



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»

19 – 21 июня 2023 г.

УДК 601(082)
ББК 30.16я43
Ф94
ISBN 978-5-00147-531-6

Сборник отчетной конференции аспирантов.

Общая редакция –

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

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

Составители: *Ю.В. Рагузова*, к.соц.н. *М.В. Костоломова*

Ф94 СБОРНИК ТЕЗИСОВ отчетной конференции аспирантов Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук» 19 – 21 июня 2023 г.». Москва: Ваш Формат, 2023. – 144 с.

ISBN 978-5-00147-531-6

Сборник включает тезисы ежегодной отчетной конференции аспирантов Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук» (19-21 июня 2023 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 19-21, 2023)

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(082)

ББК 30.16я43

© Коллектив авторов

© Федеральный исследовательский
центр «Фундаментальные основы
биотехнологии» Российской академии
наук, 2023

ОГЛАВЛЕНИЕ

БАРШЕВСКАЯ Л.В. РАЗРАБОТКА НОВЫХ ПОДХОДОВ ДЛЯ ЭФФЕКТИВНОГО ИММУНОХРОМАТОГРАФИЧЕСКОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ АНТИТЕЛ И НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНЫХ АННАЛИТОВ (профиль 1.5.4 Биохимия)	6
ЕРШОВ А.П. МИКРООРГАНИЗМЫ ИЗ НЕФТЯНЫХ ПЛАСТОВ РОССИИ И КАЗАХСТАНА, ПЕРСПЕКТИВНЫЕ ДЛЯ БИОТЕХНОЛОГИЙ ПОДАВЛЕНИЯ СУЛЬФИДОГЕНЕЗА (профиль 1.5.11 Микробиология)	11
ЕФИМОВ А.Д. RV49-ПОДОБНЫЕ БАКТЕРИОФАГИ РАСПОЗНАЮТ О-АНТИГЕНЫ КАК ОДИН ИЗ АЛЬТЕРНАТИВНЫХ ПЕРВИЧНЫХ РЕЦЕПТОРОВ (профиль 1.5.11 Микробиология)	17
ЕФРЕМОВ Г.И. АНАЛИЗ СТРУКТУРНЫХ И РЕГУЛЯТОРНЫХ ГЕНОВ БИОСИНТЕЗА КАРОТИНОИДОВ У КУЛЬТИВИРУЕМЫХ И ДИКОРАСТУЩИХ ВИДОВ <i>SOLANUM</i> СЕКЦИИ <i>LYCOPERSICON</i> (профиль 1.5.3 Молекулярная биология)	24
КУЛАКОВА М.В. ДОДЕЦИЛ СУЛЬФАТ НАТРИЯ ВЫЗЫВАЕТ РЕЗКОЕ УВЕЛИЧЕНИЕ КОНЦЕНТРАЦИИ КАЛЬЦИЯ В ЦИТОЗОЛЕ ЖИВЫХ КЛЕТОК ДРОЖЖЕЙ <i>OGATAEA PARAPOLYMORPHA</i> (профиль 1.5.4 Биохимия)	29
МАРЫНИЧ Н.К. ПОЛУЧЕНИЕ <i>FRET</i> -СЕНСОРА <i>MOXSAASOTI</i> -ХРОМОПРОТЕИН И ЕГО ПРИМЕНЕНИЕ В СОВРЕМЕННЫХ МЕТОДАХ МИКРОСКОПИИ (профиль 1.5.4 Биохимия)	32
ПЕЛЕВИНА А.В. НЕКОТОРЫЕ ОСОБЕННОСТИ РАЗВИТИЯ ФОСФАТ-АККУМУЛИРУЮЩИХ МИКРОБНЫХ СООБЩЕСТВ ПРИ РАЗНЫХ РЕЖИМАХ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ В ЛАБОРАТОРНЫХ РЕАКТОРАХ (профиль 1.5.11 Микробиология)	38
ПЕЧЕНОВ П.Ю. ИССЛЕДОВАНИЕ БИОРАЗНООБРАЗИЯ БАКТЕРИОФАГОВ ЛАКТОКОККОВ НА ПРЕДПРИЯТИЯХ МОЛОЧНОЙ ПРОМЫШЛЕННОСТИ РОССИИ (профиль 1.5.6 Биотехнология)	43
БАКУНОВА А.К. СПЕЦИФИЧНОСТЬ И СТАБИЛЬНОСТЬ ТРАНСАМИНАЗЫ ИЗ <i>HALISCO MENOBACTER HYDROSSIS</i> В РЕАКЦИЯХ С D-АМИНОКИСЛОТАМИ И ПЕРВИЧНЫМИ (R)-АМИНАМИ (профиль 1.5.4 Биохимия)	46
БИДЮК В.А. РОЛЬ ОКИСЛИТЕЛЬНОГО СТРЕССА И ДЕФИЦИТА АРОМАТИЧЕСКИХ АМИНОКИСЛОТ В МЕХАНИЗМЕ ДЕЙСТВИЯ НОВЫХ ФУНГИЦИДНЫХ НУКЛЕОЗИДОВ С ЛИПОФИЛЬНОЙ ГРУППОЙ (профиль 1.5.3 Молекулярная биология)	49
ВАРФОЛОМЕЕВА Л.А. ИЗУЧЕНИЕ МЕХАНИЗМА ДЕЙСТВИЯ ТИОЦИАНАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ МЕТОДОМ РЕНТГЕНОСТРУКТУРНОГО АНАЛИЗА (профиль 1.5.4 Биохимия)	53
ЗАХАРЫЧЕВА А.В. ИЗУЧЕНИЕ ГИДРОЛИТИЧЕСКИХ ФЕРМЕНТОВ ЭКСТРЕМАЛЬНО ГАЛОАЛКАЛОФИЛЬНОЙ АРХЕИ <i>NATRONOBIFORMA CELLULOSITROPHA</i> (профиль 1.5.11 Микробиология)	56
КРИВИЦКАЯ А.В. ЭВОЛЮЦИЯ МЕХАНИЗМА ИНГИБИРОВАНИЯ ПЕНИЦИЛЛИН-СВЯЗЫВАЮЩЕГО БЕЛКА 2 ИЗ <i>NEISSERIA GONORRHOEA</i> АНТИБИОТИКОМ ЦЕФТРИАКСОНОМ (профиль 1.5.4 Биохимия)	60
МАЛЬЦЕВА А.И. ИЗУЧЕНИЕ РАЗНООБРАЗИЯ ПУТЕЙ АВТОТРОФНОЙ АССИМИЛЯЦИИ УГЛЕРОДА У ТЕРМОФИЛЬНЫХ ПРОКАРИОТ (профиль 1.5.11 Микробиология)	64

НЕЖДАНОВА А.В. <i>MADS</i> -ДОМЕННЫЕ ФАКТОРЫ ТРАНСКРИПЦИИ УЧАСТВУЮТ В РЕГУЛЯЦИИ БИОСИНТЕЗА КАРОТИНОИДОВ В ФОТОСИНТЕЗИРУЮЩЕЙ ТКАНИ <i>NICOTIANA TABACUM L.</i> (профиль 1.5.6 Биотехнология)	68
СОЛОВЬЕВА А.Ю. ИССЛЕДОВАНИЕ МЕХАНИЗМА АКТИВАЦИИ ТИОЦИАНАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ <i>IN VITRO</i> И <i>IN VIVO</i> (профиль 1.5.4 Биохимия)	72
СУЛЕЙМАНОВ Р.З. ПОИСК И МЕТАБОЛИЧЕСКАЯ ИНЖЕНЕРИЯ НОВЫХ МЕТАНОТРОФНЫХ БАКТЕРИЙ КАК ПРОДУЦЕНТОВ КОРМОВОГО БЕЛКА ДЛЯ АКВАКУЛЬТУРЫ (профиль 1.5.11 Микробиология)	76
ШИПКОВ Н.С. СТРУКТУРА И СВОЙСТВА ТИОЦИАНАТДЕГИДРОГЕНАЗ ИЗ РАЗЛИЧНЫХ ИСТОЧНИКОВ (профиль 1.5.3 Молекулярная биология)	81
БУБНОВА А.Н. ПОИСК ПОТЕНЦИАЛЬНЫХ ПРОМОТОРНЫХ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ ДЛЯ ВАЛИДАЦИИ <i>IN VIVO</i> ПО ПРИЗНАКАМ ДОСТУПНОСТИ ХРОМАТИНА И САЙТАМ ИНИЦИАЦИИ ТРАНСКРИПЦИИ (профиль 1.5.6 Биотехнология)	84
ГАЛЛЯМОВ А.А. ЗНАЧИМОСТЬ КОНТЕКСТА ПРИОНОГЕННЫХ ДОМЕНОВ ДЛЯ ПРОЯВЛЕНИЯ ИХ ПРИОННЫХ СВОЙСТВ НА ПРИМЕРЕ ПРИОННОГО БЕЛКА RNQ1 (профиль 1.5.3 Молекулярная биология)	87
ГАЛУЗА О.А. ВЫЖИВАЕМОСТЬ МОЛОЧНОКИСЛЫХ БАКТЕРИЙ В ГЕЛЯХ ОРГАНИЧЕСКОГО И СМЕШАННОГО СОСТАВА (профиль 1.5.11 Микробиология)	91
КАЛИНИН Д.С. РАЗРАБОТКА МОДЕЛИ ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ СПОСОБНОСТИ КОЛИЦИНА Е9 ПОДАВЛЯТЬ РЕПРОДУКЦИЮ ВИРУСА АЧС В КУЛЬТУРЕ КЛЕТОК ЖИВОТНЫХ (профиль 1.5.3 Молекулярная биология)	97
КУЗНЕЦОВ А.С. ПОЛУЧЕНИЕ ВЫСОКОКОНЦЕНТРИРОВАННЫХ ОЧИЩЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ STX-КОНВЕРТИРУЮЩЕГО БАКТЕРИОФАГА Ф24В И ТРЕХМЕРНАЯ РЕКОНСТРУКЦИЯ ВИРИОНОВ НА ОСНОВЕ АНАЛИЗА КРИО-ЭМ (профиль 1.5.11 Микробиология)	101
КУЛАКОВА А.В. ДИНАМИКА ИЗМЕНЕНИЯ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ УГЛЕВОДНОГО ОБМЕНА У КЛУБНЕЙ КАРТОФЕЛЯ В УСЛОВИЯХ ДЛИТЕЛЬНОГО НИЗКОТЕМПЕРАТУРНОГО ХРАНЕНИЯ (профиль 1.5.6 Биотехнология)	106
ЛАМЕРДОНОВА Ф.Х. МЕТОД КОЛИЧЕСТВЕННОЙ СПЕКТРОСКОПИИ ЯДЕРНОГО МАГНИТНОГО РЕЗОНАНСА QNMR ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ ВНУТРИКЛЕТОЧНОЙ ВОДЫ ВЫСШИХ РАСТЕНИЙ НА ПРИМЕРЕ ВИНОГРАДА (<i>VITIS VINIFERA L.</i>) И ПРОДУКТОВ ЕГО ПЕРЕРАБОТКИ (профиль 1.5.4 Биохимия)	110
ТИМОФЕЕВА Т.А. ВЛИЯНИЕ НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНОГО ГИДРОЛИЗАТА ХИТОЗАНА НА АКТИВНОСТЬ ФЕНИЛАЛАНИН-АММОНИЙ-ЛИАЗЫ В КОРНЯХ ТОМАТА (профиль 1.5.6 Биотехнология)	113
ШАБАЕВ А.В. ИЗУЧЕНИЕ БИОДЕГРАДАЦИОННОГО ПОТЕНЦИАЛА БАЗИДИОМИЦЕТОВ БЕЛОЙ ГНИЛИ РАЗЛИЧНЫХ ЭКОЛОГИЧЕСКИХ НИШ (профиль 1.5.4 Биохимия)	118
БРУСНОВА Н.А. ИЗУЧЕНИЕ ПАТОГЕННЫХ БАКТЕРИЙ МНОГОЛЕТНИХ РАСТЕНИЙ (научная специальность 1.5.6 Биотехнология)	122
ГОЛОЛОВА А.В. НОВЫЕ АЦЕТОГЕННЫЕ ПРОКАРИОТЫ: ТАКСОНОМИЯ, МЕТАБОЛИЗМ, ЭВОЛЮЦИЯ (научная специальность 1.5.11 Микробиология)	124

