д. А. Бабкова. – Волгоград: Библиотечно-издательский центр ВолгГМУ, 2025. – С. 72-73.

2. Данилова О.В., Салова В.Д., Иванова А.А., Дедыш С.Н. Необычные соседи: гетеротрофные представители *Verrucomicrobiota* как спутники метанотрофных бактерий // Сборник тезисов докладов 5-го Российского микробиологического конгресса (г. Волгоград, 29 сентября – 3 октября 2025 г.) / под ред. Д. А. Бабкова. – Волгоград: Библиотечно-издательский центр ВолгГМУ, 2025. – С. 35.

Salova Varvara Dmitrievna

FEDERAL RESEARCH CENTRE OF BIOTECHNOLOGY

**ISOLATION OF NOVEL REPRESENTATIVES OF THE PHYLUM
VERRUCOMICROBIOTA FROM ENRICHMENT CULTURES WITH
METHANE-OXIDIZING 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 second year focused on isolating and studying novel representatives of this phylum from enrichment cultures of methane-oxidizing microorganisms.

Keywords: *Verrucomicrobiota*, family *Opitutaceae*, methanotroph-associated bacteria, *Prostheco bacter*.

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

Чепурко Владислав Геннадьевич

аспирант ФИЦ Биотехнологии РАН 2 года обучения

научная специальность 1.5.6 Биотехнология

e-mail: v.chepurko@fbras.ru

Научный руководитель

Попов Владимир Олегович

доктор химических наук, профессор

зав. лаб. инженерной энзимологии



ПОДБОР УСЛОВИЙ ТРАНСФОРМАЦИИ БАКТЕРИЙ РОДА *Thioalkalivibrio* МЕТОДОМ ЭЛЕКТРОПОРАЦИИ

Аннотация. В работе разрабатывался метод электротрансформации галоалкалифильных бактерий *Thioalkalivibrio paradoxus* ARh1^T и *Tv. thiocyanoxidans* ARh2^T, продуцирующих уникальный медьсодержащий фермент тиоцианатдегидрогеназу (TcDH). Подобраны условия отмывки клеток для электропорации, сконструирована репортёрная плаزمиды на основе вектора pBBR1MCS-1, несущая ген *zoan2RFP* под контролем промотора *tac*. Показана принципиальная возможность электротрансформации *Tv. thiocyanoxidans* ARh2^T с эффективностью до 235 КОЕ/мкг ДНК. Трансформация подтверждена ПЦР, флуоресцентной микроскопией и ретрансформацией плазмиды в *E. coli*.

Ключевые слова: *Thioalkalivibrio thiocyanoxidans*, *Thioalkalivibrio paradoxus*, электротрансформация, галоалкалифильные бактерии, вектор широкого круга хозяев, красный флуоресцентный белок.

Медь выполняет важные функции в составе множества белков, однако механизмы поддержания её гомеостаза, распределения по клеточным компартментам и формирования медьсодержащих активных центров остаются во многом неясными. Галоалкалифильные сероокисляющие бактерии рода *Thioalkalivibrio* представляют собой перспективную модельную систему для изучения гомеостаза меди и биогенеза медьсодержащих ферментов в экстремальных условиях высокой солёности и щёлочности.

Среди белков *Thioalkalivibrio* особый интерес представляет тиоцианатдегидрогеназа (TcDH) — фермент, катализирующий окисление тиоцианата до цианата и элементарной серы у *Tv. paradoxus* ARh1^T и *Tv. thiocyanoxidans* ARh2^T. [1] Ранее в лаборатории инженерной энзимологии ФИЦ Биотехнологии РАН была выделена нативная TcDH из *Tv. paradoxus*

ARh1 и получен препарат рекомбинантного белка, а также решена рентгеновская структура фермента, описан уникальный медный активный центр [2] и предложен механизм его сборки *in vitro* [3]. Однако, для изучения молекулярных взаимодействий, лежащих в основе созревания медного центра *in vivo*, необходимо получение нокаутов целевых генов белков, участвующих в этом процессе. Для этого необходимо наличие надежных генно-инженерных инструментов для работы с *Thioalkalivibrio*, в частности, разработка эффективных методов трансформации клеток. Это и стало целью настоящей работы на данном этапе.

На предыдущем этапе работы была показана возможность конъюгативного переноса плазмиды — производной вектора широкого круга хозяев pBBR1 с маркерным геном устойчивости к эритромицину от донорного штамма *E. coli* S17-1 клеткам *Tv. paradoxus* ARh1. Конъюгация рассматривается как надежный способ введения рекомбинантных ДНК в бактерии с неизвестной генетической доступностью; однако, в нашем случае получение трансконъюгантов носило непостоянный характер и было невозпроизводимым. В связи с этим был выбран альтернативный подход — электропорация, который исключает зависимость от конъюгационного аппарата донора и позволяет вводить целевую ДНК непосредственно в клетки.

Электропорация предполагает суспендирование клеток в среде с низкой ионной силой, что необходимо для создания условий эффективного электрического импульса. Однако, галофильные микроорганизмы, адаптированные к высоким концентрациям солей, как правило, проявляют выраженную чувствительность к осмотическому стрессу при резком снижении ионной силы среды. В качестве отмывочных сред были протестированы растворы 10% (об.) глицерина, 1 М сорбитола, смесь 10% глицерина и 1 М сорбитола, смесь 10% глицерина и 0,3 М сахарозы, 0,3 М сахарозы, а также стерильная деионизированная вода; каждую отмывку проводили трёхкратно. Поскольку стандартный метод подсчёта колониеобразующих единиц (КОЕ) путём посева серийных разведений культуры на агаризованную среду не отражает истинного числа жизнеспособных клеток *Tv. paradoxus* ARh1 и *Tv. thiocyanoxidans* ARh2, потери клеток при отмывках оценивали по оптической плотности суспензии при 600 нм. При отмывке раствором 0,3 М сахарозы потери клеточной массы составляли менее 25% от исходной оптической плотности для обоих исследуемых штаммов, что оказалось наилучшим показателем среди протестированных сред. На основании этих данных раствор 0,3 М сахарозы был выбран в качестве стандартного отмывочного раствора для электропорации в последующих экспериментах.

Исходный вектор pBBR1MCS-1 содержит селективный маркер *catA*, кодирующий хлорамфениколацетилтрансферазу, генетические детерминанты *oriV* и *rep*, обеспечивающие автономную репликацию плазмиды в широком круге хозяев, сайт множественного клонирования и участок *mob*, необходимый для мобилизации плазмиды при конъюгационном переносе. Дополнительно в конструкцию была включена экспрессионная кассета, состоящая из гена *zoan2RFP* [4], кодирующего красный флуоресцентный белок из *Zoanthus* sp., под контролем промотора *tac*, функциональность которого была подтверждена в клетках близкородственной бактерии *Tv. versutus* [5]. Промоторная последовательность *tac* была амплифицирована с матрицы pGEX-2T в виде фрагмента размером ~250 п.н., содержащего консервативные элементы -35 и -10. Для клонирования в состав праймеров были введены сайты рестрикции *KpnI* и *XhoI*. Ген *zoan2RFP* был амплифицирован с использованием праймеров, содержащих сайты *XhoI* и *XbaI*. Полученные фрагменты ДНК и вектор обрабатывали соответствующими эндонуклеазами рестрикции и лигировали. Дальнейшие эксперименты по подбору условий электропорации проводили с использованием полученной плазмиды pBBR1-Ptac-zoanRFP-CmR (Рисунок 1).

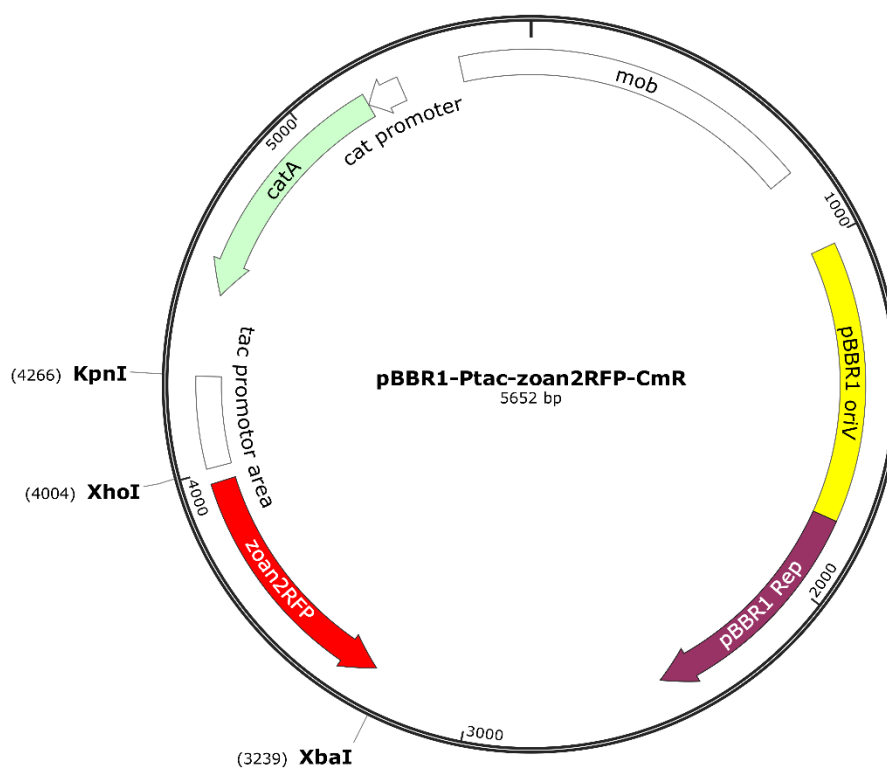


Рис. 1. Схематическое изображение плазмиды pBBR1-Ptac-zoanRFP-CmR

Электротрансформацию *Tv. paradoxus* ARh1 проводили в различных условиях, варьируя стадию роста культуры, концентрацию вводимой плазмиды, напряжённость электрического поля и время восстановления клеток после электропорации. Во всех случаях в течение двух недель инкубации рост колоний на среде TD [5] с хлорамфениколом (10 мкг/мл) не наблюдался.

В качестве альтернативного объекта для электротрансформации был выбран штамм *Tv. thiocyanoxidans* ARh2, также несущий ген TcDH и характеризующийся более быстрым ростом на агаризованных средах, что существенно упрощает скрининг трансформантов. Наибольшее число трансформантов было получено при напряжённости поля 13 кВ/см, времени импульса 6 мс и использовании культуры в ранней логарифмической фазе роста ($A_{600} = 0,2-0,3$); при этом максимальная эффективность трансформации составила 235 КОЕ/мкг ДНК. Колонии появлялись на пятый день инкубации на среде TD с хлорамфениколом (10 мкг/мл). Наличие рекомбинантной ДНК в клетке подтверждали методом ПЦР с использованием праймеров на репортёрный ген *zoan2RFP*. Экспрессия репортёрного гена *zoan2RFP* была подтверждена методом флуоресцентной микроскопии — в клетках трансформантов наблюдалось красное свечение. Сохранность структуры плазмиды была верифицирована путём её выделения из трансформантов *Tv. thiocyanoxidans* ARh2 и ретрансформации в клетки *E. coli* DH5 α .

Таким образом, впервые показана возможность электротрансформации *Tv. thiocyanoxidans* ARh2 и подобраны оптимальные условия введения рекомбинантной плазмидной ДНК. Полученные результаты открывают перспективы для создания генно-инженерных инструментов изучения биосинтеза и регуляции TcDH *in vivo*.

Основные выводы

- Раствор 0,3 М сахарозы обеспечивает наименьшие потери клеточной массы при отмывке обоих штаммов и выбран в качестве стандартного буфера для электропорации.
- Сконструирована репортёрная плазида pBBR1-Ptac-*zoan2RFP*-CmR для скрининга трансформантов по устойчивости к хлорамфениколу и красной флуоресценции.
- Электротрансформация *Tv. paradoxus* ARh1 не привела к получению трансформантов при варьировании стадии роста и концентрации вводимой ДНК, напряжённости поля, а также времени восстановления клеток.

• Впервые показана возможность электротрансформации *Tv. thiocyanoxidans* ARh2; оптимальные условия — напряжённость поля 13 кВ/см, ранняя логарифмическая фаза роста ($A_{600} = 0,2-0,3$). Эффективность трансформации подтверждена флуоресцентной микроскопией и ретрансформацией в *E. coli* DH5 α .

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. Solovieva A. Y. et al. Assembling a unique three-copper center of thiocyanate dehydrogenase in vitro // International Journal of Biological Macromolecules. – 2026. – Т. 348.
4. Pakhomov A. A. et al. Impact of external amino acids on fluorescent protein chromophore biosynthesis // Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology. – 2020. – Т. 206.
5. Mu T. et al. Improvement of desulfurizing activity of haloalkaliphilic *Thiialkalivibrio versutus* SOB306 with the expression of *Vitreoscilla* hemoglobin gene // Biotechnology Letters. – 2017. – Т. 39. – №. 3. – С. 447.

Chepurko Vladislav Gennadievich
RESEARCH CENTER OF BIOTECHNOLOGY RAS

OPTIMIZATION OF ELECTROPORATION CONDITIONS FOR TRANSFORMATION OF BACTERIA OF THE GENUS *Thioalkalivibrio*

Abstract. This work developed an electrotransformation method for the haloalkaliphilic bacteria *Thioalkalivibrio paradoxus* ARh1^T and *Tv. thiocyanoxidans* ARh2^T, which produce the unique copper-containing enzyme thiocyanate dehydrogenase (TcDH). Cell washing conditions for electroporation were optimized, and a reporter plasmid based on the pBBR1MCS-1 vector carrying the *zoan2RFP* gene under the control of the *tac* promoter was constructed. The principal feasibility of electrotransformation of *Tv. thiocyanoxidans* ARh2^T was demonstrated with an efficiency of up to 235 CFU/ μ g DNA. Transformation was

confirmed by PCR, fluorescence microscopy, and re-transformation of the plasmid into *E. coli*.

Keywords: *Thioalkalivibrio thiocyanoxidans*, *Thioalkalivibrio paradoxus*, electroporation, haloalkaliphilic bacteria, broad-host-range vector, red fluorescent protein.

Шайфутдинов Ролан Рустемович

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

Научный руководитель

Воробьёв Иван Иванович

*доктор биологических наук, профессор
в.н.с., зав. лабораторией
биоинженерии клеток млекопитающих*



АНАЛИТИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИЗАЦИЯ И ОЦЕНКА СТАБИЛЬНОСТИ ПРОДУЦЕНТА БИОАНАЛОГОВОГО ДУЛАГЛУТИДА В КЛЕТКАХ СНО

Аннотация. *Проведена оценка стабильности и качества биоаналогового дулаглутида, полученного в апоптоз-резистентных клетках СНО. Проанализированы продуктивность клональных линий при длительном культивировании без селекционного давления, влияние состава питательной среды и температурного сдвига на накопление белка, а также стабильность кодирующей последовательности по данным высокопроизводительного секвенирования. Очищенный препарат охарактеризован методами SEC-HPLC, RP-HPLC, SDS-PAGE, изoeлектрического фокусирования, масс-спектрометрии интактного белка, пептидного картирования и клеточного теста активности. Дополнительно сопоставлены содержание мономерной формы, распределение зарядовых вариантов, профиль основных гликоформ и значение EC50. Полученные результаты подтвердили сходство основных аналитических характеристик с препаратом сравнения.*

Ключевые слова: *дулаглутид, GLP-1-Fc, клетки СНО, биоаналог, гликозилирование, масс-спектрометрия.*

Дулаглутид представляет собой длительно действующий Fc-слитный белок, включающий аналог глюкагоноподобного пептида-1 (GLP-1), соединенный с Fc-фрагментом иммуноглобулина G4. Fc-фрагмент увеличивает молекулярную массу и период циркуляции препарата, что позволяет применять дулаглутид как терапевтический агонист рецептора GLP-1 с пролонгированным действием [1, 2].

Для биоаналоговых Fc-слитных белков уровень экспрессии сам по себе не является достаточным критерием успешности клеточной линии. Из-за сложной доменной организации, димерной структуры и гликозилирования

такие белки требуют подтверждения мономерности, целостности, профиля зарядовых вариантов, гликоформенного состава, соответствия аминокислотной последовательности и биологической активности [3].

В данной работе проведен анализ продуцента биоаналогового дулаглутида, полученного на основе апоптоз-резистентной клеточной линии CHO 4BGD. Данная линия сочетает нокауты проапоптотических генов *bak1* и *bax* с нокаутами селекционных маркеров *dhfr* и *glul*, что позволяет использовать последовательную метаболическую селекцию. Экспрессия целевого белка обеспечивалась плазмидами на основе системы *EEF1A1*, ранее разработанной для стабильной экспрессии рекомбинантных белков в клетках CHO [4, 5].

Для клональных линий с наибольшей продуктивностью были оценены условия периодического культивирования с подпиткой. Наиболее высокий титр в среде EmCD CHO 101 при температурном сдвиге с 37 до 34 °C был получен для клона №73 и составил 1,05 г/л. Температурный сдвиг является распространенным приемом интенсификации процессов в клетках CHO, поскольку может повышать удельную продуктивность и продлевать продукционную фазу культуры [1, 6].

Отдельно была проанализирована стабильность продуктивности в отсутствие селекционного давления MTX и MSX. В течение 69 дней культивирования клоны №73 и №105 сохраняли продуктивность без выраженной потери титра. Для клона №73 методом NGS не выявлены мутации в открытой рамке считывания дулаглутида, а суммарная копияность интегрированных плазмид составила 219 ± 7 копий на диплоидную клетку [1].