КОЛОСОВ А.В. ПЕРЕРАБОТКА ЭЛЕКТРОННОГО ЛОМА (ПЕЧАТНЫХ ПЛАТ) БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИМИ МЕТОДАМИ (научная специальность 1.5.6 Биотехнология)	127
ЛОБАНОВА Я.В. ВЗАИМНАЯ РЕГУЛЯЦИЯ СУМОИЛИРОВАНИЯ МЕТИЛ-ДНК СВЯЗЫВАЮЩЕГО БЕЛКА <i>KAI1</i> И ТРАНСКРИПЦИОННОГО КОРЕПРЕССОРА TRIM28 (научная специальность 1.5.3 Молекулярная биология)	130
ПАХОМОВА М.Д. ИНВАКТИВАЦИЯ ГЕНОВ, ОТВЕТСТВЕННЫХ ЗА РАЗНЫЕ ТИПЫ ГЛИКОЗИЛИРОВАНИЯ, В ШТАММЕ <i>OGATAEA PARAPOLYMORPHA</i> , ПРОДУЦИРУЮЩЕМ ГЕНЕТИЧЕСКИ КОДИРУЕМЫЙ ИНДИКАТОР КАЛЬЦИЯ GEM-GECO (научная специальность 1.5.3 Молекулярная биология).	134
САЛТЫКОВА В.А. КОНСТРУИРОВАНИЕ МИКРОБНЫХ МЕТАНОТРОФНЫХ АССОЦИАЦИЙ ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ БЕЛКА ОДНОКЛЕТОЧНЫХ НА МЕТАНЕ (научная специальность 1.5.11 Микробиология).	137
СТЕПАНОВА Н.В. ДИНАМИКА ЭКСПРЕССИИ ФОТОСИНТЕТИЧЕСКИХ ГЕНОВ В ПРОЦЕССЕ ЭМБРИОГЕНЕЗА <i>PISUM SATIVUM L.</i> (научная специальность 1.5.6 Биотехнология).	140
ФЕДОРУК Д.В. НОВЫЕ РЕШЕНИЯ В БИОТЕХНОЛОГИИ ПРОИЗВОДСТВА КОРМОВОГО БЕЛКА НА ОСНОВЕ МЕТАНОТРОФНЫХ БАКТЕРИЙ (научная специальность 1.5.11 Микробиология).	143
ШЕВЦОВ А.В. ОПРЕДЕЛЕНИЕ СИГНАТУР И СОСТОЯНИЙ РАЗЛИЧНЫХ ТИПОВ КЛЕТОК НА ОСНОВЕ ДАННЫХ СЕКВЕНИРОВАНИЯ ЕДИНИЧНЫХ КЛЕТОК (научная специальность 1.5.8 Математическая биология, биоинформатика).	146

Баршевская Любовь Владимировна

аспирант ФИЦ Биотехнологии РАН 4 года обучения

профиль 1.5.4 Биохимия

e-mail: lyubov.barshevskaya@yandex.ru

Научный руководитель

Дзантиев Борис Борисович

доктор химических наук, профессор,

руководитель отдела лиганд-рецепторных

взаимодействий и биосенсорики,

зав. лабораторией иммунобиохимии



РАЗРАБОТКА НОВЫХ ПОДХОДОВ ДЛЯ ЭФФЕКТИВНОГО ИММУНОХРОМАТОГРАФИЧЕСКОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ АНТИТЕЛ И НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНЫХ АНАЛИТОВ

Аннотация. Исследование было направлено на изучение свойств конъюгатов наночастиц-маркеров с иммунореагентами и разработку с их использованием новых схем иммунохроматографического тестирования. Установлены зависимости функциональной активности конъюгатов наночастиц золота со стрептококковым белком G от их состава с применением оригинальной методики, основанной на использовании флуорескамина. Разработана мультиплексная иммунохроматографическая система для одновременной серодиагностики бруцеллеза, туберкулеза и лейкоза крупного рогатого скота. Предложено сочетание в иммунохроматографической серодиагностике конъюгатов двух видов наночастиц – золота и квантовых точек. На примере диагностики бруцеллеза показано достигаемое при этом снижение предела обнаружения. Проведен сравнительный численный анализ математических моделей взаимодействий реагентов в конкурентных иммунохроматографических системах, включая оригинальную систему с двойной конкуренцией. На примере выявления хлорамфеникола в меде показано снижение предела обнаружения до 10 раз с использованием предложенного подхода. На примере определения имидаклоприда реализована конкурентная иммунохроматография с использованием двух типов конъюгатов наночастицы-маркера – со специфическими антителами и с конъюгатом гаптен-белок. Экспериментально охарактеризован на примере определения неомицина принцип модульной конкурентной иммунохроматографии, исключающий необходимость выбора условий иммобилизации для каждого нового иммунореагента с рисками его инактивации.

Ключевые слова: иммунохроматография, иммуноглобулин-связывающие белки, наночастицы золота, квантовые точки, серодиагностика, хлорамфеникол, имидаклоприд, неомицин

Проведенные работы включали получение и характеристику конъюгатов наночастиц-маркеров с иммунореагентами и их применение в иммунохроматографических системах определения антител и низкомолекулярных антигенов.

В качестве маркеров использовали наночастицы золота (НЧЗ) и полупроводниковые флуоресцентные наночастицы – квантовые точки (Квт), осуществляя для них адсорбционную и ковалентную иммобилизацию, соответственно. Синтезы проводили при разных соотношениях белок : наночастица. Для определения состава продуктов разработана новая методика, основанная на применении флуорескамина – соединения, образующего интенсивно флуоресцирующие комплексы с первичными аминами, а в несвязанном состоянии быстро гидролизующимся в водных растворах. Это позволяет получать данные о связывании белков с наночастицами с высокой точностью при

минимальной продолжительности и трудоемкости. Для используемых иммунореагентов – анти-тела, иммуноглобулин-связывающие белки, антигенные препараты – проведена оценка их связывания с наночастицами, определены условия синтезов конъюгатов, обеспечивающие максимальную функциональную активность продуктов. Показано соответствие количеств связываемых при этом белков их максимально плотной монослойной иммобилизации.

Рассмотрено применение полученных конъюгатов в двух типах иммунохроматографических систем – средствах серодиагностики (определения в сыворотках антител, специфичных к определенному патогену или соединению) и конкурентного определения низкомолекулярных антигенов.

Сопоставлена эффективность для целей серодиагностики конъюгатов иммуноглобулин-связывающего белка (стрептококкового белка G) с НЧЗ, детектируемыми колориметрически, и с флуоресцирующими КвТ. На примере серодиагностики бруцеллеза крупного рогатого скота (КРС) показаны преимущества КвТ, обусловленные меньшей поверхностной плотностью наночастиц на иммунохроматографической мембране, необходимой для их выявления, а также низким неспецифическим связыванием при движении потока реагентов вдоль мембран тест-полоски.

Предложен оригинальный формат проведения иммунохроматографии с сочетанием конъюгатов двух вышеуказанных видов наночастиц. Использование дополнительной стадии внесения конъюгата КвТ с белком G приводит к тому, что доминирующие в сыворотке неспецифические иммуноглобулины не препятствуют развитию аналитического сигнала, как в традиционной иммунохроматографической серодиагностике, а напротив, становятся дополнительными центрами связывания наночастиц-маркеров, усиливающего сигнал. Использование двух видов наночастиц приводит к росту сигнала в аналитической зоне в 2–3 раза по сравнению с использованием только конъюгата КвТ и более чем в девять раз по сравнению с системой на основе НЧЗ. По данным апробации предложенной системы для контроля сывороток крупного рогатого скота, ее диагностическая чувствительность и специфичность находятся в диапазоне 98–100%.

С использованием синтезированных конъюгатов нанодисперсных маркеров и аффинных молекул разработана мультиплексная иммунохроматографическая тест-система с НЧЗ для одновременной серодиагностики бруцеллеза, туберкулеза и лейкоза КРС. При апробации тест-система показала следующие уровни чувствительности диагностики: 96% по бруцеллезу, 96% по туберкулезу и 98% по лейкозу; специфичность диагностики для всех трех заболеваний составила 100%. Данные результаты подтверждают эффективность применения в серодиагностике отобранных препаратов конъюгатов иммуноглобулин-связывающих белков с наночастицами.

Конкурентные иммунохроматографические тест-системы разрабатывались на примерах средств контроля антибиотиков и инсектицидов как токсичных контаминант пищевой продукции. При этом приоритетное внимание уделялось применению тест-систем для контроля меда, для которого в силу высокой вязкости требуется специальная адаптация условий проведения иммунохроматографии.

Предложена новая иммунохроматографическая схема с двойной конкуренцией, которая обеспечивает высокочувствительную детекцию малых молекул при одностадийном тестировании и отсутствии усиливающих реагентов. В данной схеме в отсутствие аналита в пробе окрашенный комплекс в аналитической зоне формируется из иммобилизованных антител и находящихся в растворе конъюгатов антиген – белковый носитель и антитела – НЧЗ. Появляющийся в пробе антиген блокирует сайты связывания антител как на мембране, так и на поверхности наночастиц, вызывая снижение оптического сигнала в меньших концентрациях, чем в традиционном формате иммунохроматографии. Рассмотрение теоретических описаний взаимодействий в иммунохроматографии на основании математических моделей, разработанных и численно проанализированных в программной среде COPASI, дает основание для прогноза о большей чувствительности иммунохроматографического анализа с двойной конкуренцией. Экспериментальная оценка возможностей данного подхода проведена на примере определения антибиотика хлорамфеникола. Визуальный предел обнаружения, соответствующий исчезновению окрашивания в аналитической зоне, для стандартной схемы иммунохроматографии составил 50 нг/мл, а для предложенной схемы – 5 нг/мл. При инструментальной регистрации результатов анализа предел обнаружения хлорамфеникола в меде для этих схем равен 300 пг/мл и 20 пг/мл, соответственно.

Дополнительные возможности улучшения характеристик иммунохроматографии с двойной конкуренцией возникают при использовании в ней двух препаратов конъюгатов с НЧЗ – комплексов анти-

тел и антигена. Данный подход позволяет повысить регистрируемые оптические сигналы и благодаря этому установить оптимальные условия конкурентной детекции с выигрышем в чувствительности. Разработаны иммунохроматографические тесты в стандартном формате и в формате с двумя конъюгатами для детекции пестицида имидаклоприда – важного контаминанта продукции пчеловодства. Апробация разработанных тест-систем проведена с использованием контаминированных проб меда. Визуальный предел обнаружения составил 4 нг/мл как в стандартной, так и в разработанной схеме, а при приборной регистрации результатов анализа пределы обнаружения имидаклоприда в меде равнялись 0,7 и 0,3 нг/мл для стандартной и разработанной схем соответственно.

Разработана схема модульной конкурентной иммунохроматографии, основанная на использовании универсальных реагентов: аффинного модуля стрептавидин-биотин и антивидовых антител. В предложенной схеме на рабочей мембране иммобилизованы стрептавидин и стрептококковый белок G в аналитической и контрольной зонах соответственно. В качестве пары иммунореагентов используются специфические антитела и конъюгат гаптен–биотин, а для визуализации детектируемого комплекса – конъюгат НЧЗ с антивидовыми антителами. В модульной иммунохроматографии осуществляется разделение специфичных для данного аналита реагентов, смешанные в растворе для разбавления проб, и универсальной тест-полоски, содержащей только не зависящие от выбора аналита реагенты: стрептавидин и антивидовые антитела. Данное решение позволяет преодолеть недостатки традиционной конкурентной иммунохроматографии, связанные с необходимостью дополнительного выбора условий иммобилизации специфических иммунных реагентов с риском их инактивации. Предложенная универсальная тест-полоска потенциально подходит для детекции широкого круга аналитов. Переход от одного аналита к другому требует только заменить пару антитела/биотинилированный антиген, добавляемую в реакционную среду. Другие реагенты, иммобилизованные на тест-полоске, остаются неизменными. Представленный подход апробирован на примере определения неомицина в меде. Пределы визуального и инструментального обнаружения составили 0,3 и 0,014 мкг/мл.

Основные выводы. Предложены и охарактеризованы новые форматы иммунохроматографии, отличающиеся сочетанием используемых иммунореагентов и последовательностями их взаимодействий. На основании теоретического и экспериментального анализа показана эффективность этих подходов для обеспечения высокочувствительного выявления целевых аналитов. С использованием установленных закономерностей реализованы и апробированы тест-системы для выявления антител к бактериальным и вирусным патогенам и к низкомолекулярным токсикантам – антибиотикам и пестицидам. Показаны их преимущества по сравнению с традиционными форматами иммунохроматографии, соответствие практическим требованиям к контролю антибиотиков и пестицидов в продуктах питания, а также к ветеринарной диагностике. Результаты исследования демонстрируют перспективность предложенных подходов для обеспечения высокочувствительной детекции и других практически востребованных аналитов. Разработанные тест-системы представляют собой простые, удобные и эффективные инструменты для оперативной диагностики инфекционных заболеваний и контроля качества пищевой продукции.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ РАБОТЫ

Статьи

1. Barshevskaya L.V., Sotnikov D.V., Zherdev A.V., Khassenov B.B., Baltin K.K., Eskendirova S.Z., Mukanov K.K., Mukantayev K.K., Dzantiev B.B. Triple immunochromatographic system for simultaneous serodiagnosis of bovine brucellosis, tuberculosis, and leukemia // *Biosensors*. – 2019. – Vol. 9 (4). – Article 115.
2. Sotnikov D.V., Barshevskaya L.V., Zherdev A.V., Eskendirova S.Z., Mukanov K.K., Mukantayev K.K., Ramankulov Y.M., Dzantiev B.B. Immunochromatographic system for serodiagnostics of cattle brucellosis using gold nanoparticles and signal amplification with quantum dots // *Applied Sciences*. – 2020. – Vol. 10 (3). – Article 738.
3. Сотников Д.В., Баршевская Л.В., Жердев А.В., Дзантиев Б.Б. Конъюгаты антителосвязывающий белок – наночастица золота: Определение состава и применение в иммунохроматографическом анализе сульфониламида // *Прикладная биохимия и микробиология*. – 2022. – Т. 58 (1). – С. 83-88.

4. Sotnikov D.V., Barshevskaya L.V., Bartosh A.V., Zherdev A.V., Dzantiev B.B. Double competitive immunodetection of small analyte: Realization for highly sensitive lateral flow immunoassay of chloramphenicol // *Biosensors*. – 2022. – Vol. 12 (5). – Article 343.

5. Barshevskaya L.V., Sotnikov D.V., Zherdev A.V., Dzantiev B.B. Modular set of reagents in lateral flow immunoassay: Application for antibiotic neomycin detection in honey // *Biosensors*. – 2023. – Vol. 13 (5). – Article 498.

6. Sotnikov D.V., Barshevskaya L.V., Zherdev A.V., Dzantiev B.B. Enhanced lateral flow immunoassay with double competition and two kinds of nanoparticles conjugates for control of insecticide imidacloprid in honey // *Biosensors*. – 2023. – Vol. 13 (5). – Article 525.

Тезисы

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

2. Баршевская Л.В., Сотников Д.В., Бызова Н.А., Жердев А.В., Дзантиев Б.Б. Комплексы белка G с наночастицами золота: определение состава и иммуноаналитическое применение // *Научные труды III Объединенного научного форума физиологов, биохимиков и молекулярных биологов. Сочи – Дагомыс, 3-8 октября 2021 г. – Москва: Перо, 2021. – Т. 2 – С. 186 (тезисы).*

3. Баршевская Л.В., Сотников Д.В., Жердев А.В., Дзантиев Б.Б. Способы снижения предела обнаружения иммунохроматографических тест-систем для контроля антибиотиков в меде // *Материалы международного конгресса «Биотехнология: Состояние и перспективы развития».* Москва, 26–29 октября 2021 г. – Москва: ООО «Экспо-Биохим-Технологии», 2021. – Выпуск 19. – С. 219–220 (тезисы).

4. Сотников Д.В., Баршевская Л.В., Жердев А.В., Дзантиев Б.Б. Влияние количественных параметров иммуноанализа на кросс-реактивность определения структурно близких соединений // *Тезисы докладов, представленных на IV Съезде аналитиков России. Москва, 26–30 сентября 2022 г. – М. ОНТИ ГЕОХИ РАН, 2022. – С. 231 (постерный доклад).*

5. Sotnikov D.V., Barshevskaya L.V., Zherdev A.V., Dzantiev B.B. Immunochemical determination of structurally similar sulfonamide compounds in honey // *Abstracts Book. 7th International Food Safety Congress «Safe food for now and future».* Istanbul, Turkey: November 3–4, 2022. – P. 125–126 (тезисы и постерный доклад).

6. Баршевская Л.В. Получение комплексов иммунореагентов с нанодисперсными носителями, их характеристика и сравнительная оценка как компонентов серодиагностических тест-систем // *Сборник тезисов отчётной конференции аспирантов ФИЦ Биотехнологии РАН. Москва, 22–23 июня 2020 г. – Москва: МАКС Пресс, 2020. – С. 39–42 (тезисы и устный доклад).*

7. Баршевская Л.В. Разработка новых подходов для повышения чувствительности иммунохроматографических тест-систем // *Сборник тезисов отчётной конференции аспирантов ФИЦ Биотехнологии РАН. Москва, 21-25 июня 2021 г. – Москва: Ваш Формат, 2021. – С. 57–61 (тезисы и устный доклад).*

8. Баршевская Л.В. Высокочувствительный формат иммунохроматографии с двойной конкуренцией: Разработка и апробация. // *Сборник тезисов отчётной конференции аспирантов ФИЦ Биотехнологии РАН. Москва, 23-30 июня 2022 г. – Москва: Ваш Формат, 2022. – С. 72–76 (тезисы и устный доклад).*

ОСНОВНЫЕ ДОСТИЖЕНИЯ, ПАТЕНТЫ

Способ повышения чувствительности иммунохроматографического серодиагностического анализа с использованием двух маркеров: пат. 2739752 Рос. Федерация от 28.12.2020 / Сотников Д.В., Баршевская Л.В., Жердев А.В., Дзантиев Б.Б.