После завершения периодического культивирования с подпиткой культуральную жидкость клона №73 очищали методом аффинной хроматографии на белке А. По данным SDS-PAGE в восстанавливающих и невосстанавливающих условиях не были выявлены выраженные продукты протеолитической деградации. Это указывает на сохранность целевого белка в ходе длительного культивирования и последующей очистки [1].

SEC-HPLC показала высокое содержание мономерной формы дулаглутида: 96,8% для полученного образца и 97,5% для референтного препарата. Анализ методом RP-HPLC выявил близкое распределение зарядовых вариантов: содержание кислых и основных изоформ составило 0,96% и 14,3% для исследуемого образца против 0,8% и 18,6% для препарата сравнения соответственно [1].

Масс-спектрометрический анализ интактных полипептидных цепей позволил выявить девять гликоформ полученного дулаглутида. Наиболее представленными были гликоформы G0F и G1F, соответствующие основным

формам, обнаруженным у препарата сравнения. Пептидное картирование подтвердило 95,4% аминокислотной последовательности, а функциональный тест на клетках HEK293/GLP-1R/CRE-Luc показал сопоставимую биоактивность: EC50 составила 52 пМ для исследуемого образца и 76 пМ для референтного препарата [1].

Основные выводы: полученный в апоптоз-резистентных клетках CHO биоаналоговый дулаглутид характеризуется сохранением продуктивности клеток без метотрексата и L-метионинсульфоксимины в течение 69 дней, высокой копийностью интегрированных экспрессионных кассет, отсутствием выявленных мутаций в открытой рамке считывания, высоким содержанием мономерной формы, близким к препарату сравнения профилем зарядовых вариантов и гликоформ, а также сопоставимой биологической активностью *in vitro* [1].

Литература

1. Shaifutdinov R.R., Sinegubova M.V., Vorobiev I.I., Prokhorova P.E., Podkorytov A.B., Orlova N.A. Production of a Dulaglutide Analogue by Apoptosis-Resistant Chinese Hamster Ovary Cells in a 3-Week Fed-Batch Process // *Pharmaceuticals*. 2025. Vol. 18, № 12. Article 1896. DOI: 10.3390/ph18121896.
2. Glaesner W., Vick A.M., Millican R., Ellis B., Tschang S.H., Tian Y. et al. Engineering and characterization of the long-acting glucagon-like peptide-1 analogue LY2189265, an Fc fusion protein // *Diabetes/Metabolism Research and Reviews*. 2010. Vol. 26. P. 287–296. DOI: 10.1002/dmrr.1080.
3. Duivelshof B.L., Murisier A., Camperi J., Fekete S., Beck A., Guillaume D., D'Atri V. Therapeutic Fc-fusion proteins: current analytical strategies // *Journal of Separation Science*. 2021. Vol. 44, № 1. P. 35–62. DOI: 10.1002/jssc.202000765.
4. 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. Vol. 14, № 10. Article 692. DOI: 10.3390/cells14100692.
5. Orlova N.A., Kovnir S.V., Khodak Y.A., Vorobiev I.I., Gabibov A.G., Skryabin K.G. Improved elongation factor-1 alpha-based vectors for stable high-level expression of heterologous proteins in Chinese hamster ovary cells // *BMC Biotechnology*. 2014. Vol. 14. Article 56. DOI: 10.1186/1472-6750-14-56.
6. Torres M., Akhtar S., McKenzie E.A., Dickson A.J. Temperature down-shift modifies expression of UPR-/ERAD-related genes and enhances

production of a chimeric fusion protein in CHO cells // Biotechnology Journal. 2021. Vol. 16. Article e2000081. DOI: 10.1002/biot.202000081.

Список публикаций по теме работы

Статьи

1. Shaifutdinov R.R., Sinegubova M.V., Vorobiev I.I., Prokhorova P.E., Podkorytov A.B., Orlova N.A. Production of a Dulaglutide Analogue by Apoptosis-Resistant Chinese Hamster Ovary Cells in a 3-Week Fed-Batch Process // Pharmaceuticals. — 2025. — Vol. 18, No. 12. — Article 1896. — DOI: 10.3390/ph18121896.

Тезисы докладов

1. Шайфутдинов Р.Р., Гаямова Е.А., Воробьев И.И., Орлова Н.А. Экспрессия слитых с кристаллизуемым фрагментом иммуноглобулина G1 белков в клетках СНО // Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии : сборник тезисов XXXVI Международной зимней молодежной научной школы. — Москва, 2024. — С. 125.

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 // Биология — наука XXI века : сборник тезисов 27-й Пущинской школы-конференции молодых ученых с международным участием. — Пущино, 2024. — С. 164.

3. Vorobiev I.I., Orlova N.A., Sinegubova M.V., Shaifutdinov R.R., Kolesov D.E. Genome engineering of CHO cells by multiplex and sequential CRISPR modification: from apoptosis resistance to the production of afucosylated antibodies // CRISPR-2025 : abstracts of the 3rd International Congress. — Novosibirsk, 2025. — P. 98.

Основные достижения, патенты

1. Габидова А.Э., Никитин Д.В., Романова Ю.Д., Воробьев И.И., Орлова Н.А., Шайфутдинов Р.Р. Продуцент L-аспарагиназы E. coli и экспрессионная плазида pET28a-AsnSYN, кодирующая L-аспарагиназу : патент РФ № 2817891 С1. — Заявка № 2023116912 ; заявл. 27.06.2023 ; опубл. 22.04.2024.

2. Шайфутдинов Р.Р., Синегубова М.В., Воробьев И.И., Орлова Н.А. Плазмиды для экспрессии рекомбинантного агониста рецептора глюкагоноподобного пептида-1 человека, слитого с кристаллизуемым фрагментом иммуноглобулина человека (дулаглутида), моноклональная

линия клеток млекопитающих — продуцент дулаглутида, способ получения дулаглутида : патент РФ № 2858871 С1. — Заявка № 2025120683 ; заявл. 26.07.2025 ; опубл. 24.03.2026, Бюл. № 9.

Shaifutdinov Rolan Rustemovich
RESEARCH CENTER OF BIOTECHNOLOGY RAS

**ANALYTICAL CHARACTERIZATION AND STABILITY ASSESSMENT
OF A BIOSIMILAR DULAGLUTIDE PRODUCER IN CHO CELLS**

Abstract. The stability and product quality of a biosimilar dulaglutide analogue produced in apoptosis-resistant CHO cells were evaluated. Productivity of clonal cell lines during long-term cultivation without selective pressure, the effects of culture medium and temperature shift, and the integrity of the coding sequence were analyzed. The purified product was characterized by SEC-HPLC, RP-HPLC, SDS-PAGE, isoelectric focusing, intact protein mass spectrometry, peptide mapping, and an in vitro GLP-1R/CRE-Luc bioactivity assay. The results confirmed similarity of the main analytical characteristics to the reference product.

Keywords: dulaglutide, GLP-1-Fc, CHO cells, biosimilar, glycosylation, mass spectrometry.

Ваапов Бейт Рустемович

аспирант ФИЦ Биотехнологии РАН 1-го года обучения

научная специальность 1.5.3 Молекулярная биология

e-mail: vaapovb@mail.ru

Научный руководитель

Рузов Алексей Сергеевич

кандидат биологических наук,

с.н.с. группы РНК-эпигенетики и механизмов геномной

стабильности



РЕГУЛЯЦИЯ R-ПЕТЕЛЬ, ОПОСРЕДОВАННАЯ BAF, В РАННЕМ РАЗВИТИИ И РАКЕ

Аннотация. *R-петли, трёхцепочечные ядерные структуры, состоящие из гибридов ДНК-РНК и смещённой цепи одноцепочечной ДНК, играют важную роль в эпигенетической регуляции. Однако то, как R-петли регулируют специфический для того или иного типа клеток эпигенетический ландшафт и как они регулируются сами в различных типах клеток, остается неясным. Работа направлена на выяснение механизмов, лежащих в основе формирования специфического для того или иного типа клеток геномного распределения R-петель и функциональной зависимости динамики R-петель от опосредованного комплексом BAF фазирования нуклеосом при нормальном развитии и патогенезе рака.*

Ключевые слова: *N⁶-метиладенозин (m^6A), R-петли, модификации РНК, хроматин, комплекс BAF (SWI/SNF), короткие шпилечные РНК, опухолевые линии, DRIP-seq, DIP- m^6A .*

В ходе работы будет подробно изучен механизм формирования R-петель и их вероятная регуляция через BAF-зависимое фазирование нуклеосом в контекстах раннего эмбрионального развития человека и канцерогенеза (Рис. 1). Данная работа направлена на то, чтобы понять связь между опосредованной BAF регуляцией R-петель, и контролем клеточной спецификации и дифференцировки в нормальном развитии и онкогенезе. Предполагается, что комплекс BAF отвечает за управление образованием R-петель в нормальном развитии, а когда BAF мутирует или нарушается его экспрессия, это способствует развитию рака, нарушая геномное распределение R-петель характерное для нормальных тканей и клеточных типов [1].

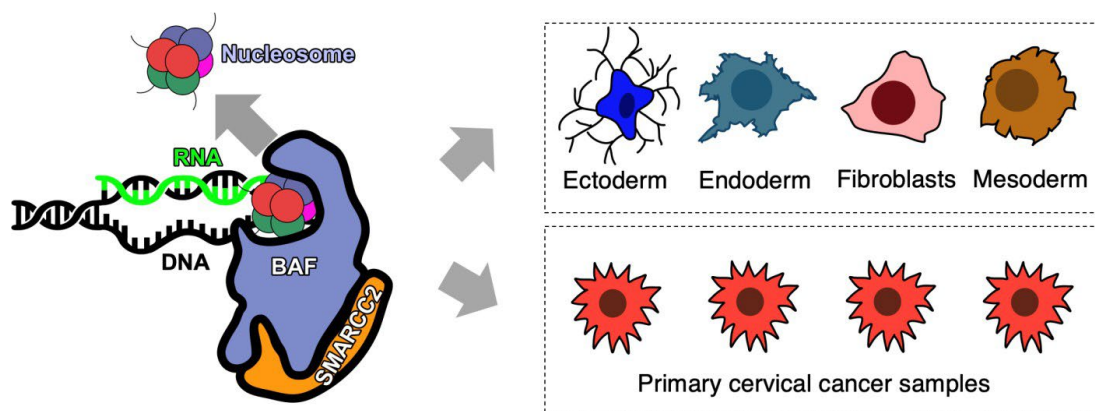


Рисунок 1. BAF регулирует R-петли, модулируя нуклеосомы при раке и развитии.

В ходе работы планируется картировать паттерны геномного распределения R-петель в раннем эмбриональном развитии и в раках с различным гистогенезом. В результате будет создан большой набор данных по геномному распределению R-петель в различных типах клеток, который может использоваться как основа для понимания роли R-петель в нормальном развитии и раковых клетках.

Комплекс BAF участвует в регуляции R-петель; однако, всесторонний обзор этой регуляции в нормальных и раковых состояниях не был выполнен [2]. Будет использоваться (Рис. 2): (1) DRIP-seq, метод, который может картировать R-петли в клетках. (2) CUT&Tag для картирования связывания белков комплекса BAF по всему геному. (3) Комбинация ATAC-seq и MNase-seq для картирования местоположения открытого/закрытого хроматина и позиций нуклеосом соответственно. Эта комбинация методов будет применяться к нормальному развитию и раку с использованием линий человеческих клеток. Система развития основана на человеческих плюрипотентных стволовых клетках (hPSC), которые могут быть индуцированы для дифференциации в соматические клетки-предшественники (мезодерма, энтодерма, эктодерма) или возвращены к наивной плюрипотентности и тотипотентности (Рис. 2B).

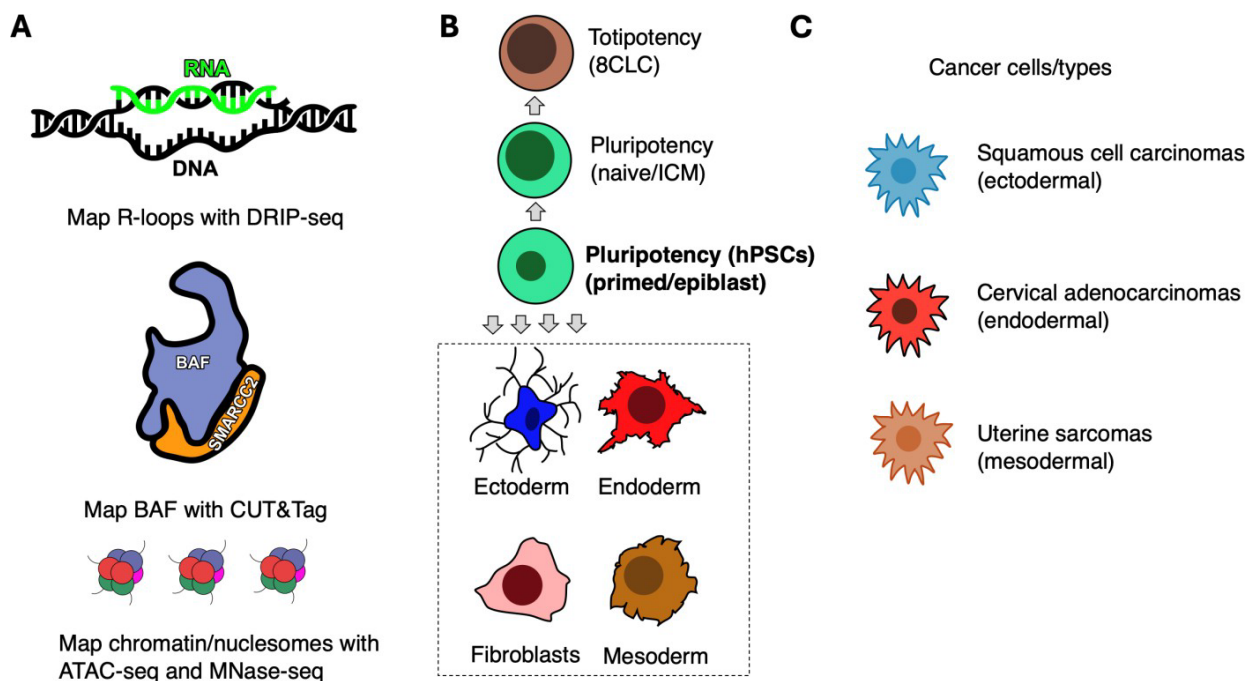


Рисунок 2. Схема методов и типов клеток, используемых в Задаче 1. (А) Основные используемые технологии включают DRIP-seq для картирования присутствия R-петель по всему геному, CUT&Tag для картирования субъединиц BAF, а также ATAC-seq и MNase-seq для позиционирования хроматина и нуклеосом. (В) Выбор нормальных типов клеток. Начиная с hPSC, эти клетки могут быть дифференцированы для формирования соматических клеток-предшественников (энтодерма, мезодерма, эктодерма, фибробласты) и дедифференцированы в более ранние наивные плюрипотентные или тотипотентные типы клеток. (С) Раковые клетки.

В качестве моделей раковой трансформации мы будем использовать выборку первичных опухолей различного происхождения (Рис. 2С). В частности, будет рассмотрена панель типов рака шейки матки с различным гистогенезом, которая будет включать плоскоклеточный рак (эктодермальный); аденокарциномы шейки матки (энтодермальный) и саркомы матки (мезодермальный гистогенез).

Эксперименты будут включать в себя нокдаун всех субъединиц BAF и полнотранскриптомное секвенирование РНК созданных линий hPSCs; нокдаун всех субъединиц BAF в 4CL-наивных, мезодермальных, энтодермальных, эктодермальных и раковых клеточных линиях и и полнотранскриптомное секвенирование РНК созданных линий hPSCs; картирование R-петель с помощью DRIP-seq в hPSCs, 4CL-наивных, энтодермальных, эктодермальных, мезодермальных, фибробластах (hESFs) и выбранных других нормальных (нераковых) типах клеток; картирование R-петель с помощью DRIP-seq в наборе первичных раковых линий.

Основные выводы

Проведение сравнительного анализа распределения R-петель и паттернов m6A-модификаций между двумя линиями раковых клеток различного гистогенеза позволит создать близкие к полным наборы данных геномного распределения R-петель в раннем нормальном эмбриональном развитии человека и в наборе опухолей различного гистогенеза, в нормальных условиях и при нокдауне различных субъединиц BAF. Также подготовлены конструкции на базе коротких шпилечных РНК для нокдауна двух субъединиц комплекса ремоделирования хроматина BAF (SWI/SNF) с целью последующего изучения их роли в регуляции динамики R-петель.

Литература

1. Abakir A, Giles TC, Cristini A, Foster JM, Dai N, Starczak M, Rubio-Roldan A, Li M, Eleftheriou M, Crutchley J, Flatt L, Young L, Gaffney DJ, Denning C, Dalhus B, Emes RD, Gackowski D, Corrêa IR, Garcia-Perez JL, Klungland A, Gromak N, Ruzov A. (2020) N⁶-methyladenosine regulates the stability of RNA:DNA hybrids in human cells. *Nature Genetics*. 52(1):48-55
2. Abakir A, Ruzov A. (2021) SWI/SNF complexes as determinants of R-loop metabolism. *Nature Genetics*. 53(7):940-941.
3. Abakir A, Ruzov A. (2024) A model for a dual function of N⁶-methyladenosine in R-loop regulation. *Nature Genetics*. 56(10):1995-1998.
4. Lewis LC, Lo PC, Foster JM, Dai N, Corrêa IR, Durczak PM, Duncan G, Ramsawhook A, Aithal GP, Denning C, Hannan NR, Ruzov A. (2017) Dynamics of 5-carboxylcytosine during hepatic differentiation: Potential general role for active demethylation by DNA repair in lineage specification. *Epigenetics*. 3;12(4):277-286.
5. Ma R*, Zhou X*, Zhai X*, Wang C, Hu R, Chen Y, Shi L, Fang X, Liao Y, Ma L, Jiang M, Wu J, Wang R, Chen J, Cao T, Du G, Zhao Y, Wu W, Chen H, Li S, Lian Q, Guo G#, Xiao J#, Hutchins AP#, Yuan P# (2024) Single-cell RNA sequencing reveals immune cell dysfunction in the peripheral blood of patients with highly aggressive gastric cancer. *Cell Proliferation*. e13591. *Co-first, #Co-corresponding.
6. Blythe MJ, Kocer A, Rubio-Roldan A, Giles T, Abakir A, Ialy-Radio C, Wheldon LM, Bereshchenko O, Bruscoli S, Kondrashov A, Drevet JR, Emes RD, Johnson AD, McCarrey JR, Gackowski D, Olinski R, Cocquet J, Garcia-Perez JL, Ruzov A. (2021) LINE-1 transcription in round spermatids is associated with accretion of 5-carboxylcytosine in their open reading frames. *Commun Biol*. 7;4(1):691.