**RESEARCH CENTER OF BIOTECHNOLOGY RAS
DEVELOPMENT OF NEW APPROACHES FOR EFFECTIVE
IMMUNOCHROMATOGRAPHIC DETERMINATION OF ANTIBODIES AND
LOW MOLECULAR WEIGHT ANALYTES**

Abstract. The work was aimed at studying the properties of conjugates between marker nanoparticles and immunoreagents and developing new immunochromatographic schemes using them. Dependences of the functional activity of the conjugates between gold nanoparticles and streptococcal protein G on their composition were established using an original method based on the use of fluorescamine. A multiplex immunochromatographic system has been developed for the simultaneous serodiagnosis of brucellosis, tuberculosis and bovine leukemia. A combination of conjugates for two types of nanoparticles, gold and quantum dots, in immunochromatographic serodiagnostics has been proposed. On the example of brucellosis diagnostics, the decrease in the detection limit was shown. A comparative numerical analysis of mathematical models describing interactions of reagents in competitive immunochromatographic systems was carried out, including the original system with double competition. On the example of chloramphenicol detection in honey, the detection limit was ten-fold decreased. For the task of imidacloprid determination, competitive immunochromatography was implemented using two types of marker nanoparticle conjugates: with specific antibodies and with a hapten-protein conjugate. For the task of neomycin determination, the principle of modular competitive immunochromatography was experimentally characterized, which eliminates the need to find immobilization conditions for each new immunoreagent with the risks of its inactivation.

Keywords: immunochromatography, immunoglobulin-binding proteins, gold nanoparticles, quantum dots, serodiagnostics, chloramphenicol, imidacloprid, neomycin.

Ершов Алексей Павлович

аспирант ФИЦ Биотехнологии РАН 4 года обучения

профиль 1.5.11 Микробиология

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

Научный руководитель

Назина Тамара Николаевна

доктор биологических наук,

зав. лабораторией нефтяной микробиологии



МИКРООРГАНИЗМЫ ИЗ НЕФТЯНЫХ ПЛАСТОВ РОССИИ И КАЗАХСТАНА, ПЕРСПЕКТИВНЫЕ ДЛЯ БИОТЕХНОЛОГИЙ ПОДАВЛЕНИЯ СУЛЬФИДОГЕНЕЗА

Аннотация. В работе исследованы микробные сообщества нефтяных пластов Татарстана (Россия) и Республики Казахстан с целью создания биотехнологий подавления сульфидогенеза в нефтяном пласте. В исследованных микробных сообществах наиболее представленными были бактерии филумов *Pseudomonadota*, *Bacillota* и *Synergistota* и археи филума *Euryarchaeota*. Из проб пластовой воды выделены чистые культуры бактерий родов *Halomonas*, *Marinobacter* и *Ensifer*, способные к окислению алканов нефти. Определены фенотипические признаки выделенных штаммов, способствующие их распространению в нефтяном пласте, оценено образование нитритов, подавляющих рост сульфатвосстанавливающих бактерий, и выполнен геномный анализ. Штамм *Halomonas titanicae* TAT1 растёт в средах с солёностью до 200 г NaCl/л, восстанавливает нитрат с образованием нитрита. Штамм *Marinobacter lutaoensis* KAZ22 растёт при солёности до 140 г NaCl/л, не содержит генов восстановления нитратов. Штамм НО-А22 в аэробных условиях способен расти на сырой нефти, а в анаэробных условиях – восстанавливать нитраты до закиси азота в средах с неуглеводородными субстратами. На основании геномных и хемотаксономических признаков штамм НО-А22 выделен в новый вид “*Ensifer oleiphilus*” sp. nov.

Ключевые слова: денитрифицирующие бактерии, нефтяные пласты, нитратное заводнение, нитратредуктаза, полногеномное секвенирование, *Ensifer*, *Halomonas*, *Marinobacter*

Проблема накопления сульфида в пластовой воде, нефти и газе нефтяных месторождений, которые эксплуатируются с применением заводнения, известна нефтяным микробиологам уже около столетия [1]. Попадание в пласт нагнетаемой воды, содержащей растворённый кислород, приводит к активации всех функциональных групп микробного сообщества нефтяного пласта, включая сульфидогенных прокариот. Сульфат-, тиосульфат- и серовосстанавливающие, а также некоторые бродильные бактерии восстанавливают окисленные соединения серы до сульфида, накопление которого приводит к снижению качества добываемой нефти, вызывает коррозию нефтепромыслового оборудования и экологические проблемы [2]. Поиск способов воздействия на нефтяной пласт, приводящих к подавлению образования сульфида микроорганизмами пластовой воды, является важной составляющей процессов третичной добычи нефти.

Одним из способов подавления сульфидогенеза является нагнетание в пласт раствора бактерицидов вместе с водой. Глутаровый альдегид, хлорид бензалкония, сульфат тетракис (гидроксиметил) фосфония и другие аналогичные соединения селективно ингибируют активность сульфатвосстанавливающей микробиоты, тем самым снижая концентрацию сульфида в пластовой воде [3]. Однако не все сульфидогенные микроорганизмы чувствительны к такому воздействию,

более того, образование в пласте биоплёнок способствует развитию устойчивости микробного сообщества к подобным соединениям, а значительное филогенетическое разнообразие сульфатвосстанавливающих бактерий отрицательно коррелирует с эффективностью применения биотехнологий подавления сульфидогенеза, основанных на нагнетании бактерицидов в нефтяной пласт [4].

Альтернативным методом подавления биогенного образования сульфида является нитратное заводнение. Поступление в нефтяной пласт раствора нитратов приводит к активации денитрифицирующих бактерий этого сообщества, рост которых часто сопровождается накоплением нитритов в пластовой воде. Нитрит-ионы ингибируют активность фермента диссимиляционной сульфитредуктазы, тем самым снижая накопление сульфида в пластовой воде [5]. Кроме того, рост денитрифицирующей микробиоты приводит к возникновению конкуренции за доступные органические субстраты в нефтяном пласте, и поскольку процесс денитрификации энергетически более выгоден, чем сульфатредукция, происходит подавление роста сульфидогенных компонентов сообщества [6]. Изучение денитрифицирующих микроорганизмов из нефтяных пластов необходимо для разработки новых технологий подавления биогенного образования сульфида и коррозии нефтепромыслового оборудования.

Целью работы было изучение филогенетического разнообразия прокариот в пробах пластовой и нагнетаемой воды из нефтяных месторождений России и Казахстана, выделение чистых культур бактерий, способных к восстановлению нитрата в условиях нефтяного пласта, и оценка возможности их применения в биотехнологиях снижения содержания сульфида и подавления коррозии нефтепромыслового оборудования.

Объектом исследования были микроорганизмы пластовой и нагнетаемой воды Ромашкинского, Восточно-Анзирского и Черёмуховского нефтяных месторождений (Республика Татарстан, РФ) и месторождений Каражанбас и Узень (Республика Казахстан). Исследуемые нефтяные пласты в Татарстане характеризовались высокой общей солёностью пластовой воды, низкой температурой и эксплуатировались с применением заводнения пресной (речной) водой. Нефтяные пласты в Казахстане были высокотемпературными и эксплуатировались путем нагнетания морской воды Каспийского моря, сходной по солёности с пластовой водой этих месторождений.

Состав микробных сообществ проб пластовой и нагнетаемой воды был проанализирован методом высокопроизводительного секвенирования V3–V4 региона гена 16S рРНК (Illumina MiSeq, Сан-Диего, США). Во всех полученных библиотеках доминирующие филоотипы бактерий относились к филумам *Pseudomonadota*, *Bacillota* и *Actinomycetota*, включающим как углеводородокисляющих бактерий, так и бактерий, способных к восстановлению нитрата. Из накопительных культур микроорганизмов, растущих на сырой нефти, были выделены штаммы, отнесённые на основании анализа генов 16S рРНК к видам *Halomonas titanicae* (штамм TAT1), *Marinobacter lutaoensis* (штамм KAZ22) и *Ensifer morelensis* (штамм HO-A22).

Штаммы *H. titanicae* TAT1 и *M. lutaoensis* KAZ22 росли при солёности среды до 200 и 140 г NaCl/л соответственно и относились к галотолерантным бактериям. Секвенирование их геномов (Illumina HiSeq 2500, Сан-Диего, США) и анализ 120 коровых белков подтвердили их принадлежность к указанным видам. В геномах обоих штаммов аннотированы гены *alkB*, кодирующие фермент алкан-1-монооксигеназу, детерминирующий окисление алканов сырой нефти, наличие этих генов было подтверждено также методом гель-электрофореза. В геноме штамма *H. titanicae* TAT1 были обнаружены гены нитратредуктаз *narG*, *narZ* и *nxrA*, но отсутствовали гены нитритредуктазы *nir*, вследствие чего штамм восстанавливал нитрат до нитрита и накапливал последний в среде культивирования, что детектировалось реактивом Грисса. Штамм *M. lutaoensis* KAZ22 не был способен восстанавливать нитрат в связи с отсутствием у него нитратредуктаз.

В результате анализа генома штамма *E. morelensis* HO-A22 были определены значения средней нуклеотидной идентичности (ANI) и цифровой ДНК–ДНК гибридизации *in silico* (dDDH) с типовым штаммом *E. morelensis* Lc04^T, которые составляли 92.4% и 45.9% соответственно, то есть были ниже пороговых значений для выделения нового вида (при сравнении HO-A22 с другими типовыми штаммами рода *Ensifer* эти значения были ещё ниже). Определены основные хемотаксономические характеристики штамма HO-A22, включая состав фосфолипидов (доминирующими были фосфатидилхолины, фосфатидилэтаноламины, дифосфатидилглицерины и

фосфатидилглицерина), жирных кислот клеточной стенки ($C_{18:1}$, $C_{16:0}$, $C_{14:0}$, 3-OH, $C_{16:1}$ и $C_{17:1}$, где $C_{16:1}$, $C_{17:1}$ и $C_{18:1}$ – суммы изомеров) и хинонов (преобладающим был менахинон Q10). На основании филогеномного анализа и перечисленных признаков штамм НО-А22 был отнесён к новому виду рода *Ensifer* – “*Ensifer oleiphilus*” sp. nov. В его геноме были обнаружены гены *nar*, *nir* и *nor*, кодирующие ферменты восстановления нитрата до закиси азота, что подтверждалось накоплением N_2O в газовой фазе при росте этого штамма.