Vaapov Beit Rustemovich
RESEARCH CENTER OF BIOTECHNOLOGY RAS

**BAF-MEDIATED REGULATION OF R-LOOPS IN EARLY
DEVELOPMENT AND CANCER**

Abstract. R-loops, triple-stranded nuclear structures composed of DNA-RNA hybrids and misaligned single-stranded DNA, play an important role in epigenetic regulation. However, how R-loops regulate cell-type-specific epigenetic landscapes and how they themselves are regulated in different cell types remains unclear. This work aims to elucidate the mechanisms underlying the formation of cell-type-specific genomic distributions of R-loops and the functional dependence of R-loop dynamics on BAF-mediated nucleosome phasing during normal development and cancer pathogenesis.

Key words: N6-methyladenosine (m6A), R-loops, RNA modifications, chromatin, BAF (SWI/SNF) complex, short hairpin RNAs, tumor lines, DRIP-seq, DIP-m6A.

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

Васягин Егор Аркадьевич

аспирант ФИЦ Биотехнологии РАН 1 года обучения

научная специальность 1.5.3 Молекулярная биология

e-mail: egor.vasyagin@gmail.com

Научный руководитель

Марданова Евгения Сергеевна

доктор биологических наук

в.н.с. лаборатории систем молекулярного клонирования



ПОЛУЧЕНИЕ И АНАЛИЗ ХИМЕРНЫХ ВИРУСОПОДОБНЫХ ЧАСТИЦ НА ОСНОВЕ КАПСИДНОГО БЕЛКА БАКТЕРИОФАГА PQ465, НЕСУЩИХ КОНСЕРВАТИВНЫЕ АНТИГЕНЫ ВИРУСА ГРИППА А

Аннотация. Эффективный контроль над инфекцией вируса гриппа А может быть достигнут с помощью рекомбинантных вакцин широкого спектра действия на основе консервативных антигенов. Внеклеточный домен трансмембранного белка М2 (М2е) и стеблевой участок второй субъединицы гемагглютиниона вируса гриппа А (НА2, 76–130 а.о.) являются перспективными кандидатами, но обладают низкой иммуногенностью, поэтому требуют связывания с адъювантным белком или носителем, например, вирусоподобными частицами (VLP). В данной работе были получены химерные VLP на основе капсидного белка одноцепочечного РНК-бактериофага PQ465, несущие четыре копии М2е пептида и стеблевой участок НА2. Были подобраны эффективные методы экспрессии и очистки рекомбинантных белков. При помощи электронной микроскопии показано формирование частиц сферической формы и размера около 30 нм.

Ключевые слова: вирус гриппа А, VLP, вакцина, рекомбинантный белок, бактериофаги.

Сезонный грипп ежегодно вызывает значительную заболеваемость и смертность, а высокая антигенная изменчивость вируса ограничивает эффективность современных вакцин, направленных преимущественно на поверхностные антигены — гемагглютинин и нейраминидазу. В связи с этим перспективным направлением является разработка универсальных вакцин на основе консервативных эпитопов вируса гриппа А.

Целью данной работы было создание химерных вирусоподобных частиц (VLP), экспонирующих эктодомен белка М2 (М2е) и фрагмент стеблевого

домена гемагглютинаина (HA2, а.к. 76–130), их экспрессия в бактериальной системе, очистка и оценка способности рекомбинантных белков к формированию частиц.

На предыдущем этапе работы на основе капсидного белка бактериофага RQ465 были сконструированы рекомбинантные белки, несущие четыре копии M2e пептида как на N-, так и на С-конце капсидного белка. После их экспрессии и очистки были проведены эксперименты на лабораторных животных для оценки иммуногенных и протективных свойств полученных препаратов. Было показано, что С-концевая вставка M2e индуцирует выработку более высокого уровня специфических антител и обеспечивает лучшую защиту от вируса гриппа по сравнению с N-концевой вставкой. Поэтому в данном исследовании в качестве основы использовалась конструкция с С-концевым расположением пептида M2e. В данной работе к С-концу капсидного белка дополнительно был присоединен стеблевой фрагмент гемагглютинаина HA2 (76–130 а.к.) вируса гриппа А. Экспрессия проводилась в клетках *E. coli*. На первом этапе были подобраны оптимальные условия экспрессии химерных VLP. Далее проводились эксперименты по поиску наиболее эффективного способа очистки рекомбинантного белка. Наибольший выход и чистота белка были достигнуты при использовании метода осаждения насыщенным раствором сульфата аммония. Анализ формирования частиц с помощью электронной микроскопии показал образование сферических наночастиц диаметром около 30 нм. На следующем этапе работы планируется провести оценку способности индукции В- и Т-клеточного иммунного ответа, а также протективных свойств полученных белков в экспериментальной модели на животных.

Основные выводы:

1. Получены векторы, кодирующие капсидный белок бактериофага RQ465 с присоединенными 4 копиями M2e пептида и стеблевой частью HA вируса гриппа А.
2. Подобраны эффективные методы выделения и очистки рекомбинантных белков.
3. При помощи электронной микроскопии показано формирование VLP с диаметром около 30 нм.

Список публикаций по теме работы

Статьи

1. Vasyagin, E.A.; Zykova, A.A.; Mardanova, E.S.; Nikitin, N.A.; Shuklina, M.A.; Ozhereleva, O.O.; Stepanova, L.A.; Tsybalova, L.M.; Blokhina, E.A.; Ravin, N.V. Influenza A Vaccine Candidates Based on Virus-like Particles Formed by Coat Proteins of Single-Stranded RNA Phages Beihai32 and PQ465. *Vaccines* 2024, 12, 1033.
2. Vasyagin, E.A.; Mardanova, E.S.; Ravin, N.V. Virus-like Particles Formed by the Coat Protein of the Single-Stranded RNA Phage PQ465 as a Carrier for Antigen Presentation. *Molecules* 2025, 30, 4056.
3. Vasyagin, E.A.; Zykova, A.A.; Blokhina, E.A.; Ozhereleva, O.O.; Stepanova, L.A.; Shuklina, M.A.; Klotchenko, S.A.; Mardanova, E.S.; Ravin, N.V. Chimeric Virus-like Particles Formed by the Coat Proteins of Single-Stranded RNA Phages Beihai32 and PQ465, Simultaneously Displaying the M2e Peptide and the Stalk HA Peptide from Influenza a Virus, Elicit Humoral and T-Cell Immune Responses in Mice. *Vaccines* 2025, 13, 1117.
4. Mardanova, E.S.; Vasyagin, E.A.; Kotova, K.G.; Zahmanova, G.G.; Ravin, N.V. Plant-Produced Chimeric Hepatitis E Virus-like Particles as Carriers for Antigen Presentation. *Viruses* 2024, 16, 1093.
5. Mardanova, E.S.; Vasyagin, E.A.; Ravin, N.V. Virus-like Particles Produced in Plants: A Promising Platform for Recombinant Vaccine Development. *Plants* 2024, 13, 3564.

Тезисы докладов

1. Международный молодёжный научный форум: «Ломоносов-2026». «Вирусоподобные частицы на основе бактериофага PQ465, несущие консервативные антигены вируса гриппа, как основа универсальной противогриппозной вакцины».
2. VI Международный форум «Дни вирусологии 2025»: «Вирусоподобные частицы на основе бактериофага PQ465, несущие консервативные антигены вируса гриппа, M2e пептид и стеблевой домен гемагглютинаина, эффективно индуцируют гуморальный и клеточный иммунитет».
3. Международный молодежный научный форум «Ломоносов-2024»: «Вирусоподобные частицы на основе капсидного белка бактериофага PQ465 в качестве носителей консервативных эпитопов вируса гриппа А».

Основные достижения, патенты

1. Патент на изобретение №2852174 «РЕКОМБИНАНТНАЯ ВАКЦИНА ПРОТИВ ВИРУСА ГРИППА А ЧЕЛОВЕКА И СПОСОБ ЕЕ ПОЛУЧЕНИЯ».

Vasyagin Egor Arkadievich
RESEARCH CENTER OF BIOTECHNOLOGY RAS

PRODUCTION AND ANALYSIS OF CHIMERIC VIRUS-LIKE PARTICLES BASED ON THE CAPSID PROTEIN OF BACTERIOPHAGE PQ465 CARRYING CONSERVED ANTIGENS OF INFLUENZA A VIRUS

Abstract. Effective control of influenza A virus infection can be achieved through the development of broad-spectrum recombinant vaccines based on conserved antigens. The extracellular domain of the transmembrane M2 protein (M2e) and the stem region of the second subunit of influenza A virus hemagglutinin (HA2, aa 76–130) are promising candidates; however, they have low immunogenicity and therefore require fusion to an adjuvant protein or a carrier, such as virus-like particles (VLPs). In this study, chimeric VLPs based on the capsid protein of the single-stranded RNA bacteriophage PQ465 and carrying four copies of the M2e peptide and the HA2 stem region were obtained. Effective methods for the expression and purification of the recombinant proteins were optimized. Electron microscopy demonstrated the formation of spherical particles approximately 30 nm in diameter.

Keywords: influenza A virus, VLPs, vaccine, recombinant protein, bacteriophages.

Гербст Александр Герольдович

аспирант ФИЦ Биотехнологии РАН 1 года обучения

научная специальность: 1.5.4. Биохимия

e-mail: gerbst-alexander@yandex.ru

Научный руководитель

Федоров Алексей Николаевич

доктор биологических наук,

г.н.с. лаборатории молекулярной биотехнологии



СОЗДАНИЕ ГЕНЕТИЧЕСКИХ КОНСТРУКТОВ ШАПЕРОНИНА GROEL С РАЗНЫМИ ЗАРЯДАМИ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ ЕГО ФОЛДИНГА

Аннотация. Несмотря на детальную изученность шаперонина GroEL/GroES *Escherichia coli*, процессы образования его четвертичной структуры и роль электростатических взаимодействий в этих процессах остаются недостаточно исследованными. GroEL представляет собой сложно организованный двухкольцевой белковый комплекс, поэтому для упрощения модели в работе использован однокольцевой вариант GroEL. Цель — создание генетических конструктов однокольцевого GroEL с изменённым поверхностным зарядом и оценка влияния таких замен на фолдинг и гептамерную сборку. На основе структурного анализа подобраны мутации, нарушающие межкольцевые контакты и модифицирующие заряд поверхности. Методом сайт-направленного мутагенеза получены варианты groEL, клонированные в экспрессионные векторы (отдельно и совместно с groES). Показаны достаточные уровни экспрессии целевых белков. Созданные конструкции позволяют изучать стабильность колец, кинетику сборки и роль электростатических взаимодействий в формировании мультисубъединичных комплексов.

Ключевые слова: фолдинг белков, шаперонин GroEL, электростатические взаимодействия.

Введение

Фолдинг белков представляет собой фундаментальный процесс, обеспечивающий формирование их нативной структуры и функциональной активности. В клетке эффективность сворачивания белков поддерживается системой молекулярных шаперонов, предотвращающих агрегацию полипептидных цепей и способствующих достижению термодинамически стабильного состояния. Одним из наиболее изученных шаперонных

комплексов является шаперонин GroEL, функционирующий совместно с кошапероном GroES в клетках *Escherichia coli* [1].

Модельная система *Escherichia coli* широко используется для изучения процессов белкового фолдинга благодаря хорошо охарактеризованным механизмам трансляции и белковой сборки. Особый интерес представляет шаперонин GroEL — олигомерный белковый комплекс, состоящий из двух гептамерных колец, взаимодействие которых регулируется АТФ-зависимыми конформационными изменениями. Несмотря на детальную изученность структуры и механизма функционирования системы GroEL/GroES, процессы фолдинга и олигомеризации самого GroEL остаются исследованными значительно слабее. Актуальной задачей является изучение механизма формирования гептамерных колец и влияние межсубъединичных взаимодействий на стабильность комплекса [2, 3].

Согласно литературным данным, сборка двухкольцевого GroEL является многостадийным кинетическим процессом, включающим образование отдельных гептамерных колец и их последующую ассоциацию в тетрадекамерный комплекс. Межкольцевые взаимодействия существенно усложняют анализ процессов фолдинга и олигомеризации белка. Поэтому для упрощения экспериментальной системы и более детального изучения влияния аминокислотных замен на сборку комплекса было принято решение использовать однокольцевой вариант GroEL [4].

В связи с этим актуальной задачей является создание генетических конструкторов однокольцевого GroEL с различными вариантами поверхностного заряда и исследование их влияния на фолдинг и формирование гептамерного комплекса. Такой подход позволит определить роль электростатических взаимодействий в стабилизации структуры GroEL, выявить факторы, влияющие на сборку шаперонина, а также расширить представления о механизмах формирования мультисубъединичных белковых комплексов.

Основная часть

На первом этапе работы был проведён анализ литературы, посвящённой структуре, механизмам функционирования и олигомеризации шаперонина GroEL. Особое внимание уделялось исследованиям мутантных вариантов GroEL, влиянию межсубъединичных взаимодействий на стабильность комплекса, а также данным рентгеноструктурного анализа и криоэлектронной микроскопии. Для оценки пространственной организации комплекса были проанализированы доступные белковые структуры из базы Protein Data Bank (PDB), включая структуры асимметричных и симметричных комплексов GroEL/GroES [5, 6].

На основании проведённого анализа были выбраны аминокислотные замены, необходимые для получения однокольцевого варианта GroEL. В качестве основы использовались ранее описанные подходы к нарушению межкольцевых контактов шаперонина, позволяющие стабилизировать отдельное гептамерное кольцо. Особое внимание уделялось аминокислотным остаткам, локализованным в экваториальном домене, формирующем основную поверхность контакта между кольцами. При выборе мутаций учитывались данные работы Weissman и соавт. [7], а также более поздних исследований, посвящённых конструированию single-ring вариантов GroEL и анализу их функциональной активности [8].

После получения базового однокольцевого варианта был проведён дополнительный структурный анализ для подбора аминокислотных замен, изменяющих заряд комплекса. Для создания положительно и отрицательно заряженных вариантов GroEL были выбраны аминокислотные остатки, которые не участвуют непосредственно в формировании активного центра или критически важных межсубъединичных контактов. Аминокислотные замены подбирались таким образом, чтобы минимально нарушать общую пространственную структуру комплекса, сохраняя при этом возможность изменения электростатических свойств поверхности белка. Предполагалось, что изменение распределения зарядов не повлияет на стабильность гептамера, кинетику его сборки, взаимодействие с субстратными белками и эффективность фолдинга.

Для получения вариантов GroEL с различными зарядами использовали метод сайт-направленного мутагенеза, позволяющий вносить точечные замены в кодирующую последовательность гена *groEL*. После амплификации мутантные гены были клонированы в экспрессионные плазмидные векторы, после чего последовательность была подтверждена методом ДНК секвенирования. Таким образом были созданы конструкции как для самостоятельной экспрессии мутантных вариантов GroEL, так и для совместной экспрессии с ко-шапероном GroES. Наличие двух типов конструкций позволит оценить влияние GroES на стабильность, сборку и фолдинг мутантных форм GroEL, а также сравнить свойства комплексов в условиях присутствия и отсутствия ко-шаперона.

Были оценены уровни продукции белков, полученных при экспрессии созданных генетических конструкций. Достаточный уровень синтеза является необходимым условием для последующей очистки белков и проведения дальнейших биохимических и структурных исследований.

Полученные генетические конструкции создают основу для дальнейшего исследования механизмов сборки и фолдинга олигомерных

белков в клеточной среде и роли электростатических взаимодействий в формировании структуры и функционировании шаперонина GroEL.

Основные выводы

1. На основании структурного анализа и литературных данных подобраны аминокислотные замены, позволяющие получить однокольцевой вариант GroEL с нарушенными межкольцевыми контактами, а также замены, изменяющие суммарный поверхностный заряд белка при сохранении общей пространственной структуры.

2. Методом сайт-направленного мутагенеза созданы генетические конструкции, кодирующие мутантные варианты однокольцевого GroEL с различным поверхностным зарядом, предназначенные как для самостоятельной экспрессии, так и для совместной экспрессии с ко-шапероном GroES.

3. Показано, что полученные конструкции обеспечивают достаточный уровень продукции целевых белков для последующей очистки и биохимического анализа.

4. Созданные генетические конструкторы формируют основу для дальнейшего изучения стабильности гептамерного кольца, кинетике сборки и функциональной активности шаперонина GroEL.

Литература

1. Sigler P.B., Xu Z., Rye H.S., Burston S.G., Fenton W.A., Horwich A.L. Structure and function in GroEL-mediated protein folding // *Annual review of biochemistry*. – 1998. – V. 67, № 1. – P. 581-608.

2. Schmidt A., Kochanowski K., Vedelaar S., Ahrné E., Volkmer B., Callipo L., Knoops K., Bauer M., Aebersold R., Heinemann M. The quantitative and condition-dependent *Escherichia coli* proteome // *Nature biotechnology*. – 2016. – V. 34, № 1. – P. 104-110.

3. Wiśniewski J.R., Rakus D. Quantitative analysis of the *Escherichia coli* proteome // *Data in brief*. – 2014. – V. 1. – P. 7-11.

4. Ryabova N., Marchenkov V., Kotova N., Semisotnov G. Chaperonin GroEL reassembly: an effect of protein ligands and solvent composition // *Biomolecules*. – 2014. – V. 4, № 2. – P. 458-473.

5. Braig K., Otwinowski Z., Hegde R., Boisvert D.C., Joachimiak A., Horwich A. L., Sigler P. B. The crystal structure of the bacterial chaperonin GroEL at 2.8 Å // *Nature*. – 1994. – V. 371, № 6498. – P. 578-586.

6. Yan X., Shi Q., Bracher A., Miličić G., Singh A.K., Hartl F.U., Hayer-Hartl M. GroEL ring separation and exchange in the chaperonin reaction // *Cell*. – 2018. – V. 172, № 3. – P. 605-617. e11.

7. Weissman J.S., Hohl C.M., Kovalenko O., Kashi Y., Chen S., Braig K., Saibil H.R., Fenton W.A., Norwich A.L. Mechanism of GroEL action: productive release of polypeptide from a sequestered position under GroES // *Cell*. – 1995. – V. 83, № 4. – P. 577-587.

8. Sot B., Banuelos S., Valpuesta J. M. a., Muga A. GroEL stability and function: contribution of the ionic interactions at the inter-ring contact sites // *Journal of Biological Chemistry*. – 2003. – V. 278, № 34. – P. 32083-32090.

Gerbst Aleksandr Geroldovich
RESEARCH CENTER OF BIOTECHNOLOGY RAS

**CREATION OF GENETIC CONSTRUCTS OF CHAPERONIN GROEL
WITH DIFFERENT CHARGES TO STUDY ITS FOLDING**

Abstract. Despite the detailed characterization of the *Escherichia coli* GroEL/GroES chaperonin system, the processes of quaternary structure formation and the role of electrostatic interactions in these processes remain insufficiently investigated. GroEL is a complex double-ring protein structure; therefore, to simplify the model, a single-ring variant of GroEL was used in this work. The aim was to create genetic constructs of single-ring GroEL with altered surface charge and to assess the impact of such substitutions on its folding and heptameric assembly. Based on structural analysis, mutations disrupting inter-ring contacts and modifying the surface charge were selected. Using site-directed mutagenesis, groEL variants were obtained and cloned into expression vectors (either alone or together with groES). Sufficient expression levels of the target proteins were demonstrated. The generated constructs enable studies of ring stability, assembly kinetics, and the role of electrostatic interactions in the formation of multisubunit complexes.

Keywords: protein folding, chaperonin GroEL, electrostatic interactions.

Гурина Анастасия Кирилловна

аспирант ФИЦ Биотехнологии РАН 1 года обучения

научная специальность 1.5.4 Биохимия

e-mail: anastasia.gurina@list.ru

Научный руководитель

Фролов Андрей Александрович

доктор биологических наук

профессор НОЦ по биоинженерии ФИЦ

Биотехнологии РАН



ОЦЕНКА ПРОТЕКТОРНОГО ВЛИЯНИЯ СИДНОНИМИНОВ НА РАСТЕНИЯ ГОРОХА В УСЛОВИЯХ ЗАСУХИ

Аннотация. На данный момент становится очевидно, что прогрессирующие климатические изменения ведут к учащению и продолжительности засушливых периодов, что негативно сказывается на урожайности культурных растений. Основными подходами для эффективного предотвращения разрушительных последствий засухи является селекция новых засухоустойчивых сортов, а также использование фитозффекторов – химических соединений, чье действие направлено на модуляцию стресс-ответа. В последнее время, особое внимание исследователей привлекают соединения сиднониминного ряда – мезоционных соединений, способных служить донорами оксида азота (NO). Предполагается, что за счет способности высвободить оксид азота (NO), который является одной из ключевых сигнальных молекул в защитных процессах при засухе, эти вещества могут служить эффекторами широкого круга белковых молекул в организме растений, тем самым повышая устойчивость к воздействию стрессора [1]. Их эффективность уже была показана в моделях засухи, основанных на ряске и ячмене [2]. Кроме того, в модели засухи на растениях гороха было установлено, что одно из соединений сиднониминного ряда - 3-изопропил-N6-трет-бутоксикарбонил-сиднонимин, проявляло протекторное действие в отношении этого растения, а также позволяло сохранить его семенную продуктивность в условиях засухи. Однако, не смотря на многообещающие физиологические данные, механизм действия этого соединения требует дальнейшего изучения. Протеомный анализ созревающих семян позволит ответить на этот вопрос и выявить ключевые метаболические и регуляторные пути, вовлеченные в ответ на стресс при обработке растений сиднониминами, что закладывает основу для дальнейших исследований по разработке новых фитозффекторов.

Ключевые слова: *Pisum sativum*, засуха, протеомика, сиднонимины, фитозффекторы

Известно, что прогрессирующее изменение климата средней полосы России приводит ко все более продолжительным периодам засухи и аридизации ландшафтов. В силу этого засуха представляет собой один из ключевых климатических факторов, негативно влияющих на продуктивность растений и качество урожая.

Принимая во внимание значительные потери урожая, связанные с засухой, защита растений от разрушительного действия этого фактора становится одной из актуальнейших задач современной сельскохозяйственной биологии и физиологии растений. Для решения этой задачи могут применяться два подхода. С одной стороны, современные методы селекции позволяют создать создавать новые сорта, обладающие высокой устойчивостью к засухе. С другой – в рамках агробιοтехнологического подхода продолжается развитие концепции так называемого фитозффекторного подхода, который подразумевает использование разнообразных протекторных химических модуляторов ответа на стресс, в том числе синтетических.

Известно, что химические соединения из сиднониминового ряда проявляют себя как перспективные фитозффекторы [1]. Они представляют собой мезоионные гетероциклические соединения, потенциально способные быть донорами оксида азота (NO) в клетке. В свою очередь, NO – важная сигнальная молекула, которая, как предполагается, участвует в том числе в защитных механизмах в организме растения в условиях засухи. На молекулярном уровне NO воздействует на активность белков через посттрансляционную модификацию остатков цистеина в полипептиде, называемую S-нитрозилированием. По мере накопления экспериментальных данных стало понятно, что у растений NO играет ключевую роль в самых различных процессах, начиная с прорастания семян, заканчивая защитными механизмами в ответ на стресс [2]. Для веществ из сиднониминового ряда известен ряд преимуществ. В частности, возможно достижение низкой токсичности и высокой биодоступности, о чем говорит успешное применение лекарственного препарата молсидомина и предшествующие исследования на животных. Также, использование этих веществ дает возможность варьирования боковых групп, которые влияют на проницаемость растительных покровов и мембран (а следовательно, биодоступность). Это дает возможность применения сиднониминов в качестве протекторов и гербицидов.

Фитоэффекторная роль сиднониминов исследовалась в небольшом ряду экспериментов, однако этот подход уже показал высокую результативность. Влияние сиднониминов на растения, выращиваемые в условиях засухи, изучалось нами в модели ячменя (*Hordeum vulgare*) и ряски (*Lemna minor*). Так, обработка листьев 3-изопропил- N^6 -трет-бутоксикарбонил-сиднониминотом привела к повышению устойчивости растений ячменя к действию засухи, что проявилось в менее выраженном снижении устьичной проводимости и содержания хлорофилла в условиях предобработки этим веществом. Среди изученных веществ соединение 4-Формил-3-(4-метоксифенил)- N^6 -(трет-бутоксикарбонил)сиднонимин проявило наиболее выраженные ингибирующие свойства в обеих моделях [3]. Однако, для идентификации ключевых белков-мишеней, вовлеченных регуляторных путей, а также возможных механизмов действия необходимы дальнейшие исследования.

Протеомика предоставляет собой идеальную методологическую платформу для достижения этой цели. Благодаря использованию этого подхода появляется возможность широкомасштабной оценки функционального фенотипа организма, т.е. на уровне белков – прямых участников метаболических путей, сигнальных каскадов и структурных компонентов, а не генов или транскриптов. Помимо этого, изучение паттернов пост-трансляционных модификаций вовлеченных белков создает отдельный уровень понимания ключевых для сигналинга NO событий, поскольку, как и любой внутриклеточный мессенджер, оксид азота способен модулировать активность ферментов не только на уровне экспрессии, но и непосредственно на уровне структурных изменений белка.

Таким образом, данное исследование направлено на изучение основных паттернов динамики протеома в ответ на действие засухи, а также на модуляцию этого ответа в условиях предобработки листьев растений растворами потенциально протекторного сиднонимина 3-Изопропил- N^6 -трет-бутоксикарбонил-сиднонимина (B1-01). Данные об изменениях в динамике протеома в условиях применения фитоэффектора позволят выявить конкретные белки, а также метаболические и регуляторные пути, вовлеченные в механизм его действия. Знание механизма действия исследуемого вещества позволит заложить основу для дальнейших исследований, направленных на дальнейшую структурную оптимизацию фитоэффекторов на основе активных сиднониминотом.

Литература

1. Sydnone imines as a new class of promising plant growth modulators and potential drought-protective phytoeffectors – a first experimental structure-

2. Lamattina, L., García-Mata, C., Graziano, M. & Pagnussat, G. Nitric oxide: the versatility of an extensive signal molecule. *Annu. Rev. Plant Biol.* 54, 109–136 (2003).

3. Cherepanov, I. et al. Discovering new plant growth regulators: 4,5-annelated bicyclic sydnone imines - a new type of mesoionic compounds. Preprint at <https://doi.org/10.26434/chemrxiv-2023-hk9dz> (2023).

Gurina Anastasia Kirillovna
RESEARCH CENTER OF BIOTECHNOLOGY RAS

**EVALUATION OF THE PROTECTIVE EFFECT OF
SYDNONEIMINES ON PEA PLANTS UNDER DROUGHT CONDITIONS**

Abstract. Now, it is becoming clear that the progressive climate change leads to the increase in frequency and duration of dry periods, which has a negative impact on the crop yields. The main approaches for effective prevention of the devastating consequences of drought are the selection of new drought-resistant varieties, as well as the use of phytoeffectors – chemical compounds whose action is aimed at the modulation of the stress response. Recently, special attention of researchers is attracted by the compounds of the sydnoneimine series – mesoionic compounds capable of serving as donors of nitric oxide (NO). It is assumed that due to the ability to release nitric oxide (NO), which is one of the key signaling molecules in the defense processes during drought, these substances can serve as effectors of a wide range of protein molecules in the plant body, thereby increasing the resistance to the stressor [1]. Their effectiveness has already been shown in drought models based on duckweed and barley [2]. In addition, in a drought model on pea plants, it was found that one of the sydnoneimine compounds, 3-isopropyl-N⁶-t-butoxycarbonyl-sydnonimine, had a protective effect on this plant and helped to maintain its seed productivity in drought conditions. However, despite the promising physiological data, the mechanism of action of this compound requires further investigation. Proteomic analysis of maturing seeds will allow us to answer this question and identify the key metabolic and regulatory pathways involved in the response to stress when plants are treated with sydnoneimines, which lays the foundation for further research on the development of new phytoeffectors.

Keywords: Pisum sativum, drought, phytoeffectors, proteomics, sydnominines.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФ (№22-06-00337).

Касаткина Светлана Ивановна

аспирант ФИЦ Биотехнологии РАН 1 года обучения

научная специальность 1.5.4 Биохимия

e-mail: kasatkinasvetlana7722@gmail.com

Научный руководитель

Шлеева Маргарита Олеговна

доктор биологических наук

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

микроорганизмов



МОДУЛЯЦИЯ АКТИВНОСТИ СИРОГЕМСИНТАЗЫ MSMEG_2618 КАК СПОСОБ УПРАВЛЕНИЯ ЭНДОГЕННОЙ ФОТОСЕНСИБИЛИЗАЦИЕЙ МИКОБАКТЕРИЙ

Аннотация. В работе исследована роль сирогемсинтазы MSMEG_2618 в накоплении флуоресцирующих тетрапирролов у *Mycobacterium smegmatis*, выступающих в роли эндогенных фотосенсибилизаторов для антибактериальной фотодинамической терапии (аФДТ). Показано, что как гиперэкспрессия, так и делеция гена приводят к повышению уровня эндогенных порфиринов и многократному увеличению фоточувствительности при облучении светом 565 нм. Гиперэкспрессия индуцирует появление трёх эмиссионных пиков (605, 625 и 650 нм), соответствующих прекоррину-2, порфиринам и сирогидрохлорину. Делеция вызывает накопление только порфиринов (625 нм). Полученные данные обосновывают новую стратегию аФДТ, основанную на метаболической сенсibilизации микобактерий.

Ключевые слова: микобактерии, сирогемсинтаза, тетрапирролы, антибактериальная фотодинамическая терапия, эндогенные фотосенсибилизаторы, *Mycobacterium smegmatis*.

Рост антибиотикорезистентности и трудности эрадикации персистирующих форм микобактерий (включая *Mycobacterium tuberculosis*) стимулируют поиск альтернативных подходов к терапии. Антибактериальная фотодинамическая терапия основана на активации фотосенсибилизатора светом, что приводит к генерации активных форм кислорода и гибели бактерий [5]. Преимуществами аФДТ являются неспособность вызывать развитие резистентности у бактерий, а также возможность воздействия на метаболически неактивные формы. Ключевым ограничением является необходимость экзогенного введения фотосенсибилизатора. Альтернативный

подход связан с использованием эндогенных фотосенсибилизаторов, естественных тетрапиррольных предшественников (порфиринов, хлоринов), которые накапливаются в бактериях при нарушении метаболизма тетрапирролов [3].

Ранее в нашей лаборатории впервые было установлено, что эффективность аФДТ коррелирует с уровнем накопления свободных внутриклеточных порфиринов, которые выступают в роли естественных (эндогенных) фотосенсибилизаторов микобактерий [4]. Перспективным путём повышения селективности аФДТ является модуляция активности ферментов, уникальных для микобактерий и участвующих в биосинтезе тетрапирролов. Однако до настоящего времени не существовало стратегии селективного накопления этих соединений именно в бактериальных клетках без воздействия на клетки макроорганизма.

С помощью *in silico* анализа в качестве мишени выделена сирогемсинтаза MSMEG_2618 (CysG) – фермент, катализирующий три последовательные реакции образования сирогема (тетрапиррола, служащего простетической группой в нитритредуктазах и сульфитредуктазах): С-метилирование уропорфириногена III, дегидрирование прекоррина-2 и феррохелатацию сирогидрохлорина [2]. Известно, что уровень её экспрессии возрастает у микобактерий при стрессе (подкисление, голодание, гипоксия) [1]. Данные литературы свидетельствуют, что гиперэкспрессия CysG у *E. coli* и дрожжей ведёт к накоплению флуоресцирующих тетрапиррольных предшественников, которые могут служить полезными маркерами для исследований биосинтетического пути сирогема [6]. Снижение активности фермента также может создавать «узкое место», приводящее к аккумуляции предшественников, которые могут трансформироваться в флуоресцирующие производные порфиринов. Логично было предположить, что подобные эффекты изменения профиля тетрапирролов за счет модуляции активности сирогемсинтазы могут приводить к повышению фоточувствительности микобактерий.

Цель данной работы – оценка влияния гиперэкспрессии и делеции гена MSMEG_2618 на накопление эндогенных фотосенсибилизаторов и фоточувствительность *M. smegmatis*.

Для изучения влияния увеличенного синтеза сирогемсинтазы MSMEG_2618 был получен модифицированный штамм модельного микроорганизма *Mycobacterium smegmatis*. Для *M. smegmatis* была создана плаزمида pMV261_MSMEG_2618, обеспечивающая высокоуровневую экспрессию гена MSMEG_2618. Колонии полученного штамма *M. smegmatis* визуальнo отличались от контроля: они имели характерную серую окраску при

обычном освещении и розовую флуоресценцию при освещении УФ (365 нм). Контрольные колонии (с плазмидой pMV261) такой флуоресценции не давали. Была проведена оценка накопления флуоресцентных продуктов в модифицированных бактериальных штаммах с гиперэкспрессией MSMEG_2618. Для усиления наблюдаемой флуоресценции в среду культивирования добавлялась 5-аминолевулиновая кислота (АЛК). Она является ключевым предшественником в биосинтезе тетрапирролов. Спектральный анализ флуоресценции клеток *M. smegmatis* с гиперэкспрессией гена MSMEG_2618 выявил характерные эмиссионные пики при длинах волн 605 нм, 625 нм и 650 нм, соответствующие прекоррину-2, порфиринам (уропорфину или копропорфину) и сирогидрохлорину соответственно. Добавление экзогенной АЛК (2 мМ) приводило к усилению всех пиков примерно в 3–5 раз, при этом наиболее выраженный рост наблюдался для пика порфиринов (625 нм). Контрольный штамм с пустой плазмидой *M. smegmatis* демонстрировал максимумы флуоресценции, характерные для порфиринов (625 нм), особенно после добавления экзогенной АЛК. При этом максимумы флуоресценции, характерные для прекоррина и сирогидрохлорина отсутствовали. Результат анализа этих спектральных характеристик убедительно свидетельствует о том, что наблюдаемый «флуоресцентный» фенотип в полученном штамме обусловлен повышенным уровнем прекорринов, порфиринов и/или сирогидрохлорина – ключевых промежуточных продуктов тетрапиррольного биосинтеза. Это наблюдение подчеркивает роль MSMEG_2618 в усилении биосинтеза тетрапирролов и, как следствие, в увеличении результирующей флуоресценции.