Основные выводы. Из проб пластовой и нагнетаемой воды нефтяных месторождений России и Казахстана выделены чистые культуры углеводородокисляющих бактерий родов *Halomonas*, *Marinobacter* и *Ensifer*. Штамм *H. titanicae* TAT1 способен расти при высокой минерализации среды в анаэробных условиях, накапливая в среде культивирования нитрит; штамм *M. lutaoensis* KAZ22 тоже проявляет галотолерантные свойства, однако является строго аэробным. Штамм НО-А22 окисляет алканы нефти и потенциально способен расти в анаэробной зоне нефтяных пластов при использовании технологии нитратного заводнения за счёт восстановления нитрата до закиси азота. На основании анализа полного генома и хемотаксономических признаков штамм НО-А22 отнесён к новому виду “*Ensifer oleiphilus*” sp. nov. Таким образом, штаммы TAT1 и НО-А22 представляются наиболее перспективными для применения в биотехнологиях снижения содержания сульфида в пластовой воде и подавления коррозии нефтепромыслового оборудования.

ЛИТЕРАТУРА

1. Bastin E.S. The presence of sulfate-reducing bacteria in oilfield waters // Science. – 1926. – Vol. 63. – P. 21-24.
2. Agrawal A. et al. Souring in low-temperature surface facilities of two high-temperature Argentinian oil fields // Applied Microbiology and Biotechnology. – 2014. – Vol. 98 (18). – P. 8017-8029.
3. Pereira G.F. et al. The impact of bacterial diversity on resistance to biocides in oilfields // Scientific Reports. – 2021. – Vol. 11 (1). – P. 23027.
4. Shi X. et al. Long-term biocide efficacy and its effect on a souring microbial community // Applied and Environmental Microbiology. – 2021. – Vol. 87 (17). – P. e00842-21.
5. Prajapat G. et al. Control of reservoir souring by incomplete nitrate reduction in Indian oil fields // Bioresource Technology Reports. – 2023. – Vol. 21. – P. 101302.
6. Da Silva M.L.B. et al. Effects of nitrate injection on microbial enhanced oil recovery and oilfield reservoir souring // Applied Biochemistry and Biotechnology. – 2014. – Vol. 174. – P. 1810-1821.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ РАБОТЫ

Статьи

1. Назина Т.Н., Соколова Д.Ш., Бабич Т.Л., Семёнова Е.М., Ершов А.П., Биджиева С.Х., Борзенков И.А., Полтараус А.Б., Хисаметдинов М.Р., Турова Т.П. Микроорганизмы низкотемпературных месторождений тяжелой нефти (Россия) и возможность их применения для вытеснения нефти // Микробиология. – 2017. – Т. 86. – № 6. – С. 748-761.
2. Nazina T., Sokolova D., Grouzdev D., Semenova E., Babich T., Bidzhieva S., Serdukov D., Volkov D., Bugaev K., Ershov A., Khisametdinov M., Borzenkov I. The potential application of microorganisms for sustainable petroleum recovery from heavy oil reservoirs // Sustainability. – 2020. – Vol. 12 (1). – P. 15.
3. Семенова Е.М., Ершов А.П., Соколова Д.Ш., Турова Т.П., Назина Т.Н. Разнообразие и биотехнологический потенциал нитратредуцирующих бактерий из месторождений тяжелой нефти (Россия) // Микробиология. – 2020. – Т. 89. – № 6. – С. 675-687.
4. Соколова Д.Ш., Семенова Е.М., Груздев Д.С., Ершов А.П., Биджиева С.Х., Иванова А.Е., Бабич Т.Л., Сисенбаева М.Р., Бисенова М.А., Назина Т.Н. Микробное разнообразие и потенциальные продуценты сероводорода в нефтяном месторождении Каражанбас (Казахстан) // Микробиология. – 2020. – Т. 89. – № 4. – С. 462-473.
5. Sokolova D.S., Semenova E.M., Grouzdev D.S., Bidzhieva S.K., Babich T.L., Loiko N.G., Ershov A.P., Kadnikov V.V., Beletsky A.V., Mardanov A.V., Zhaparov N.S., Nazina T.N. Sulfidogenic

microbial communities of the Uzen high-temperature oil field in Kazakhstan // *Microorganisms*. – 2021. – Vol. 9. – P. 1818.

6. Турова Т.П., Соколова Д.Ш., Семенова Е.М., Ершов А.П., Груздев Д.С., Назина Т.Н. Геномные и физиологические характеристики галофильных бактерий родов *Halomonas* и *Marinobacter* из нефтяных пластов // *Микробиология*. – 2022. – Т. 91. – № 3. – С. 285-299.

7. Semenova E.M., Babich T.L., Sokolova D.S., Ershov A.P., Raievska Y.I., Bidzhieva S.K., Stepanov A.L., Korneykova M.V., Myazin V.A., Nazina T.N. Microbial communities of seawater and coastal soil of Russian Arctic region and their potential for bioremediation from hydrocarbon pollutants // *Microorganisms*. – 2022. – Vol. 10. – P. 1490.

Тезисы

1. Semenova E., Sokolova D., Babich T., Borzenkov I., Ershov A., Tourova T., Poltarau A., Nazina T. Microbial communities of heavy oil reservoirs // FEMS 2017. 7th congress of European microbiologists (July 9-13, 2017). Abstract Book. – Valencia, Spain. – 2017. – P. 977. URL: https://fems-microbiology.org/wp-content/uploads/2020/05/FEMS2017_abstracts-book.pdf

2. Sokolova D., Babich T., Semenova E., Ershov A., Bidzhieva S., Borzenkov I., Khisametdinov M., Tourova T., Nazina T. Diversity of microorganisms in heavy oil reservoirs (Russia) and their possible application in MEOR // International Biotechnology and Research Conference (April 25-27, 2018). Conference Proceedings. – Rome, Italy [Электронный ресурс]. – 2018. – P. 20. URL: <https://madridge.org/journal-of-biotechnology-and-recent-advances/biotechnology-2018-scientificsession-proceedings/2639-4529.a1.002-s008.pdf>

3. Ершов А.П., Семенова Е.М. Анаэробная биodeградация нефти денитрифицирующими бактериями из нефтяных пластов // Материалы Международного молодежного научного форума «ЛОМОНОСОВ-2018» (Москва, 9-13 апреля 2018 г.) / Отв. ред. И.А. Алешковский, А.В. Андриянов, Е.А. Антипов [Электронный ресурс] – М.: МАКС Пресс. – 2018. – ISBN 978-5-317-05800-5.

4. Ершов А.П. Разнообразие денитрифицирующих бактерий из низкотемпературных месторождений тяжелой нефти // Материалы Международного молодежного научного форума «ЛОМОНОСОВ-2019» (8-12 апреля 2019 г.) / Отв. ред. И.А. Алешковский, А.В. Андриянов, Е.А. Антипов [Электронный ресурс] – М.: МАКС Пресс. – 2019. – ISBN 978-5-317-06100-5.

5. Ершов А.П. Функциональное и филогенетическое разнообразие микроорганизмов месторождений тяжелой нефти // Сборник тезисов отчетной конференции аспирантов: направление подготовки 06.06.01 Биологические науки (Москва, 22-30 июня 2020 г.) / под ред. В.О. Попова, А.Н. Фёдорова; сост. Е.С. Титова. – М.: МАКС Пресс. – 2020. – С. 133-137. – ISBN 978-5-317-06442-6.

6. Соколова Д.Ш., Бабич Т.Л., Семенова Е.М., Груздев Д.С., Биджиева С.Х., Ершов А.П., Сердюков Д.В., Волков Д.С., Бугаев К.А., Хисаметдинов М.Р., Борзенков И.А., Назина Т.Н. Микробное разнообразие в месторождениях тяжелой нефти как основа для создания биотехнологий увеличения нефтеизвлечения // Материалы международного форума «Биотехнология: состояние и перспективы развития» (Москва, 28-30 октября 2020 г.). – М.: ООО «ЭКСПО-БИОХИМ-ТЕХНОЛОГИИ». – 2020. – С. 365-367. – ISBN 978-5-6045396-0-6.

7. Ershov A., Sokolova D., Babich T., Semenova E., Bidzhieva S., Grouzdev D., Zhaparov N., Nazina T. Sulfidogenic microbial communities of the Uzen oil field and their resistance to biocides // 8th International Symposium on Applied Microbiology and Molecular Biology in Oil Systems (June 8-11, 2021). Abstract Book. – Virtual Symposium. – 2021. – P. 34-35. URL: https://ismos-8.org/wp-content/uploads/2021/06/07062021_ISMOS-8_ABSTRACT-BOOKFINALFINAL.pdf

8. Ершов А.П. Денитрифицирующие бактерии из нефтяных пластов, перспективные для биотехнологий вытеснения нефти и снижения образования сульфида // Сборник тезисов ежегодной отчетной конференции аспирантов Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук» (Москва, 21-25 июня 2021 г.) / под ред. В.О. Попова, А.Н. Фёдорова; сост. Е.С. Титова. – М.: ВАШ ФОРМАТ. – 2021. – С. 168-173. – ISBN 978-5-00147-303-9.

9. Ершов А.П. Сульфидогенные микробные сообщества нефтяного месторождения Узень и их устойчивость к бактерицидам // Материалы Международного молодежного научного форума «ЛО-

МОНОСОВ-2021» (Москва, 12-23 апреля 2021 г.) / Отв. ред. И.А. Алешковский, А.В. Андриянов, Е.А. Антипов, Е.И. Зимакова [Электронный ресурс] – М.: МАКС Пресс. – 2021. – ISBN 978-5-317-06593-5.

10. Соколова Д.Ш., Семёнова Е.М., Бабич Т.Л., Груздев Д.С., Биджиева С.Х., Ершов А.П., Жапаров Н.С., Назина Т.Н. Функциональное и филогенетическое разнообразие микроорганизмов в нефтяном месторождении Узень (Казахстан) как основа для создания биотехнологии увеличения нефтеизвлечения // 3-й Российский микробиологический конгресс (Псков, 26 сен. – 1 окт. 2021 г.): материалы конгресса. – Псков: Псковский государственный университет. – 2021. – С. 101. – ISBN 978-5-00200-015-9.

11. Bidzhieva S., Babich T., Sokolova D., Semenova E., Ershov A., Nazina T. Sulfate-reducing and fermentative bacteria from petroleum reservoirs // FEMS Conference on Microbiology in association with Serbian Society of Microbiology (30 June – 2 July 2022). Electronic abstract book. – Belgrade, Serbia. – 2022. – P. 430-431. – ISBN 978-86-914897-8-6.

12. Ershov A., Sokolova D., Semenova E., Tourova T., Grouzdev D., Nazina T. Halophilic bacteria of the genera *Halomonas* and *Marinobacter* from petroleum reservoirs and their possible applications in biotechnology // Bioinformatics of Genome Regulation and Structure/Systems Biology (BGRS/SB-2022): The Thirteenth International Multiconference (04-08 July 2022, Novosibirsk, Russia). Abstracts / Institute of Cytology and Genetics, the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences. – Novosibirsk: ICG SB RAS. – 2022. – P. 521-522. – ISBN 978-5-91291-059-3.

13. Sokolova D., Babich T., Semenova E., Bidzhieva S., Ershov A., Grouzdev D., Khisametdinov M., Nazina T. Microorganisms of low temperature oil field with high-salinity formation water in Tatarstan (Russia) and their potential for MEOR application // Bioinformatics of Genome Regulation and Structure/Systems Biology (BGRS/SB-2022): The Thirteenth International Multiconference (04-08 July 2022, Novosibirsk, Russia). Abstracts / Institute of Cytology and Genetics, the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences. – Novosibirsk: ICG SB RAS. – 2022. – P. 537-538. – ISBN 978-5-91291-059-3.

14. Ершов А.П., Соколова Д.Ш., Семенова Е.М., Турова Т.П., Груздев Д.С., Назина Т.Н. Галофильные бактерии родов *Halomonas* и *Marinobacter* из нефтяных пластов России и Казахстана и их биотехнологический потенциал // XXXIV международная зимняя молодёжная научная школа «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии» (Москва, 8-11 февраля 2022 г.): сборник тезисов / под ред. д.х.н. Т.В. Овчинниковой, к.б.н. Е.А. Стукачевой. – М.: Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН. – 2022. – С. 98. URL: https://www.elibrary.ru/download/elibrary_48245187_97765328.pdf

15. Ершов А.П. Углеводородокисляющие бактерии из нефтяных пластов России и Казахстана и их биотехнологический потенциал // Сборник тезисов отчетной конференции аспирантов Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук» (Москва, 23-30 июня 2022 г.) / под ред. В.О. Попова, А.Н. Фёдорова; сост. Е.С. Титова, С.В. Соловьёва. – М.: ВАИШ ФОРМАТ. – 2022. – С. 177-184. – ISBN 978-5-00147-399-2.

16. Раевская Е., Семёнова Е.М., Ершов А.П., Бабич Т.Л., Соколова Д.Ш. Аэробные углеводородокисляющие бактерии из Арктического региона и анализ их способности расти на нефти при низких температурах // Химия и технология биологически активных веществ для медицины и фармации. II Школа молодых ученых (Москва, 5-7 апреля 2022 г.): тезисы докладов. – М.: РХТУ им. Д.И. Менделеева. – 2022. – С. 28. – ISBN 978-5-7237-1962-0.

17. Ершов А.П., Семенова Е.М., Биджиева С.Х., Назина Т.Н. Галофильные микробные сообщества из нефтяных пластов Республики Татарстан и их биотехнологический потенциал // XXXV зимняя молодёжная научная школа «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии» (Москва, 7-10 февраля 2023 г.): сборник тезисов. – М.: Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН. – 2023. – С. 151.

ОСНОВНЫЕ ДОСТИЖЕНИЯ, ПАТЕНТЫ

1. Борзенков И.А., Соколова Д.Ш., Назина Т.Н., Бабич Т.Л., Семёнова Е.М., Ершов А.П., Хисаметдинов М.Р. Штамм *Gordonia amicalis*, способный к генерации непосредственно в нефтяном пласте нефтewытесняющего агента – биоПАВ и снижающий содержание сероорганических соединений нефти. Патент на изобретение RU 2673747 C1, 29.11.2018. Заявка № 2018118079 от 16.05.2018.
2. Борзенков И.А., Семёнова Е.М., Соколова Д.Ш., Бабич Т.Л., Ершов А.П., Биджиева С.Х., Назина Т.Н. Штамм *Rhodococcus erythropolis* HO-KS22, обладающий высокой уреазной активностью, способный к генерации в нефтяном пласте нефтewытесняющего агента биоПАВ. Патент на изобретение RU 2717025 C1, 17.03.2020. Заявка № 2019114124 от 08.05.2019.
3. Лауреат стипендии Правительства РФ на 2021/2022 учебный год.
4. Победитель конкурса работ молодых ученых (III место) за работу «Галофильные микробные сообщества из нефтяных пластов Республики Татарстан и их биотехнологический потенциал». XXXV зимняя молодёжная научная школа «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии» (7-10 февраля 2023 г.).

Ershov Alexey Pavlovich

RESEARCH CENTER OF BIOTECHNOLOGY RAS MICROORGANISMS FROM PETROLEUM RESERVOIRS OF RUSSIA AND KAZAKHSTAN, PROMISING FOR BIOTECHNOLOGIES OF SULFIDOGENESIS SUPPRESSION

Abstract. In this study, microbial communities of petroleum reservoirs of Tatarstan (Russia) and the Republic of Kazakhstan were investigated in order to develop biotechnologies of sulfidogenesis suppression in the reservoirs. In the studied microbial communities, bacteria of the phyla Pseudomonadota, Bacillota, and Synergistota and archaea of the phylum Euryarchaeota were mostly represented. Pure cultures of bacteria of the genera Halomonas, Marinobacter, and Ensifer, capable of oxidizing oil alkanes, were isolated from formation water samples. Phenotypic features of the isolated strains that contribute to their spread in the oil reservoir were determined, production of nitrite that inhibit the growth of sulfate-reducing bacteria was evaluated, and genomic analysis was performed. The strain Halomonas titanicae TAT1 grows in media with salinity up to 200 g NaCl/L and reduces nitrate with the formation of nitrite. The strain Marinobacter lutaoensis KAZ22 grows at salinity up to 140 g NaCl/L and does not contain nitrate reduction genes. Under aerobic conditions, the strain HO-A22 is able to grow on crude oil, and under anaerobic conditions, it can reduce nitrates to nitrous oxide in media with non-hydrocarbon substrates. Based on the genomic and chemotaxonomic features, strain HO-A22 was assigned to a new species “Ensifer oleiphilus” sp. nov.

Keywords: denitrifying bacteria, Ensifer, Halomonas, Marinobacter, nitrate reductase, nitrate treatment, oil reservoirs, whole-genome sequencing.

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



Ефимов Александр Денисович

аспирант ФИЦ Биотехнологии РАН 4 года обучения

профиль 1.5.11 Микробиология

e-mail: efsasha@bk.ru

Научный руководитель

Летаров Андрей Викторович

доктор биологических наук,

зав. лабораторией вирусов микроорганизмов

RB49-ПОДОБНЫЕ БАКТЕРИОФАГИ РАСПОЗНАЮТ О-АНТИГЕНЫ КАК ОДИН ИЗ АЛЬТЕРНАТИВНЫХ ПЕРВИЧНЫХ РЕЦЕПТОРОВ

Аннотация. Устойчивость патогенных микроорганизмов к антибиотикам – одна из основных проблем современной медицины. В качестве альтернативы, для терапии бактериальных инфекций, возможно применение бактериофагов. Очень часто бактериофаги обладают чрезвычайно узкой специфичностью, поэтому поиск подходов, позволяющих расширить хозяйский спектр — это приоритетная задача в области фаговой терапии. Первым этапом литического жизненного цикла бактериофага является распознавание бактериальных рецепторов, расположенных на поверхности клетки. О-антиген способен эффективно экранировать клеточную поверхность и тем самым придает бактерии фенотип устойчивости к фагу. RB49-подобные фаги способны заражать О-антиген продуцирующие штаммы *E. coli*, но механизм преодоления защитных свойств О-антигена неясен. Полученные нами данные свидетельствуют о том, что все исследуемые в данной работе RB49-подобные фаги (кроме Brandy49) используют О-антиген штаммов *E. coli* F5 и F17 в качестве первичных рецепторов. Механизм адсорбции Brandy49 отличается от других фагов. Полученные данные важны для создания фаговых препаратов с искусственно модулируемым хозяйским спектром.

Ключевые слова: бактериофаг, RB49, О-антиген, адгезия

Устойчивость к антибиотикам одна из основных проблем современной системы здравоохранения [1], [2], [3], [4], [5]. По данным ВОЗ, семейство бактерий *Enterobacteriaceae* входит в список патогенных организмов, для которых поиск альтернативных антибактериальных средств является приоритетной задачей [6], [7]. Бактериофаги уже использовались как средства для борьбы с бактериальными инфекциями, а на сегодняшний день интерес к фаговой терапии постоянно растет [8], [9], [10], [11].

Одной из основных проблем фаговой терапии является узкая специфичность бактериофагов, которая зачастую ограничена в пределах штамма [12], [13]. Для увеличения терапевтического потенциала фаговых препаратов необходимо разработать такую стратегию, которая позволила бы искусственно модулировать хозяйскую специфичность базового фага, поскольку поиск и биобанкинг фагов для каждого патогена – дорогая, длительная и более трудозатратная процедура.

По нашим данным, некоторые представители бактерий семейства *Enterobacteriaceae* способны синтезировать О-антиген, который эффективно неспецифически блокирует фаговую адсорбцию [14],

[15], [16].

В процессе изучения О-антигенных защитных свойств штамма *E. coli* F17 нами был выделен бактериофаг, способный заражать данный штамм несмотря на то, что биосинтезируемый им О-антиген полностью блокирует адсорбцию некоторых Т5-подобных фагов [17]. По результатам секвенирования, этот бактериофаг с рабочим названием PF17 (Whisky49), был отнесен к группе RB49-подобных фагов. На сегодняшний день, согласно систематике, RB49-подобные фаги относятся к роду *Krischvirus* семейства *Straboviridae*. К тому же семейству относится род *Tequatrovirus* и основной его представитель – бактериофаг Т4. Ранее эти рода были объединены под общим названием “Т4-подобные” бактериофаги, поскольку генетически и морфологически их представители являются близкородственными [18], [19].

Согласно литературным данным, Т4-подобные бактериофаги распространены в окружающей среде [20], [21], [22]. Они также, относительно других групп фагов обладают более широким литическим спектром относительно семейства *Enterobacteriaceae* [20].