Для исследования фотодинамической активности накопленных тетрапиррольных соединений были проведены эксперименты с облучением бактериальных суспензий монохроматическим светом с длинами волн 565 нм и 640 нм. Выбор этих длин волн был сделан с учетом пиков поглощения и позволяет селективно воздействовать при 565 нм на порфирины и при 650 нм – на хлорины. Анализ выживаемости клеток с целенаправленной гиперэкспрессией сирогемсинтазы после их облучения светом длиной волны 565 нм, выполненный с использованием методики серийных разведений и подсчета колониеобразующих единиц (КОЕ), демонстрировал повышенную фоточувствительность клеток с гиперэкспрессией сирогемсинтазы. Уровень выживаемости этих клеток оценивался в 14,5% по сравнению с контрольным штаммом. При облучении светом длиной волны 640 нм доля выживших клеток составила 90% по сравнению с контрольным штаммом. Эти данные подтверждают выраженное токсическое воздействие облучения длиной волны 565 нм на бактерии с гиперэкспрессией сирогемсинтазы и указывает на

ключевую роль данного фермента в реализации наблюдаемого фотодинамического эффекта. Способность гиперэкспрессирующих штаммов аккумулировать фотосенсибилизаторы, которые при облучении вызывают гибель клеток, делает их потенциальными мишенями для аФДТ.

Для оценки влияния ингибирования активности сирогемсинтазы был сконструирован делеционный штамм *M. smegmatis* по гену MSMEG_2618. При УФ-освещении колонии демонстрировали ярко-розовую флуоресценцию. Спектральный анализ флуоресценции клеток мутантного штамма выявил значительное увеличение интенсивности пика, соответствующего порфириновым соединениям (625 нм) по сравнению со спектром клеток дикого типа, тогда как пики прекоррина-2 (605 нм) и сирогидрохлорина (650 нм) отсутствовали (что логично, так как фермент неактивен). При фотодинамическом облучении (565 нм) делеционный штамм показал значительное снижение выживаемости. Жизнеспособность штамма с делецией снижалась в 442 раза по сравнению с необлученными клетками, в то время как выживаемость дикого типа *M. smegmatis* снизилась в 5,7 раза.

Основные выводы:

1. Сирогемсинтаза MSMEG_2618 является важным регулятором гомеостаза тетрапирролов у *M. smegmatis*. Её активность определяет распределение метаболического потока между синтезом сирогема и накоплением промежуточных порфиринов.
2. Как инактивация, так и гиперэкспрессия этого фермента нарушают гомеостаз тетрапирролов, приводя к накоплению эндогенных фотосенсибилизаторов, преимущественно порфиринов.
3. Накопленные порфирины выполняют функцию эндогенных фотосенсибилизаторов: облучение светом 565 нм вызывает выраженную гибель клеток. Делеционный штамм демонстрирует снижение выживаемости в 442 раза, что является одним из наиболее высоких показателей для аФДТ без экзогенных сенсibilизаторов.
4. Инактивация сирогемсинтазы приводит к значительно более сильному накоплению порфиринов и фотодинамическому эффекту, чем её гиперэкспрессия. Таким образом, полная блокада фермента более перспективна для терапевтических целей.
5. Предложена стратегия «метаболической сенсibilизации» микобактерий для аФДТ, основанная на направленной модуляции активности бактериальной сирогемсинтазы без добавления экзогенных фотосенсибилизаторов.

Литература

1. Albrethsen J., Agner J., Piersma S.R. et al. Proteomic profiling of *Mycobacterium tuberculosis* identifies nutrient-starvation-responsive toxin-antitoxin systems // *Molecular and cellular proteomics*. – 2013. – v. 12. – № 5. – p. 1180-1191.
2. Dailey H.A., Dailey T.A., Gerdes S. et al. Prokaryotic heme biosynthesis: multiple pathways to a common essential product // *Microbiology and molecular biology reviews*. – 2017. – v. 81. – № 1. – p. e00048-16.
3. Shashin D.M., Demina G.R., Linge I.A. et al. The effect of antimicrobial photodynamic inactivation on the protein profile of dormant *Mycobacterium smegmatis* containing endogenous porphyrins // *International journal of molecular sciences*. – 2023. – v. 24. – № 18. – p. 13968.
4. Shleeva M.O., Savitsky A.P., Nikitushkin V.D. et al. Photoinactivation of dormant *Mycobacterium smegmatis* due to its endogenous porphyrins // *Applied microbiology and biotechnology*. – 2019. – v. 103. – № 23-24. – p. 9687-9695.
5. Wainwright M., Maisch T., Nonell S., Plaetzer K., Almeida A., Tegos G.P., Hamblin M.R. Photoantimicrobials – are we afraid of the light? // *The Lancet. Infectious diseases*. – 2017. – Vol. 17. – No. 2. – P. e49–e55.
6. Wildt S., Deuschle U. *cobA*, a red fluorescent transcriptional reporter for *Escherichia coli*, yeast, and mammalian cells // *Nature biotechnology*. – 1999. – v. 17. – № 12. – p. 1175-1178.

Список публикаций по теме работы

Статьи

1. Касаткина С.И., Багаева Д.И., Демина Г.Р. и др. Повышенная экспрессия сирогемсинтазы нарушает метаболизм тетрапирролов и вызывает фотодинамическую чувствительность у *Escherichia coli* и *Mycobacterium smegmatis* // *Биотехнология*. – 2026. – т. 42. – № 1. – с. 1-10.

Тезисы докладов

1. Касаткина С.И., Багаева Д.И., Демина Г.Р. и др. Поиск новых мишеней для повышения эффективности антибактериальной фотодинамической терапии // Сборник тезисов 29-ой Пущинской школы-конференции молодых ученых с международным участием «БИОЛОГИЯ – НАУКА XXI ВЕКА». – Пущино: ФИЦ ПНЦБИ РАН. – 2026. – с. 424 (постерный доклад).

Kasatkina Svetlana Ivanovna
RESEARCH CENTER OF BIOTECHNOLOGY RAS

MODULATION OF MSMEG_2618 SIROHEME SYNTHASE ACTIVITY AS A WAY TO CONTROL ENDOGENOUS PHOTSENSITIZATION OF MYCOBACTERIA

Abstract. This study investigates the role of siroheme synthase MSMEG_2618 in the accumulation of fluorescent tetrapyrroles in *Mycobacterium smegmatis*, which act as endogenous photosensitizers for antibacterial photodynamic therapy (aPDT). It is shown that both gene overexpression and deletion lead to increased levels of endogenous porphyrins and a dramatic enhancement of photosensitivity upon irradiation at 565 nm. Overexpression induces three emission peaks (605, 625, and 650 nm), corresponding to precorrin-2, porphyrins and sirohydrochlorin. Deletion causes accumulation of porphyrins only (625 nm). These findings support a novel aPDT strategy based on metabolic sensitization of mycobacteria.

Keywords: mycobacteria, siroheme synthase, tetrapyrroles, antibacterial photodynamic therapy, endogenous photosensitizers, *Mycobacterium smegmatis*.

Работа выполнена при поддержке РФФ (грант № 25-45-10015).

Лихов Астемир Ризуанович

аспирант ФИЦ Биотехнологии РАН 1 года обучения

научная специальность 1.5.4 Биохимия

e-mail: lihov3103@gmail.com

Научный руководитель

Жердева Виктория Вячеславовна

кандидат биологических наук

зав. лабораторией молекулярного имиджинга



КОМПЛЕКСНАЯ IN VITRO ОЦЕНКА БИОДЕГРАДАЦИИ И ЦИТОСОВМЕСТИМОСТИ ПОЛИЭФИРНЫХ СОПОЛИМЕРОВ

Аннотация. Проведена комплексная *in vitro* оценка биodeградации полиэфирных сополимеров на основе 1,3-пропандиола, 1,5-пентандиола, янтарной и лимонной кислот. Исследована кинетика ферментативного и не ферментативного гидролиза, проанализировано высвобождение функциональных меток — индоцианина зелёного и цитрата гадолиния. Цитотоксичность оценивали МТТ-тестом на фибробластоподобных клетках A9 и миобластоподобных C2C12: относительная жизнеспособность составляла около 95%. Капиллярный электрофорез позволил количественно определять низкомолекулярные продукты деградации. Установлено, что ферментативный гидролиз ускоряет деградацию в три раза по сравнению с неферментативным, при этом материал демонстрирует высокую цитосовместимость.

Ключевые слова: полиэфирные сополимеры, *in vitro* деградация, цитосовместимость, МТТ-тест, капиллярный электрофорез, кинетика гидролиза, функциональные метки, биосовместимость.

Ранее нами была разработана методика синтеза полиэфирных сополимеров на основе 1,3-пропандиола, 1,5-пентандиола, янтарной и лимонной кислот с последующей маркировкой индоцианином зелёным (ICG) и комплексом гадолиния с цитратом для мультимодальной визуализации [1,2]. Введение функциональных меток позволяет отслеживать кинетику деградации материалов как флуоресцентными, так и магнитно-резонансными методами, что актуально для разработки имплантируемых трибоэлектрических наногенераторов и систем контролируемой доставки лекарств.

Целью данной работы являлось комплексное *in vitro* исследование полиэфирных сополимеров с оценкой кинетики гидролитической деградации, цитосовместимости и анализа низкомолекулярных продуктов распада методами МТТ-теста и капиллярного электрофореза [3].

Для реализации поставленной цели были синтезированы полиэфирные сополимеры на основе 1,3-пропандиола, 1,5-пентандиола, янтарной и лимонной кислот. Образцы в форме дисков диаметром 5 мм стерилизовали и инкубировали при +37°C в фосфатном буфере (pH 7,4) и в фетальной сыворотке крови (FBS) с добавлением липазы (500 Е.А.) для моделирования ферментативного гидролиза. Отбор проб проводили каждые 72 ч в течение 21 сут.

При культивировании образцов в модельных средах установлено, что деградация в присутствии липазы протекает достоверно быстрее: полная потеря массы достигалась на 24-е сутки, тогда как в буферных растворах без ферментов процесс замедлялся в 2,5 раза, что согласуется с данными литературы о защитной роли белков сыворотки [4, 5]. Высвобождение функциональных меток (ICG и Gd^{3+}) демонстрировало двухфазную кинетику: начальная фаза (0–9 сут) характеризовалась медленным выделением меток на фоне набухания полимерной матрицы, тогда как во второй фазе (10–24 сут) наблюдалось ускоренное высвобождение, коррелирующее с потерей массы полимера ($R^2 > 0,92$).

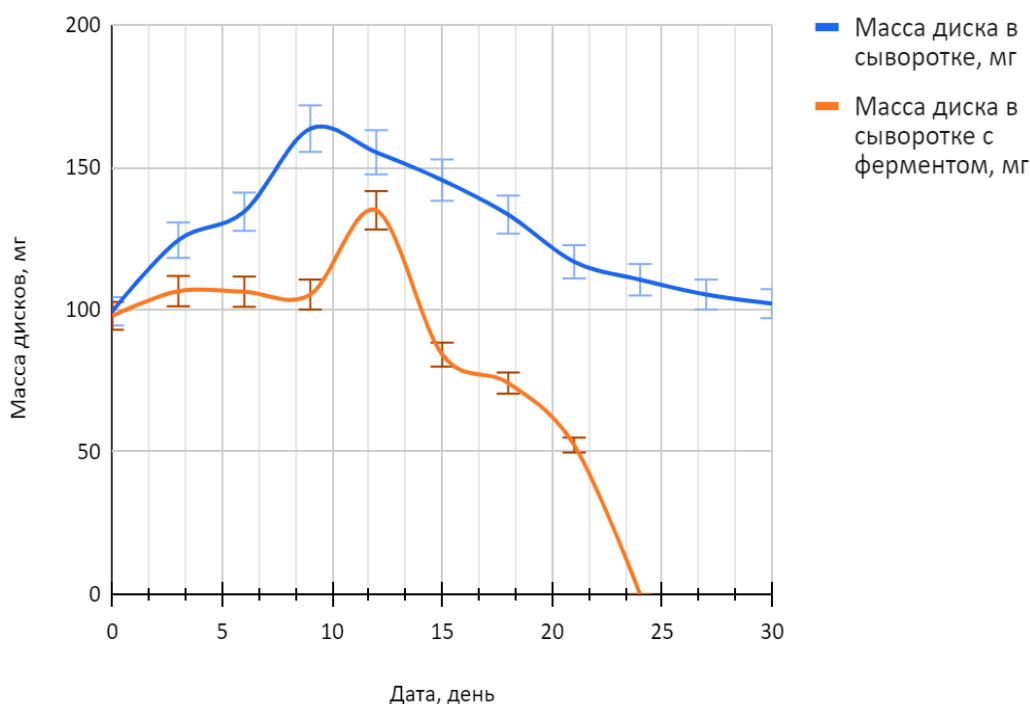


Рис. 1. Изменение массы сополимерных образцов в модельных растворах сыворотки

Для оценки цитосовместимости продуктов деградации был проведён МТТ-тест на фибробластоподобных клетках А9 и миобластоподобных клетках С2С12 [6]. Клетки культивировали в присутствии экстрактов сополимеров, полученных после 3-, 6-, 9-, 12- и 15-суточной инкубации в фетальной сыворотке крупного рогатого скота (FBS) с ферментом. Относительная жизнеспособность клеток превышала 95% на всех временных точках, что свидетельствует об отсутствии выраженной цитотоксичности. При этом отмечался умеренный цитопротеративный эффект на 9–12 сут. ($108 \pm 4\%$ относительно контроля, $p < 0,05$), вероятно, обусловленный высвобождением цитрата, естественного метаболита цикла Кребса.

Анализ низкомолекулярных продуктов деградации проводили методом капиллярного электрофореза (КЭ) в режиме зонного электрофореза с детекцией при 214 нм. В электрофоретограммах экстрактов идентифицированы пики, соответствующие янтарной кислоте, лимонной кислоте и их олигомерам с молекулярной массой до 500 Да. Количественная оценка показала, что скорость накопления низкомолекулярных фрагментов по результатам МРТ и флуоресцентной спектроскопии коррелирует с данными гравиметрического анализа и высвобождением функциональных меток.

Полученные данные свидетельствуют о том, что полиэфирные сополимеры демонстрируют гидролитическое расщепление, характерное для класса полиэфирных полимеров [5], зависящее от наличия ферментов в среде. При этом материал демонстрирует высокий уровень биосовместимости в условиях *in vitro*, что является необходимым критерием для дальнейшего перехода к исследованиям *in vivo*.

Основные выводы:

1. Установлено, что ферментативный гидролиз ускоряет деградацию полиэфирных сополимеров в 2,5 раза по сравнению с неферментативным процессом в буферных растворах.

2. Показано, что продукты деградации сополимеров не проявляют цитотоксичности в отношении фибробластоподобных (А9) и миобластоподобных (С2С12) клеток мыши: относительная жизнеспособность клеток превышает 95%, а на 9–12 сут регистрируется умеренный цитопротеративный эффект, вероятно, связанный с высвобождением цитрата.

3. Методом капиллярного электрофореза впервые проанализирован спектр низкомолекулярных продуктов деградации сополимеров, что может быть использовано для прогнозирования метаболической судьбы материалов *in vivo*.

4. Подтверждена корреляция между высвобождением функциональных меток (ICG, Gd^{3+}) и потерей массы полимера ($R^2 > 0,9$), что обосновывает применение мультимодальной визуализации для неинвазивного мониторинга резорбции имплантатов на основе данных сополимеров.

Благодарим за оказанную помощь в проведении работы ЦКП ФИЦ Биотехнологии РАН и сотрудника ЦКП Василия Коцюбу.

Литература

1. Zherdeva V. V. et al. Enhanced Fluorescence Imaging of Implants Based on Polyester Copolymers in Combination with MRI //Journal of Biophotonics. – 2025. – Т. 18. – №. 12. – С. e202400147.
2. Likhov T. et al. COMPLEX APPROACH TO IN VITRO AND IN VIVO MONITORING OF THE DEGRADATION OF IMPLANTS BASED ON ESTER COPOLYMERS USING MR AND FLUORESCENCE IMAGING //Китайско-российский семинар по биофотонике и биомедицинской оптике-2023. – 2023. – №. 1. – С. 9-14.
3. Kamiloglu S. et al. Guidelines for cell viability assays //Food frontiers. – 2020. – Т. 1. – №. 3. – С. 332-349.
4. Rahmati M., Mozafari M. Protein adsorption on polymers //Materials Today Communications. – 2018. – Т. 17. – С. 527-540.
5. Woodard L. N., Grunlan M. A. Hydrolytic degradation and erosion of polyester biomaterials. – 2018.
6. Zhang Z. Y. et al. In vivo and in vitro degradation and biological toxicity studies of polyesters with varying degradation rates //Journal of Hazardous Materials. – 2025. – Т. 492. – С. 138196.

Likhov Astemir Rizuanovich

RESEARCH CENTER OF BIOTECHNOLOGY RAS

COMPREHENSIVE IN VITRO EVALUATION OF BIODEGRADATION AND CYTOCOMPATIBILITY OF POLYESTER COPOLYMERS

Abstract. A comprehensive in vitro evaluation of the biodegradation of polyester copolymers based on 1,3-propanediol, 1,5-pentanediol, succinic acid, and citric acid was conducted. The kinetics of hydrolysis were investigated in phosphate buffer and blood serum supplemented with lipase, and the release of functional labels—indocyanine green and gadolinium citrate—was analyzed. Cytotoxicity was

assessed using the MTT assay on fibroblast-like A9 and myoblast-like C2C12 cells, with relative cell viability exceeding 85%. Capillary electrophoresis enabled the quantitative determination of low-molecular-weight degradation products. It was established that enzymatic hydrolysis accelerates degradation threefold compared to non-enzymatic hydrolysis, while the material demonstrates high biocompatibility.

Keywords: polyester copolymers, in vitro degradation, cytocompatibility, MTT assay, capillary electrophoresis, hydrolysis kinetics, functional labels, biocompatibility.

Нестерович Василий Максимович

аспирант ФИЦ Биотехнологии РАН I года обучения

научная специальность 1.5.6. Биотехнология

e-mail: liumini@yandex.ru

Научные руководители:

Пометун Анастасия Александровна

доктор химических наук,

зав. лабораторией молекулярной инженерии

Комарова Наталья Владимировна

кандидат химических наук,

доцент НОЦ по биоинженерии



ИССЛЕДОВАНИЕ ПОДХОДОВ К ФОРМИРОВАНИЮ БИЛИПИДНОЙ МЕМБРАНЫ ДЛЯ СОЗДАНИЯ БИОСЕНСОРОВ НА ОСНОВЕ БЕЛКОВЫХ НАНОПОР

Аннотация. Биосенсоры на основе белковых нанопор являются перспективным инструментом для прямого исследования различных аналитов. Значительный интерес вызывает их совмещение с детекцией аптамерами. При создании нанопоровых биосенсоров важно получить устойчивые и функциональные билипидные мембраны на твердотельных носителях, которые могут быть легко интегрированы в конечное детектирующее устройство. В рамках первого года диссертационного исследования было выполнено сравнение методов формирования билипидной мембраны на твердотельном носителе из нитрида кремния с помощью разрыва липидных везикул, нанесения раствора липида и подъема уровня жидкости с липидной пленкой. Показано, что наиболее эффективным методом формирования билипидной мембраны на носителе из нитрида кремния является разрыв липидных везикул. Получаемая мембрана демонстрирует способность инкорпорировать порообразующие белки. Получен препарат порообразующего белка – канала секреции амилоида типа VIII *Escherichia coli* (CsgG).

Ключевые слова: биосенсоры, белковые нанопоры, порообразующие белки, аптамеры, липидный бислой, билипидная мембрана.

Нанопоровые биосенсоры представляют собой электрохимические датчики, регистрирующие изменение тока при движении растворенных частиц

через наноразмерные каналы. Молекулы в процессе транслокации через нанопору занимают в ней часть объёма, что приводит к ослаблению силы тока, протекающего через канал. Интенсивность и длительность блокады тока связаны со строением и размерами молекул, а частота событий – с их концентрацией. Наноразмерный канал может быть сформирован физическими методами в твердотельной структуре, либо его функцию может исполнять порообразующий белок [1]. Преимуществами использования белковых структур в сравнении с твердотельной технологией являются возможность получения нанопор меньшего диаметра, высокая воспроизводимость геометрических характеристик канала и возможность направленного изменения свойств канала с помощью методов генетической инженерии. Наиболее популярной областью применения биосенсоров на основе белковых нанопор в настоящее время является секвенирование нуклеиновых кислот [2], но сильные стороны метода, в первую очередь сокращение процедур пробоподготовки и возможность непосредственной детекции аналитов без использования реакций-посредников, делают нанопоровые биосенсоры перспективной платформой для разработки новых методов детекции аналитов различной природы. Одним из инновационных направлений применения биосенсоров на основе белковых нанопор является их сочетание с аптамерами. Принцип действия таких биосенсоров основан на детектировании различий в сигнале сенсора при транслокации через него свободных аптамера и мишени либо их комплекса. Аптамеры являются устойчивыми и селективно аффинными молекулами нуклеиновой природы. Возможность получения аптамеров против широкого спектра мишеней и значительный накопленный опыт исследования нуклеиновых структур с помощью нанопоровых сенсоров обосновывают перспективность направления нанопоровой аптасенсорики, но оно все еще остается малоисследованным.

Структура преобразователя сигнала биосенсоров на основе белковых нанопор включает в себя три ключевых элемента: порообразующий белок, билипидную мембрану, в которую он инкорпорирован, и твердотельный носитель, на котором располагается вся конструкция. Каждый из компонентов определяет свойства конечного изделия, но наиболее важными являются билипидные мембраны и непосредственно порообразующие белки. Свойства искусственного липидного бислоя влияют на устойчивость системы при работе и хранении, а качества нанопорового белка определяют сенсорные характеристики системы, такие как чувствительность и соотношение сигнала к шуму. При этом в литературе отсутствуют систематические данные о влиянии структуры порообразующего белка на аналитические возможности аптасенсоров. Основным носителем для липидных мембран традиционно

являются тефлоновые структуры [3]. В качестве альтернативы могут быть использованы материалы на основе кремния. Преимущества их использования заключаются в совместимости с технологиями микроэлектронных производств, что облегчает интеграцию биосенсора со схемами обработки сигнала и обеспечивает миниатюризацию и энергоэффективность конечного устройства. Однако использование такого рода элементов в качестве носителя билипидных мембран остается открытой научной задачей в технологиях нанопоровой биосенсорики.

Целью данной работы является исследование эффективности различных подходов для создания билипидных мембран на твердотельном носителе на основе кремния для последующего инкорпорирования в них порообразующих белков, отличающихся геометрией наноразмерного канала. Задачи исследования заключаются в оценке влияния функционализации поверхности нитрида кремния на эффективность создания мембран, сравнительном анализе различных методов формирования липидного бислоя и создании практического задела для получения рекомбинантных порообразующих белков.

В качестве твердотельного носителя были выбраны мембраны из Si_3N_4 . В образцах носителя методом травления электронным лучом были сформированы сквозные отверстия диаметром ~ 5 мкм. Для создания липидного бислоя в таких отверстиях были апробированы следующие методы: нанесение липида в растворителе, подъем уровня жидкости с липидной пленкой и разрыв липидных везикул. При исследовании липидных везикул также было выполнено сравнение методов их создания по параметрам ламеллярности, размера и однородности популяций везикул в растворе. Качество полученные билипидных мембран оценивали по электрофизическим параметрам.

Согласно литературным данным, гидрофобизация поверхности твердотельного носителя способствует повышению эффективности образования мембраны [4]. В работе выполняли гидрофобизацию поверхности Si_3N_4 обработкой октадецилтрихлосиланом. Успешность силанизации была подтверждена изменением контактного угла смачивания поверхности. Однако электрофизических признаков формирования мембраны на гидрофобизированном носителе не наблюдалось, и результаты электронной микроскопии свидетельствуют о том, что в отверстиях формировалась липидная пробка, а не мембрана.

Для немодифицированных носителей на основе Si_3N_4 также были апробированы три метода формирования липидного бислоя. При проведении электрофизических исследований было обнаружено, что метод нанесения

липид в растворителе проявляет склонность к закупориванию носителя липидной пробкой и непригоден для работы с данным типом носителя, а метод с подъемом уровня жидкости с липидной пленкой часто образует воздушную пробку в канале, что препятствует проведению тока. Наибольшую эффективность для создания липидного бислоя в отверстии носителя из Si_3N_4 продемонстрировал метод разрыва липидных везикул. При создании везикул сравнивались методы мягкой гидратации и обработки ультразвуком. При равных концентрациях липида в водном растворе сравнивались средние гидродинамические диаметры везикул методами динамического светорассеяния, в том числе исследовалось изменение данного параметра в зависимости от срока хранения везикул, отмечена достоверная статистическая тенденция к увеличению размера везикул при хранении. Также везикулы исследовались методами оптической и флуоресцентной микроскопии, в случае последней в состав везикул добавлялся флуоресцирующий фосфолипид. При микроскопии удалось обнаружить несколько видов липидных структур на поверхности мембран из нитрида кремния; в зависимости от условий везикулы образовывали тонкую мембрану или липидную пробку. Метод с использованием везикул при оптимизации протокола создания мембраны с постепенным охлаждением раствора позволил формировать липидный бислой. Было продемонстрировано успешное встраивание в липидный бислой модельного нанопорового белка α -гемолизина (αHL) *Staphylococcus aureus*.

Кроме того, в ходе работ по получению набора нанопоровых белков проведена гетерологичная экспрессия и очистка рекомбинантного канала секреции амилоида типа VIII *Escherichia coli* (CsgG). Качество препарата белка подтверждается методом электрофореза в полиакриламидном геле в денатурирующих условиях с последующим белковым иммуоблотом.

Основные выводы

Изучено влияние гидрофобизации поверхности носителя из нитрида кремния на эффективность формирования билипидной мембраны. Выявлено, что обработка октадецилтрихлорсиланом препятствует образованию липидного бислоя.

Выполнен сравнительный анализ методов формирования липидных бислоёв в носителе из нитрида кремния. Показано, что наиболее эффективен метод разрыва липидных везикул. Сформированные мембраны демонстрируют способность инкорпорировать модельный порообразующий белок αHL .

Получен препарат рекомбинантного порообразующего белка CsgG для последующего встраивания в билипидные мембраны.

Литература

1. Wang R., Zhang Y., Ma Q. D. Y., Wu L. Recent advances of small molecule detection in nanopore sensing // *Talanta*. – 2024. – Т. 277. – P. 126323.
2. Zhou J., Xu B. Recent patents of nanopore DNA sequencing technology: progress and challenges // *Recent Pat DNA Gene Seq*. – 2010. – Т. 4, № 3. – С. 192–201.
3. Gutsman T., Heimburg T., Keyser U., Mahendran K. R., Winterhalter M. Protein reconstitution into freestanding planar lipid membranes for electrophysiological characterization // *Nat Protoc*. – 2015. – Т.10, № 1. – С. 188 – 198.
4. Korman C. E., Megens M., Ajo-Franklin C. M., Horsley D. A. Nanopore-spanning lipid bilayers on silicon nitride membranes that seal and selectively transport ions // *Langmuir*. – 2013. Т.29, №14. – С. 4421 – 4425.

Nesterovich Vasily Maksimovich

RESEARCH CENTER OF BIOTECHNOLOGY RAS

INVESTIGATION OF APPROACHES TO THE FORMATION OF A BILIPID MEMBRANE FOR THE DEVELOPMENT OF BIOSENSORS BASED ON PROTEIN NANOPORES

Abstract. Protein nanopore-based biosensors are a promising tool for direct study of various analytes. Combination of protein nanopore technology with aptamer detection is of scientific interest. It is important to obtain stable and functional lipid bilayer membranes on solid-state supports that can be easily integrated into a final device for the development of nanopore biosensors. During the first year of the dissertation research a comparison of methods for lipid bilayers formation on silicon nitride chips was performed. Lipid vesicle rupture, lipid precursor deposition and rising of the liquid level with deposited lipid film were examined. It was shown that lipid vesicle rupture approach is the most effective method for lipid bilayer formation. The resulting membrane demonstrates the ability to incorporate pore-forming proteins. Also, the pore-forming protein (the curli secretion channel of type VIII secretion system from *Escherichia coli*) was obtained.

Keywords: biosensors, protein nanopores, pore-forming proteins, aptamers, lipid bilayer, bilipid membrane.

Самигуллина Салима Ришатовна

аспирант ФИЦ Биотехнологии РАН 1 года обучения

1.5.11 Микробиология

e-mail: samigullinasalimar@gmail.com

Научный руководитель

Назина Тамара Николаевна

доктор биологических наук, зав. лабораторией

нефтяной микробиологии



ВЛИЯНИЕ БИОЦИДОВ НА БИОРАЗНООБРАЗИЕ КОРРОЗИОННО-АКТИВНЫХ ПРОКАРИОТ ИЗ НЕФТЯНОГО МЕСТОРОЖДЕНИЯ

Аннотация. Биогенная коррозия наносит значительный ущерб нефтяной промышленности, при этом обработка биоцидами часто неэффективна из-за отсутствия оценки их воздействия на локальные прокариотные сообщества. Целью работы было определение разнообразия прокариот в пробах жидкостей из системы подготовки воды Приразломного нефтяного месторождения (с использованием методов высокопроизводительного секвенирования гена 16S рРНК и культивирования) и оценка влияния на них биоцидов. Показано, что биоциды, содержащие метанол, не подавляют, а в некоторых случаях даже стимулируют рост сульфидогенных и ацетогенных микроорганизмов, использующих метанол в качестве субстрата. В присутствии такого биоцида был выделен в чистую культуру штамм бактерий *Acetomicrobium hydrogeniformans* Pr49A. Полученные результаты свидетельствуют о необходимости мониторинга микробного биоразнообразия при выборе биоцидов для подавления биокоррозии.

Ключевые слова: биокоррозия, сульфидогенные прокариоты, ацетогенные прокариоты, биоциды, нефтяная микробиология

Биогенная коррозия была открыта более 100 лет назад и находится в фокусе исследований нефтяных микробиологов с 1926 года (Гинзбург-Карагичева, 1926; Davis, 1967; Knisz et al., 2023). Ежегодный ущерб от биокоррозии оценивается в триллионы долларов, что подтверждает высокую актуальность проблемы и необходимость поиска надежных методов предотвращения аварий в нефтяной промышленности (Pal et al., 2022).

Современные методы борьбы с биокоррозией можно разделить на три группы: физические, химические и биологические. Однако применение

многих из них на реальных объектах нефтедобычи сопряжено с трудностями. Например, при применении физического метода катодной защиты создаваемая разность потенциалов может стимулировать рост прокариот, провоцируя образование коррозионного растрескивания. Более новые биологические подходы, такие как использование фагов или ингибирование кворум сенсинга, требуют точного подбора действующих агентов, что препятствует их широкому использованию.

В настоящее время в нефтяной промышленности наиболее конвенциональным способом борьбы с коррозией остаётся обработка биоцидами. Однако для значимого повышения эффективности противокоррозионной защиты стратегически важно сочетать относительную дешевизну и технологичность биоцидной обработки с современными биологическими методами оценки влияния биоцидов на микроорганизмы, вызывающие коррозию.

Традиционно главными агентами биокоррозии считаются сульфидогенные прокариоты, к которым относят сульфат-, тиосульфат- и серовосстанавливающие бактерии и археи. Они восстанавливают окисленные соединения серы до сульфид-ионов, реагирующих с железом трубопроводов и вызывающих общую коррозию стали. Кроме того, растворённый сероводород ухудшает качество добываемой нефти. Известно, что биокоррозия является результатом комплексного воздействия консорциумов микроорганизмов, формирующих биоплёнки на поверхности металла (Pal et al., 2022). В прикреплённых сообществах реализуются механизмы синтрофного роста, в том числе прямой и не прямой перенос электронов между прокариотами (Kato et al., 2016). Метаногенные археи и сульфатвосстанавливающие бактерии (СВБ) способны получать электроны непосредственно с Fe^0 , вызывая питтинговую коррозию стали (Pal et al., 2022). Бактерии с бродильным типом метаболизма образуют органические кислоты, участвующие в окислении железа напрямую, а также молекулярный водород, являющийся донором электронов для гидрогенотрофных метаногенов и СВБ (Mand et al., 2014; Davis et al., 2021). Литоавтотрофные ацетогены способны влиять на коррозию, также используя электроны с железа: они синтезируют ацетат, который метаболизируется сульфидогенами и ацетокластическими метаногенами (Mand et al., 2014). Кроме того, прокариоты формируют биоплёнки, в которых матрикс защищает клетки от внешних воздействий и служит средой для обмена продуктами метаболизма.

Приразломное нефтяное месторождение расположено на шельфе Печорского моря, и эксплуатируется со стационарной ледостойкой платформы. Для заводнения на месторождении используется морская вода,

смешанная с пластовой водой, отделенной от нефти. Высокое содержание серы в нефти, а также разбавление пластовых вод морской водой с высокой концентрацией сульфатов создают условия для биологической коррозии стальных элементов системы очистки и подготовки воды, закачиваемой в пласт.

Многие биоциды, применяемые на месторождении для подавления биокоррозии, содержат метанол в качестве растворителя. Методом анализа V3–V4 региона гена 16S рРНК показано присутствие в пробах пластовой воды (V20002) и нагнетаемой воды (V49001) представителей разных физиологических групп, способных индуцировать микробную коррозию (Sokolova et al., 2025). Эти группы включают термофильные СВБ родов *Thermacetogenium*, *Desulfonauticus* и *Desulfacinum*, сульфитвосстанавливающие бактерии рода *Desulfitibacter*, бродильные бактерии родов *Caminicella*, *Kosmotoga* и *Petrotoga*, а также метаногенные археи родов *Methanothermococcus* и *Methanlobus*. Многие из представленных родов прокариот способны метаболизировать метанол, а периодический режим обработок в некоторых частях системы подготовки воды может способствовать развитию устойчивых микробных консорциумов на стенках оборудования. В связи с этим на месторождении регулярно сталкиваются с проблемой биокоррозии.

Целью работы было определить состав прокариотных сообществ в пробах жидкостей из системы подготовки воды Приразломного нефтяного месторождения и оценить влияние на эти сообщества биоцидов, применяемых на месторождении.

В ходе исследования были использованы микробиологические, аналитические, молекулярно-биологические и биоинформатические методы.

Объектами исследования были пробы пластовой воды из добывающих скважин (V20002) и проба нагнетаемой в пласт воды (V49001), представленная смесью пластовой, морской и сточной воды.