По современным стандартам, Т4-подобные фаги полностью отвечают критериям рациональной фаговой терапии [23], [24]. С точки зрения перспективы развития новых поколений фаговых препаратов на базе платформенных фагов с искусственно модулируемым хозяйским спектром, необходимо изучить механизмы взаимодействия фагов с их бактериальными рецепторами, например, механизм преодоления RB49-подобными фагами защитного слоя О-антигена.

RB49-подобные фаги морфологически неотличимы от бактериофага Т4 (Рис.1), при анализе изображений, полученных с помощью электронной микроскопии. Такое видимое сходство является следствием схожей генетической организации их структурных белков. В следствии этого, вышеперечисленные бактериофаги в большей степени разделяют общие принципы и механизмы развития инфекции [25].

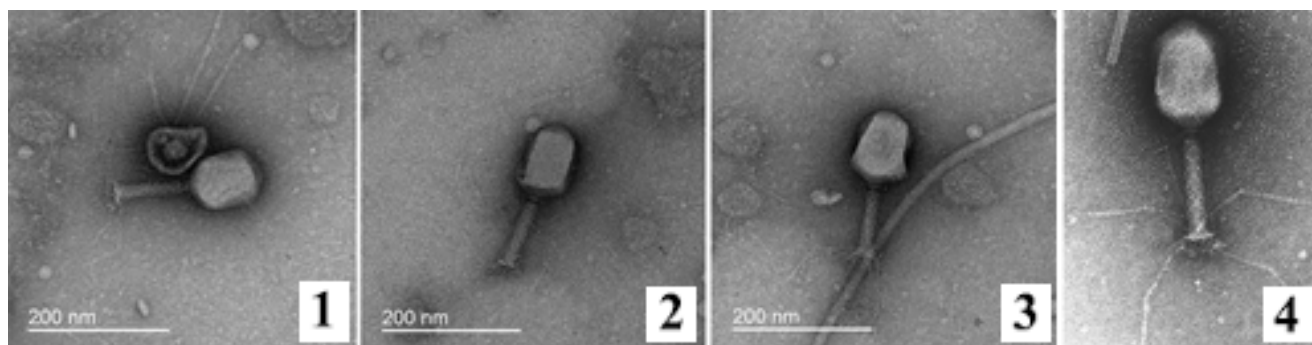


Рис. 1. Морфология вирионов RB49-подобных фагов (Brandy49, Whisky49 и Cognac49; 1-3 соответственно) и бактериофага Т4 (4) [26].

Для бактериофага Т4 известно, что во время непосредственного контакта вириона с клеточной поверхностью, длинные хвостовые фибриллы (LTF), закрепленные на дистальной части хвоста фага распознают первичный рецептор бактериальной клетки. Потенциально такое взаимодействие является обратимым, однако, как только три или более LTF связываются с рецепторами, происходит перестройка

базальной пластинки фага и раскрываются короткие хвостовые фибриллы (STF), которые распознают конечные рецепторы. Инфекция продолжается, если STF успешно связались с конечным рецептором. В противном случае, если конечного рецептора не оказалось, фаг инактивируется [27], [28].

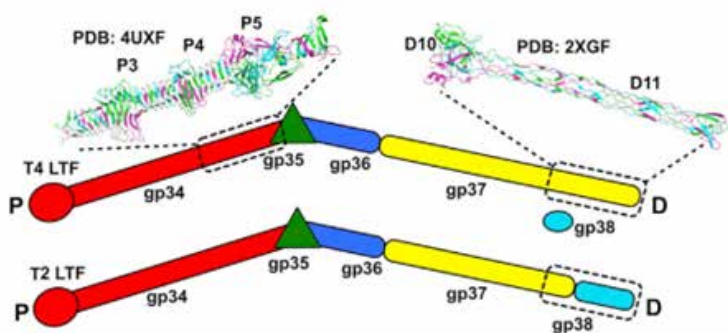


Рис. 2. Схема строения LTF бактериофага Т4 и Т2 [32].

Наиболее значимым структурным различием между бактериофагом RB49 и Т4 является организация дистального конца LTF, где располагается рецептор-связывающий белок. У фага Т4 эту

функцию выполняет белок gp37, но у бактериофага RB49, белок gp37 не имеет рецептор распознающего домена на С-конце. Рецептор-распознающую функцию, в этом случае, выполняет белок gp38, который закреплен на С-конце собственного укороченного gp37 (Рис. 2) [29]. Такая структурная организация LTF, более распространена среди фагов, по результатам биоинформатического анализа баз данных аминокислотных последовательностей [30], [31].

Для более подробного изучения механизмов, помогающих RB49-подобным фагам преодолевать защитную функцию О-антигена, нами дополнительно было выделено два новых фага (Brandy49 и Cognac49) на штаммах с изученной О-антигенной структурой: *E. coli* F5 и 4S.

Бактериофаг RB49 изначально был выделен на R-штамме *E. coli* B [31]. По литературным данным, первичным рецептором в этом случае выступает белок-порин наружной мембраны, OmpA [31]. Однако выделенные нами фаги способны эффективно инфицировать как лабораторные R-штаммы *E. coli*, так и S-штаммы, у которых все поверхностные белки замаскированы под плотным слоем О-антигена (Табл. 1).

Таблица 1

Рост RB49-подобных бактериофагов на различных штаммах *E. coli*.

Фаги	Штамм-хозяин (тип О-антигена)							
	4S (O22)	4SR (rough)	F17 (new)	F17 WbbL (rough)	F5 (O28)	F5:24B (rough)	MG1665 K12 (rough)	C600 (rough)
RB49	-	-	-	-	+	+	+	+
RB49-EK	-	-	+	-	+	+	+	+
Whisky49	-	-	+	-	+	+/-	+/-	+/-
Cognac49	-	-	-	-	+	+	+	+
Brandy49	+	+	+	+	+	+	+	+

В результате сравнительного анализа аминокислотной последовательности белков с рецептор-распознающей функцией, gp12 (STF) и gp38 (LTF) были получены следующие данные: белки gp12 идентичны у всех изучаемых фагов, а аминокислотные последовательности белка gp38 менее схожи (Рис. 3).

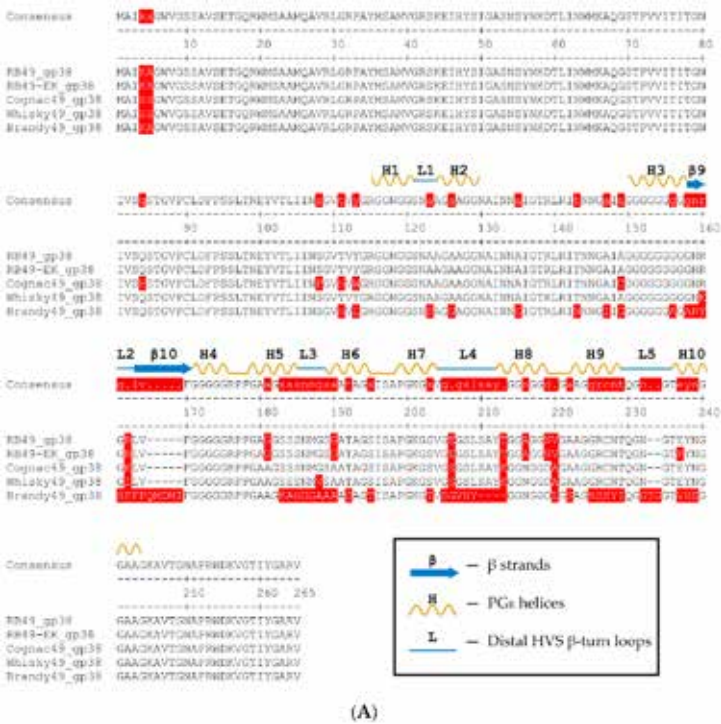


Рис. 3. Сравнение последовательностей белков, распознающих рецепторы (LTF: gp38). Несовпадения в последовательности окрашены в красный цвет. Элементы вторичной структуры С-концевого рецептор-связывающего домена указаны над консенсусной последовательностью в соответствии с их нумерацией в статье [32].

На основании полиморфизма gp38, было высказано предположение, что именно он ответствен за различия в хозяйском спектре среди изучаемых бактериофагов. Gp 38 бактериофага Brandy49 значительно отличается, но только 8 аа замен специфичны для Whisky49. Исходя из наших предположений именно эти замены дают возможность фагу Whisky49 инфицировать *E. coli* F17. Поскольку последовательности gp38 RB49 и Whisky49 в целом схожи, должно быть возможно получить мутант RB49, способный расти на *E. coli* F17 методом направленного отбора, что мы и сделали. Полногеномный анализ сиквенсов обоих полученных мутантов не выявил других различий от RB49, кроме точечных мутаций, приводящих к заменам в gp38: E230K в одном случае и Y231S в другом. Интересно, что у других фагов эти положения не различаются, следовательно, существует более одного способа для gp38 RB49 достичь специфичности в отношении *E. coli* F17. Фаговый мутант RB49 – E230K (RB49-EK) был добавлен в панель изучаемых фагов.

Белки gp38 RB49-подобных фагов имеют схожую аминокислотную последовательность, с gp38 бактериофага S16, для которого разрешена структура gp38 (Рис. 4) [32]. Благодаря этому сходству стало ясно, что множественные замены в основном ограничены вариабельными петлями, разграниченными полиглициновыми последовательностями в рецептор-распознающем домене gp38.