Эффективность воздействия биоцидов была проверена как на оригинальной пластовой воде, так и на полученных из этих проб накопительных культурах сульфидогенов, а также на чистой культуре СВБ. Эксперименты проводили с использованием семи биоцидов в трех концентрациях (50, 150 и 300 мг/л) при температуре инкубации 48°C. Наиболее эффективным оказался биоцид, содержащий тетракисгидроксиметилфосфониум сульфат, а биоциды с другими действующими веществами, в составе которых присутствовал метанол, напротив, в некоторых случаях стимулировали рост микроорганизмов по сравнению с контролем. Сульфидогенные прокариоты в пробе пластовой воды

V20002 были слабо подвержены действию биоцидов, в отличие от микроорганизмов нагнетаемой воды V49001. В накопительной культуре из пробы V49001 образование сульфида увеличивалось после обработки биоцидом, включающим метанол, по сравнению с контролем без биоцида. Для понимания действия исследуемых биоцидов на сульфидогенов, был проведен ряд опытов с чистой культурой СББ *Desulfoplanes* sp. штамм PS50. Для этого штамма биоциды на основе метанола и альдегидов (глутаровый альдегид, щавелевый альдегид, формальдегид) не показали эффективности ни в одной из исследованных дозировок.

Пробы пластовых вод и накопительных культур, в которых после контакта с биоцидами была обнаружена продукция сероводорода и показано наличие живых клеток, были исследованы методом высокопроизводительного секвенирования V3–V4 региона гена 16S рПНК. В пробе пластовой воды V20002 в присутствии биоцидов с метанолом в качестве одного из основных компонентов возрастала доля бактерий рода *Desulfovibrio* (с 24 до 40% от общего количества последовательностей в библиотеке). В накопительной культуре из пробы V49001 после контакта с биоцидом X (на основе метанола, глутарового и щавелевого альдегидов) доминировали бактерии рода *Acetomicrobium* (98% от всех последовательностей в библиотеке).

Из пробы воды V49001, используя биоцид X в качестве единственного источника углерода в среде, была получена чистая культура *Acetomicrobium hydrogeniformans* штамм Pr49A. Штамм предположительно использует метанол для ацетогенеза. В дальнейшем планируется исследовать коррозионную активность штамма Pr49A при синтрофном росте с СББ и с метаногенами в присутствии стальных купонов.

Основные выводы

1. В пробах жидкостей из системы подготовки воды Приразломного нефтяного месторождения присутствуют коррозионно-активные прокариоты что подтверждается молекулярно-экологическими и культуральными методами.
2. Показано различное воздействие семи биоцидов на рост и образование сульфида накопительными и чистыми культурами сульфидогенных микроорганизмов и необходимость уточнения эффективных концентраций биоцидов, применяемых на нефтяном месторождении.
3. Прокариоты, обнаруженные в исследованных пробах жидкостей, способны использовать процессах сульфидогенеза метанол и другие компоненты, входящие в состав биоцидов, что обуславливает необходимость применения таких биоцидов в более высоких концентрациях.

4. Получена чистая культура ацетогенной бактерии *Acetomicrobium hydrogeniformans* штамм Pr49A, использующей в качестве субстрата для роста метанол, входящий в состав биоцидов.

Таким образом, остается актуальной проблема поиска эффективных биоцидов и режимов их применения на нефтяных месторождениях для борьбы с биогенной коррозией.

Литература

1. Гинзбург-Карагичева Т. Л. Микробиологическое исследование серно-соленых вод Апшерона // Азербайджанское нефтяное хозяйство. – 1926. – № 3. – С. 30–39.
2. Davis J. B. Petroleum Microbiology. – Amsterdam: Elsevier, 1967.
3. Davis J. A., Chinthala S. P., Monty-Bromer C. N., Senko J. M. Electrochemical detection of carbon steel corrosion induced by fermentative bacteria from natural gas transmission lines // Environmental Microbiology Reports. – 2024. – Vol. 16. – Art. e70058. – URL: <https://doi.org/10.1111/1758-2229.70058> (дата обращения: 14.05.2026).
4. Kato S. Microbial extracellular electron transfer and its relevance to iron corrosion // Microbial Biotechnology. – 2016. – Vol. 9, № 2. – P. 141–148. – doi: 10.1111/1751-7915.12340.
5. Knisz J., Eckert R., Gieg L. M., Koerdт A., Lee J. S., Silva E. R., Skovhus T. L., An Stepec B. A., Wade S. A. Microbiologically influenced corrosion—more than just microorganisms // FEMS Microbiology Reviews. – 2023. – Vol. 47. – Art. fuad041. – URL: <https://doi.org/10.1093/femsre/fuad041> (дата обращения: 14.05.2026).
6. Mand J., Park H. S., Jack T. R., Voordouw G. The role of acetogens in microbially influenced corrosion of steel // Frontiers in Microbiology. – 2014. – Vol. 5. – Art. 268. – doi: 10.3389/fmicb.2014.00268.
7. Pal M. K., Lavanya M. Microbial influenced corrosion: understanding bioadhesion and biofilm formation // Journal of Bio- and Tribo-Corrosion. – 2022. – Vol. 8. – Art. 76. – URL: <https://doi.org/10.1007/s40735-022-00677-x> (дата обращения: 14.05.2026).
8. Sokolova D. S., Kruglova A. A., Semenova E. M., Mayorova T. A., Mardanov A. V., Nazina T. N. Molecular and cultural evidence of corrosive microorganisms in an offshore oil field in the Arctic (Russia) // mSystems. – 2025. – Vol. 10. – Art. e01161-25. – URL: <https://doi.org/10.1128/msystems.01161-25> (дата обращения: 14.05.2026).

Список публикаций по теме работы

Статьи

1. Bidzhieva S. K., Tourova T. P., Grouzdev D. S., Samigullina S. R., Sokolova D. S., Poltarau A. B., Avtukh A. N., Tereshina V. M., Mardanov A. V., Zhaparov N. S., Nazina T. N. Sulfate-reducing bacteria isolated from an oil field in Kazakhstan and a description of *Pseudodesulfovibrio karagichevae* sp. nov. // Microorganisms. – 2024. – Vol. 12, № 12. – Art. 2552. – URL: <https://doi.org/10.3390/microorganisms12122552> (дата обращения: 14.05.2026).

Тезисы докладов

1. Самигуллина С.Р., Биджиева С.Х., Назина Т.Н. Воздействие биоцидов на образование сульфида прокариотами из Приразломного нефтяного месторождения. XI Всероссийская Пущинская конференция «Биохимия, физиология и биосферная роль микроорганизмов» [Электронный ресурс]: сборник материалов конференции; г. Пущино, 2–4 декабря 2025 г. / под ред. Т. А. Решетиловой. – СПб.: Научные технологии, 2025. – С. 164–165. – URL: <https://publishing.intelgr.com/archive/Biokhimiya-fiziologiya-i-biosfernaya-rol-mikroorganizmov.pdf> (дата обращения: 14.05.2026) (устный доклад).

Основные достижения, патенты

1. Грамота за лучший устный доклад на XI Всероссийской Пущинской конференции «Биохимия, физиология и биосферная роль микроорганизмов».

Samigullina Salima Rishatovna
RESEARCH CENTER OF BIOTECHNOLOGY RAS

INFLUENCE OF BIOCIDES ON THE BIODIVERSITY OF CORROSION-ACTIVE PROKARYOTES FROM AN OIL FIELD

Abstract. Biogenic corrosion causes significant damage to the oil industry, yet biocide treatment is often ineffective due to a lack of assessment of its impact on local prokaryotic communities. The aim of this work was to determine the diversity of prokaryotes in fluid samples from the water treatment system of the Prirazlomnoye oil field (using high-throughput 16S rRNA gene sequencing and cultivation methods) and to evaluate the effect of biocides on them. It was shown that methanol-containing biocides do not suppress, and in some cases even stimulate,

the growth of sulfidogenic and acetogenic microorganisms that use methanol as a substrate. In the presence of such a biocide, a pure culture of the bacterial strain *Acetomicrobium hydrogeniformans* Pr49A was isolated. The obtained results indicate the need for monitoring microbial biodiversity when selecting biocides to control biocorrosion.

Keywords: biocorrosion, sulfidogenic prokaryotes, acetogenic prokaryotes, biocides, petroleum microbiology

Работа выполнена при поддержке РФФ (грант № 21-64-00019-П).

Сахарова София Александровна

аспирант ФИЦ Биотехнологии РАН 1 года обучения

научная специальность 1.5.11 Микробиология

e-mail: Sofia.A.Saharova@yandex.ru

Научный руководитель

Терёшина Вера Михайловна

доктор биологических наук,

в.н.с., рук. группы экспериментальной микологии



ИССЛЕДОВАНИЕ МЕХАНИЗМОВ АДАПТАЦИИ К ХОЛОДУ У ПСИХРОУСТОЙЧИВЫХ ГРИБОВ *LEUCONEUROSPORA* *PULCHERRIMA* И *PSYCHROPHILOMYCES ANTARCTICUS*

Аннотация. Исследованы механизмы адаптации к холоду у психроустойчивых аскомицетов *Leuconeurospora pulcherrima* и *Psychrophilomyces antarcticus* с позиции защиты мембран и макромолекул клетки. Изучение отношения грибов к температуре выявило, что *L. pulcherrima* с оптимумом роста при 15°C относится к психрофилам, а *P. antarcticus* (20-22°C) является психротолерантом. Несмотря на это показано, что оба гриба имеют схожие стратегии адаптации к холоду. Основными механизмами являются: повышение текучести мембран путём значительного роста доли полиненасыщенной α -линоленовой кислоты в фосфолипидах, низкое относительное содержание стерина, доминирование небислойных фосфолипидов, фосфатидных кислот и фосфатидилэтаноламинов, в мембранах и накопление осмолитов, трегалозы и полиолов, в цитозоле.

Ключевые слова: психрофилия, психротолерантность, трегалоза, полиолы, фосфатидные кислоты, стерины, степень ненасыщенности.

Холодоустойчивые грибы играют важную роль в круговороте веществ в криобиоценозах. Их изучение важно для понимания, как такие биоценозы преобразуются в условиях изменения климата и современной экологической обстановки [2]. Холодоустойчивые продуценты биологически активных веществ используются в пищевой, бумажной промышленности, биоремедиации, фармакологии и в сельском хозяйстве [3].

Значимым звеном адаптации к холоду является поддержание жидкокристаллического состояния мембран, что необходимо для работы связанных с ними белков и процессов. Исследование механизмов криоадаптации с позиций защиты мембран и макромолекул клетки включает

изучение изменений в составе мембранных липидов и протекторных углеводов (осмолитов) [1].

Целью работы было исследование механизмов адаптации к холоду у психроустойчивых аскомицетов *Leuconeurospora pulcherrima* и *Psychrophilomyces antarcticus*.

L. pulcherrima выделен из грунта у станции Новолазаревская в Антарктиде, а *P. antarcticus* - из грунта литорали острова Шокальского в Карском море, Арктика.

В результате определения температурных характеристик роста микромицетов было показано, что *L. pulcherrima* является истинным психрофилом, так как растёт в диапазоне от -2 до 22,5°C с оптимумом при 15°C. *P. antarcticus* относится к психротолерантам, так как растёт в диапазоне от -3 до 27°C с оптимумом в интервале 20-22,5°C.

Изучение состава осмолитов на примере психрофила *L. pulcherrima* показало, что на всех стадиях роста при 5°C количество углеводов цитозоля мицелия не превышает 5% от сухой биомассы и ниже в два раза, чем при 15°C (рис. 1). При обеих температурах количество трегалозы выше уровня маннита, но при 5°C разница между осмолитами меньше.

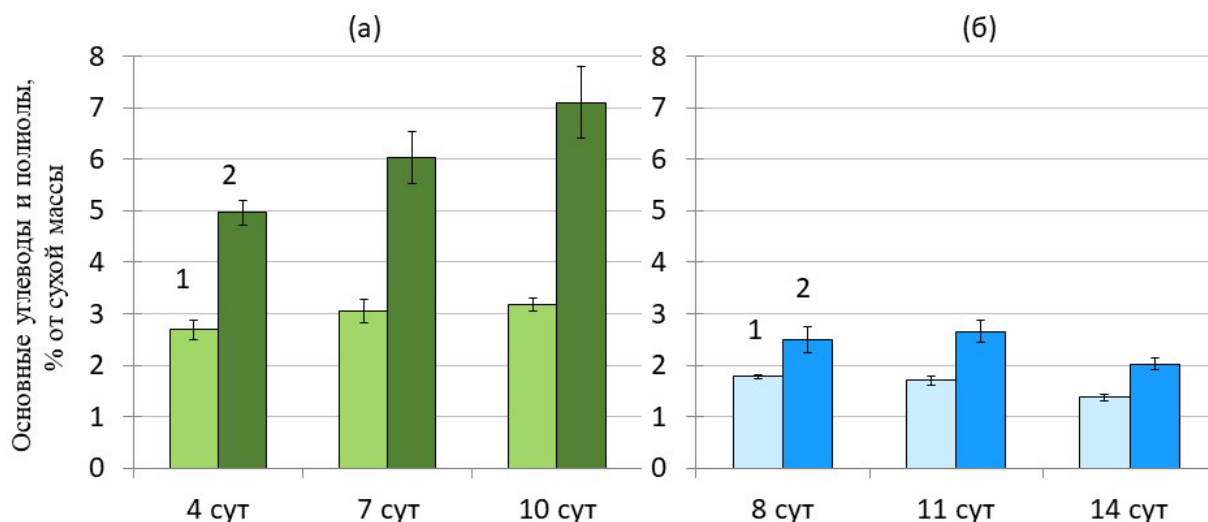


Рисунок 3. Состав основных осмолитов в процессе роста *L. pulcherrima* при 15°C (а) и при 5°C (б). (1) – маннит, (2) – трегалоза

Среди фосфолипидов у психрофила *L. pulcherrima* при обеих температурах преобладают фосфатидилэтаноламины (ФЭ), фосфатидные кислоты (ФК) и фосфатидилхолины (ФХ), тогда как доля стерина (Ст) не превышает 10% (рис. 2). При 15°C в динамике роста состав основных мембранных липидов в процессе роста не меняется, только вдвое увеличивается доля стерина. При 5°C в динамике роста наблюдается

повышение долей ФЭ и ФХ на фоне снижения содержания ФК почти в два раза; при этом доля стерина остаётся стабильно низкой и не превышает 7%.

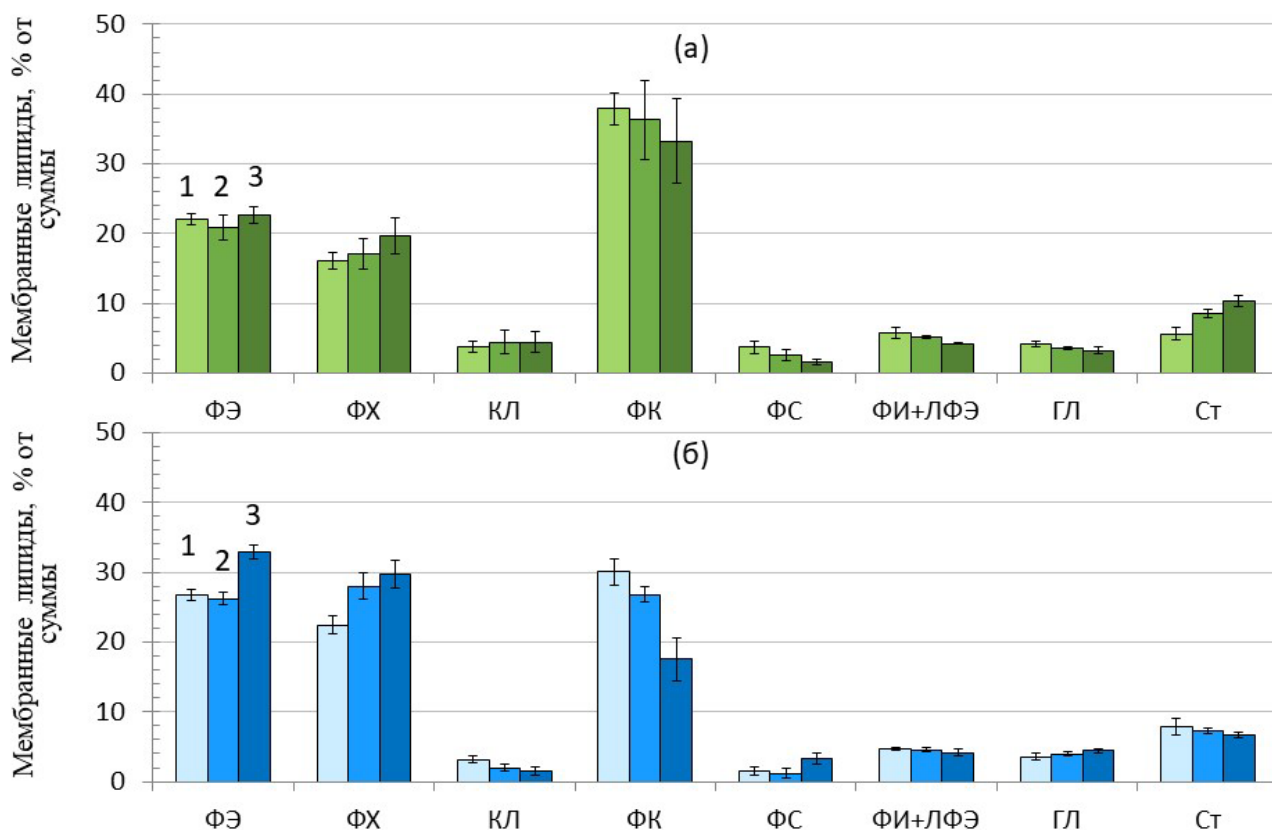


Рисунок 2. Состав мембранных липидов в процессе роста *L. pulcherrima* при 15°C (а) и при 5°C (б). ФЭ – фосфатидилэтаноламины, ФХ – фосфатидилхолины, КЛ – кардиолипиды, ФК – фосфатидные кислоты, ФС – фосфатидилсерины, ФИ – фосфатидилинозиты, ЛФЭ – лизофосфатидилэтаноламины, ГЛ – гликолипиды, Ст – стерин. (а): (1) – 4 сут, (2) – 7 сут, (3) – 10 сут. (б): (1) – 8 сут, (2) – 11 сут, (3) – 14 сут

У психротолеранта *P. antarcticus* при оптимальной температуре 20°C в фосфолипидах доминирующими жирными кислотами являются линолевая (около 50% от суммы) и пальмитиновая (20%), при этом α -линоленовая кислота является минорным компонентом (рис. 3). При 8°C α -линоленовая кислота становится одной из доминирующих, что приводит к значительному росту степени ненасыщенности (СН) на всех стадиях роста.

Таким образом, при адаптации к пониженной температуре для обоих грибов характерно значительное повышение СН за счет увеличения доли полиненасыщенной α -линоленовой кислоты в составе жирных кислот фосфолипидов, снижение соотношения стерина/фосфолипиды и увеличение доли полиолов в составе осмолитов, при этом трегалоза остаётся преобладающим осмолитом. Можно отметить, что изученные грибы имеют аналогичные механизмы адаптации к холоду, что не позволяет провести чёткую границу между психрофилами и психротолерантами.

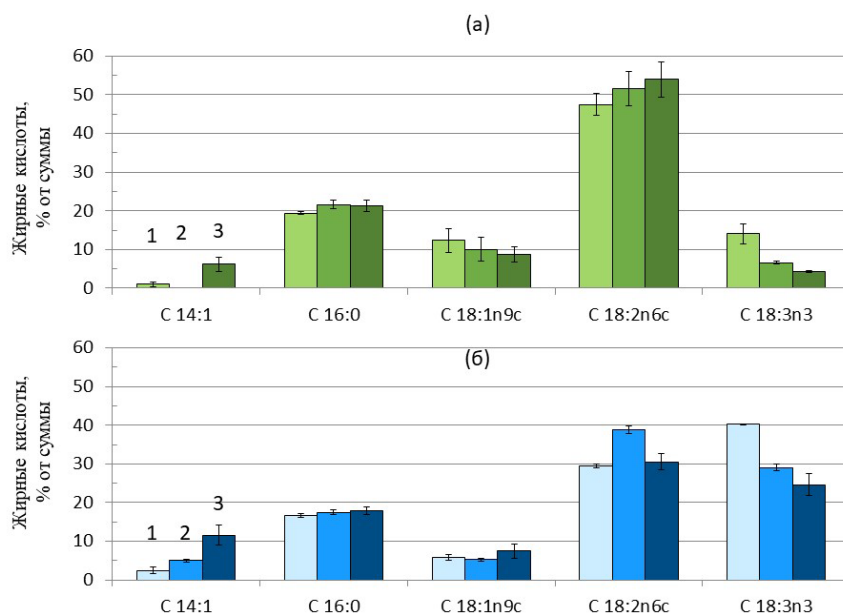


Рисунок 3. Состав основных жирных кислот фосфолипидов в процессе роста *P. antarcticus* при 20°C (а) и при 8°C (б). (а): (1) – 4 сут, (2) – 7 сут, (3) – 10 сут. (б): (1) – 9 сут, (2) – 14 сут, (3) – 18 сут

Основные выводы.

1. *L. pulcherrima* является психрофилом с оптимумом роста при 15°C и диапазоном от -2 до 22,5°C, а *P. antarcticus* – психротолерантом с оптимумом роста при 20-22,5°C и диапазоном от -3 до 25°C.
2. Для обоих грибов в процессе роста характерно доминирование трегалозы и полиолов (маннита у *L. pulcherrima* и арабита у *P. antarcticus*) в цитозоле. При низких температурах увеличивается доля полиола, но трегалоза остается одним из доминирующих осмолитов.
3. Характерной особенностью состава мембранных липидов у обоих грибов является высокое относительное содержание небислойных фосфолипидов, фосфатидных кислот и фосфатидилэтаноламинов, и низкая доля стерина. При пониженной температуре наблюдается изменение состава мембранных липидов и значительное повышение степени ненасыщенности фосфолипидов.

Литература

1. De Maayer P., Anderson D., Cary C., et al. Some like it cold: understanding the survival strategies of psychrophiles // EMBO Rep. – 2014. – V. 15. – № 5. – P. 508-517.
2. Newsham K.K., Davey M.L., Hopkins D.W., et al. Regional diversity of maritime antarctic soil fungi and predicted responses of guilds and growth forms to climate change // Front Microbiol. – 2021. – V. 11. – A. 615659.

3. Yusof N.A., Hashim N.H.F., Bharudin I. Cold adaptation strategies and the potential of psychrophilic enzymes from the antarctic yeast, *Glaciozyma antarctica* PI12 // Journal of Fungi. – 2021. – V. 7. – № 7. – A. 524.

Список публикаций по теме работы

Статьи

1. Данилова О.А., Сахарова С.А., Януцевич Е.А. Кочкина Г.А., Терёшина В.М. Роль осмолитов и мембранных липидов в адаптации к холоду у психрофильного аскомицета *Leuconeurospora pulcherrima* // Микробиология. – 2025. – Т. 94. – №6. – С. 582-593. <https://doi.org/10.1134/S0026261725602349>

2. Saharova S.A., Ianutsevich E.A., Danilova O.A., Grum-Grzhimaylo O.A., Groza N.V., Tereshina V.M. Cold adaptation mechanisms of the psychrotolerant filamentous ascomycete *Psychrophilomyces antarcticus* // Braz. J. Microbiol. 2025. – V. 56. – P. 2413-2425. <https://doi.org/10.1007/s42770-025-01787-7>

Тезисы докладов

1. Сахарова С.А. Роль осмолитов и мембранных липидов в адаптации к холоду у психрофильного аскомицета *Leuconeurospora pulcherrima* // Сборник конференции «Ломоносов 2026». – 2026. – Москва. (устный доклад, грамота за лучший доклад на секции «3. Биология»).

Saharova Sofiya Alexandrovna

RESEARCH CENTRE OF BIOTECHNOLOGY RAS

INVESTIGATION OF COLD ADAPTATION MECHANISMS IN COLD RESISTANT FUNGI *LEUCONEUROSPORA PULCHERRIMA* AND *PSYCHROPHILOMYCES ANTARCTICUS*

Abstract. The cold adaptation mechanisms of psychro-resistant ascomycetes, *Leuconeurospora pulcherrima* and *Psychrophilomyces antarcticus*, were investigated from the perspective of cellular membrane and macromolecule protection. The study of the temperature requirements of these fungi revealed that *L. pulcherrima*, with an optimal growth temperature of 15°C, is a psychrophile, while *P. antarcticus* (20 – 22°C) is psychrotolerant. Despite these differences, both species demonstrated similar cold adaptation strategies. The main mechanisms include increasing membrane fluidity by significantly increasing the proportion of polyunsaturated α -linolenic acid in phospholipids, reducing the proportion of sterols, maintaining a predominance of non-bilayer phospholipids such as phosphatidic

acids and phosphatidylethanolamines in membranes, and accumulating trehalose and polyols as osmolytes.

Keywords: psychrophilia, psychrotolerance, trehalose, polyols, phosphatidic acids, sterols, degree of unsaturation.

Торопов Артем Леонидович

аспирант ФИЦ Биотехнологии РАН 1 года обучения

научная специальность 1.5.8 Математическая

биология, биоинформатика

e-mail: arteem2300@gmail.com

Научный руководитель

Ступников Алексей Ильич

кандидат физико-математических наук,

научный сотрудник НОЦ по биоинженерии



ОСОБЕННОСТИ ВОЗРАСТНЫХ ИЗМЕНЕНИЙ ИММУННОЙ СИСТЕМЫ ПРИ САХАРНОМ ДИАБЕТЕ 2 ТИПА В РАЗЛИЧНЫХ ЭТНИЧЕСКИХ ГРУППАХ

Аннотация. Сахарный диабет 2 типа (СД2) может быть ассоциирован с нарушением физиологических программ старения иммунной системы и преждевременным появлением его отдельных признаков, однако особенности этих процессов у различных этнических групп, в том числе у российских популяций, изучены недостаточно. В связи с этим целью исследования было выявление клеточных и молекулярных признаков изменения нормального иммунного старения при СД2 и оценка этнической специфичности этих процессов на основе анализа РНК-секвенирования единичных клеток периферической крови у 251 донора из трех этнических групп России. Показано, что при СД2 наиболее выраженные изменения возрастных траекторий наблюдаются в CD8hi T-лимфоцитах и проявляются в виде преждевременного смещения от наивных к эффекторным клеткам, а также перестройки рибосомальных и воспалительных транскриптомных программ; при этом характер и выраженность этих изменений существенно различаются между этническими группами. Полученные результаты расширяют представления о механизмах нарушения иммунного старения при СД2 и подчеркивают значимость этнического фактора в формировании его гетерогенности.

Ключевые слова: диабет 2 типа, иммунное старение, РНК-секвенирование единичных клеток, популяции России, татары, чеченцы, якуты.

Одной из ключевых составляющих процесса старения организма является возрастное ремоделирование иммунной системы, сопровождающееся снижением эффективности иммунного надзора, развитием хронического вялотекущего воспаления и ослаблением иммунного

ответа на инфекционные агенты и вакцинацию. Эти изменения существенно влияют на функциональное состояние организма, повышая риск развития возраст-ассоциированных заболеваний.

В последние годы стремительное развитие технологий секвенирования единичных клеток (single-cell sequencing) позволило детально исследовать клеточный состав и функциональные изменения иммунной системы с высоким разрешением. В частности, анализ данных РНК-секвенирования единичных клеток выявил характерные возраст-ассоциированные паттерны экспрессии генов в различных популяциях циркулирующих иммунных клеток у здоровых доноров. Существенный интерес представляет изучение старения иммунной системы в контексте метаболических заболеваний, в частности сахарного диабета 2 типа (СД2). У пациентов с СД2 наблюдаются признаки преждевременного старения, включая повышенную частоту возраст-ассоциированных патологий, Т-клеточную дисфункцию, сходную с таковой при физиологическом старении, а также накопление терминально дифференцированных Т-клеток памяти [1]. Тем не менее, исследования, посвященные особенностям иммунного старения при СД2, остаются ограниченными. Существующие работы, как правило, основаны на методах с низким разрешением, анализируют ограниченное число клеточных популяций и не учитывают комплексные молекулярные механизмы, лежащие в основе этих процессов.

Кроме того, СД2 характеризуется выраженной межиндивидуальной и межпопуляционной гетерогенностью, что отражает отсутствие единого универсального механизма его развития и наличие различных молекулярных путей патогенеза [2]. В контексте иммунной системы это проявляется в различиях иммунного ответа, воспалительных процессов и механизмов иммунного старения между популяциями. При этом современное понимание патогенеза СД2 в значительной степени основано на данных, полученных преимущественно в европейских, американских и восточноазиатских популяциях, тогда как российские популяции, обладающие уникальной генетической и демографической структурой, остаются недостаточно изученными [3]. Применение современных мультиомиксных подходов, включая технологии секвенирования единичных клеток, открывает возможности для выявления популяционно-специфических особенностей влияния СД2 на иммунную систему и уточнения механизмов его патогенеза, что важно для разработки персонифицированных стратегий диагностики и терапии.

В данном исследовании был использован масштабный набор данных РНК-секвенирования единичных клеток (scRNA-seq) мононуклеарных клеток

периферической крови (PBMC) для систематического анализа нарушений процессов физиологического иммунного старения при СД2 и оценки их этнической специфичности. Основными задачами работы являлись выявление популяций иммунных клеток, наиболее подверженных ускоренному старению при СД2, анализ механизмов этих изменений на уровне клеточного состава и активности биологических путей, а также оценка вклада этнического происхождения в гетерогенность наблюдаемых фенотипов иммунного старения.

Для анализа использовались данные scRNA-seq иммунных клеток периферической крови от 251 донора, включая здоровых доноров и пациентов с СД2, принадлежащих к трем этническим группам России: чеченцам (Северный Кавказ), татарам (Поволжье) и якутам (Восточная Сибирь). Данные были дополнительно аннотированы по полу и возрасту, что позволило учитывать демографические факторы.

На первом этапе была выполнена аннотация основных популяций PBMC и оценена применимость модели sc-ImmuAging для предсказания иммунного возраста различных клеточных типов на основе транскриптомных данных [2]. Наибольшая точность предсказания была достигнута для CD4hi и CD8hi Т-лимфоцитов (коэффициент корреляции с хронологическим возрастом > 0.5). Анализ разницы между предсказанным и хронологическим возрастом показал, что у пациентов с СД2 наблюдается статистически значимое ускорение иммунного старения преимущественно в CD8hi Т-клетках. Этот эффект сохранялся как в объединенной выборке, так и при отдельном анализе этнических групп, однако его выраженность варьировала: наиболее сильный эффект наблюдался у чеченцев, тогда как у якутов значимых различий выявлено не было.

Анализ субпопуляционной структуры CD8hi Т-клеток показал, что СД2 сопровождается нарушением возрастной динамики ключевых клеточных популяций, включая преждевременное снижение доли наивных клеток и увеличение доли GZMBhi эффекторных клеток памяти. Эти изменения носили этнически-специфический характер: у чеченцев более выражено наблюдалось расширение GZMBhi популяции, тогда как у якутов - снижение доли наивных клеток. Анализ дифференциальной представленности клеток с использованием метода Milo подтвердил, что взаимодействие факторов возраста и СД2 в CD8hi Т-клетках различается между этническими группами и имеет наиболее выраженный эффект в чеченской когорте.

На транскриптомном уровне СД2 ассоциировался с нарушением баланса между рибосомальными и воспалительными процессами в CD8hi Т-клетках. В объединенной выборке наблюдалось преждевременное подавление путей,

связанных с биогенезом рибосом и трансляцией. При анализе отдельных этнических групп данный эффект оказался специфичным для чеченской когорты, где также выявлена ранняя активация воспалительных сигнатур, тогда как у татар и якутов значимых изменений обнаружено не было. Дополнительный анализ показал, что смещение баланса в сторону рибосомальных путей более характерно для наивных клеток, тогда как эффекторные субпопуляции демонстрируют смещение в сторону преимущественно воспалительного профиля. При этом регрессионный анализ с учетом субпопуляционного состава показал, что раннее развитие воспалительного профиля у чеченцев при СД2 не объясняется изменением соотношения наивных и эффекторных клеток, тогда как раннее снижение рибосомальной активности частично связано с уменьшением доли наивных CD8hi Т-клеток.

Наконец, анализ возраст-ассоциированных воспалительных изменений (inflammaging) показал, что СД2 сопровождается выраженной клеточной и этнической гетерогенностью этих процессов. В чеченской когорте наблюдалась преждевременная активация интерферон-зависимых воспалительных сигнатур не только в CD8hi, но и в CD4hi Т-клетках и CD14hi моноцитах. В якутской когорте, напротив, выявлены изменения, преимущественно связанные с регуляцией хемокиновых сигнальных путей, включая их преждевременное снижение в NK-клетках, ILC-популяциях и эффекторных Т-клетках.

Основные выводы

Таким образом, проведенный анализ демонстрирует, что сахарный диабет 2 типа ассоциирован с ускорением иммунного старения, наиболее выраженным в CD8hi Т-лимфоцитах, и сопровождается комплексной перестройкой клеточных, транскриптомных и воспалительных программ иммунной системы, характеризующейся выраженной этнической специфичностью. Эти результаты позволяют расширить представления о механизмах иммунного старения при СД2 и указывают на важную роль этнических факторов в формировании гетерогенности заболевания.

Литература

1. Zhang Z, He X, Sun Y, Li J, Sun J. Type 2 Diabetes Mellitus: A Metabolic Model of Accelerated Aging - Multi-Organ Mechanisms and Intervention Approaches. Aging Dis. (2025); doi:10.14336/AD.2025.0233.
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. Li, W., Zhang, Z., Kumar, S. et al. Single-cell immune aging clocks reveal inter-individual heterogeneity during infection and vaccination. Nat. Aging 5, 607–621 (2025); doi:10.1038/s43587-025-00819-z.

Список публикаций по теме работы

Тезисы докладов

1. Этнические особенности влияния диабета 2 типа на процессы старения иммунной системы, 15-я Международная мультиконференция «Биоинформатика регуляции и структуры геномов / системная биология» BGRS/SB-2026, Новосибирск, 6-11 июля 2026 года. (устный доклад, тезисы приняты к публикации).

Toropov Artem Leonidovich

RESEARCH CENTER OF BIOTECHNOLOGY RAS

PATTERNS OF IMMUNE AGING IN TYPE 2 DIABETES ACROSS ETHNIC POPULATIONS

Abstract. Type 2 diabetes mellitus (T2D) may be associated with disruptions of physiological immune aging programs and the premature emergence of certain aging-related features; however, these processes remain insufficiently characterized across different ethnic groups, including populations of Russia. The aim of this study was to identify cellular and molecular features of altered immune aging in T2D and to assess the ethnic specificity of these processes using single-cell RNA sequencing of peripheral blood immune cells from 251 donors representing three ethnic groups in Russia. We found that in T2D, the most pronounced alterations in age-related trajectories occur in CD8hi T cells and are characterized by a premature shift from naïve to effector states, along with remodeling of ribosomal and inflammatory transcriptional programs. Notably, both the magnitude and nature of these changes differ substantially between ethnic groups. These findings expand current understanding of the mechanisms underlying altered immune aging in T2D and highlight the importance of ethnic factors in shaping its heterogeneity.

Keywords: type 2 diabetes mellitus, immune aging, single-cell RNA sequencing, Russian populations, Tatars, Chechens, Yakuts.