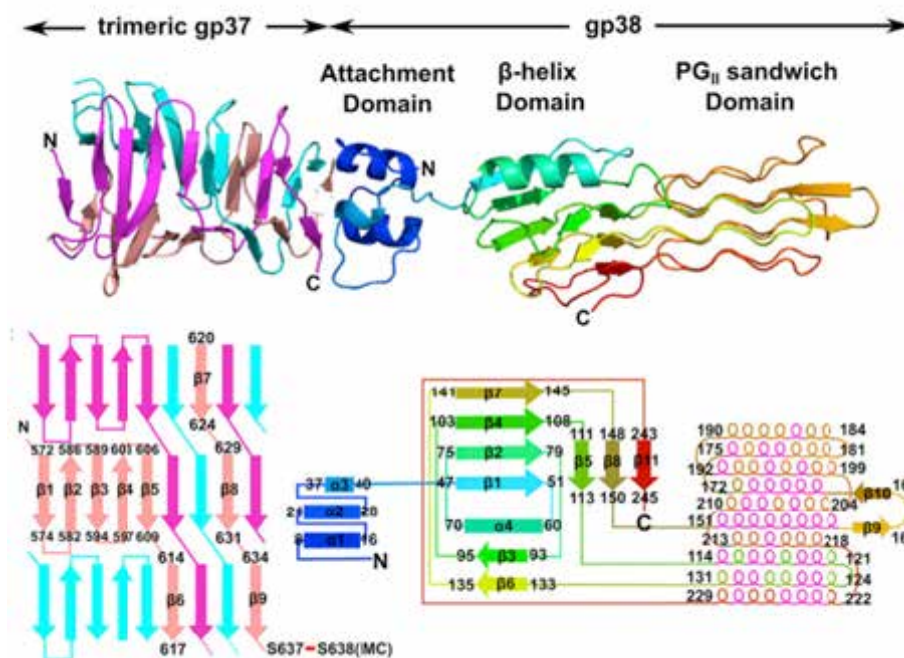


Рис. 4. Схематическая организация gp38 фага S16. [32]

Перекрестное тестирование изучаемых фагов с R-штаммами *E. coli*, дает основание предполагать, что фаги распознают что-то на поверхности внешней мембраны, например, OmpA, по аналогии с RB49. Мы протестировали наши фаги на штамме *E. coli* Keio collection – OmpAΔ. На этом штамме изучаемые фаги (кроме Brandy49) не росли, однако при восстановлении OmpA с помощью плазмиды, рост возобновился.

На основании полученных данных, механизм заражения O-антиген продуцирующих штаммов *E. coli* происходит по одному из механизмов (Рис. 5): LTF RB49-подобных бактериофагов способны проникать через O-антиген и доставать до поверхности внешней мембраны бактерий, либо LTF распознают O-антиген в качестве первичного рецептора.

Чтобы оценить, какая из гипотез применима в нашем случае, мы оценили эффективность роста изучаемых фагов на R-производных штаммах *E. coli* F5 и F17 (Табл. 1). Все фаги, кроме Brandy49, не смогли заразить R-мутант штамма F17, но R-мутанты штамма F5 остались чувствительными. Комплементация O-антигена в штамме *E. coli* F17 WbbLΔ с помощью плазмиды восстановила чувствительность к фагам Whisky49 и RB49-EK, а также способность к биосинтезу

О-антигена. Полученные данные свидетельствуют о том, что на штаммах *E. coli* F5 и F17, все изучаемые нами фаги (кроме Brandy49) способны использовать О-антиген в качестве первичного рецептора, а на R-штаммах первичным рецептором является белок OmpA.

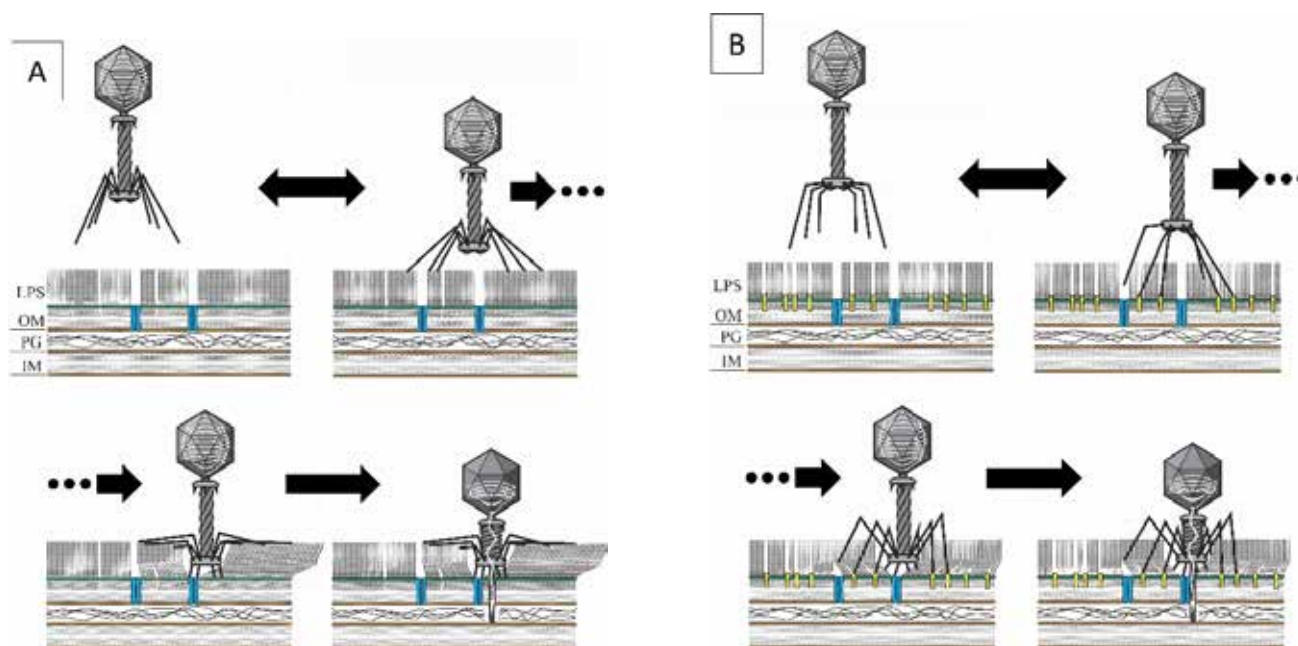


Рис. 5. Модель инфекции хозяина, продуцирующего О-антиген, RB49-подобными фагами. (А) LTF фагов RB49, Cognac49 или Whisky49 распознают О-полисахариды некоторых штаммов (таких как F5 или F17), и запускают перестройку базальной пластинки. Механическая сила разворачивания STF позволяет их С-концевым доменам, связывающим рецепторы, проникать через слой О-антигена к рецепторам на поверхности внешней мембраны. (В) LTF фага Brandy49 способны проникать через слой О-антигена, не связываясь с О-полисахаридами, чтобы распознавать рецепторы на поверхности внешней мембраны.

Для подтверждения нашего вывода были получены устойчивые к каждому из фагов дериваты *E. coli* F5 и F17. Такие штаммы обладали перекрестной устойчивостью ко всем исследуемым фагам (кроме Brandy) и не синтезируют О-антиген (Рис. 6), что согласуется с нашими выводами.

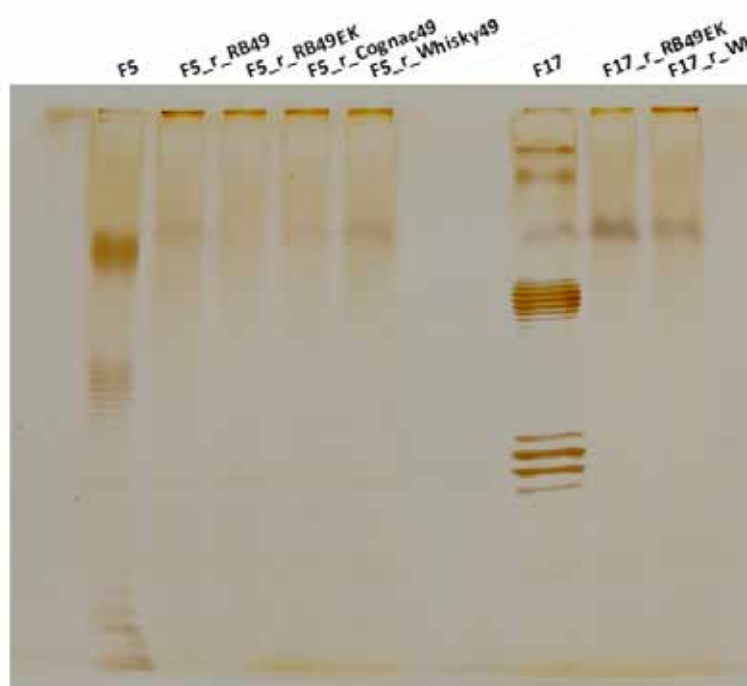


Рис. 6. ЛПС профили (SDS-PAGE) производных штаммов F5 и F17, отобранных на устойчивость к фагам RB49, RB49ЕК, Cognac49 и Whisky49.

Основные выводы. В результате экспериментов мы выяснили, что фаги RB49, RB49-EK, Cognac49 и Whisky49 способны распознавать О-антиген штаммов *E. coli* F5 и F17 в качестве первичных рецепторов и таким образом преодолевают защитные свойства О-антигена. Однако бактериофаг Brandy, по-видимому, преодолевает этот барьер с помощью иных механизмов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ghosh C. et al. Alternatives to conventional antibiotics in the era of antimicrobial resistance // Trends in microbiology. – 2019. – Vol. 27. – № 4. – P. 323-338.
2. Mancuso G. et al. Bacterial antibiotic resistance: The most critical pathogens // Pathogens. – 2021. – Vol. 10. – № 10. – P. 1310.
3. Aslam B. et al. Antibiotic resistance: a rundown of a global crisis // Infection and drug resistance. – 2018. – Vol. 11. – P. 1645.
4. MacGowan A., Macnaughton E. Antibiotic resistance // Medicine. – 2017. – Vol. 45. – № 10. – P. 622-628.
5. Pormohammad A., Nasiri M. J., Azimi T. Prevalence of antibiotic resistance in *Escherichia coli* strains simultaneously isolated from humans, animals, food, and the environment: a systematic review and meta-analysis // Infection and drug resistance. – 2019. – P. 1181-1197.
6. Suay-García B., Pérez-Gracia M. T. Present and future of carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* (CRE) infections // Antibiotics. – 2019. – Vol. 8. – № 3. – P. 122.
7. Tacconelli E. et al. Discovery, research, and development of new antibiotics: the WHO priority list of antibiotic-resistant bacteria and tuberculosis // The Lancet infectious diseases. – 2018. – Vol. 18. – № 3. – P. 318-327.
8. Nikolich M. P., Filippov A. A. Bacteriophage therapy: Developments and directions // Antibiotics. – 2020. – Vol. 9. – № 3. – P. 135.
9. Düzgüneş N., Sessevmez M., Yildirim M. Bacteriophage therapy of bacterial infections: the rediscovered frontier // Pharmaceuticals. – 2021. – Vol. 14. – № 1. – P. 34.
10. Fathima B., Archer A. C. Bacteriophage therapy: Recent developments and applications of a renaissance weapon // Research in Microbiology. – 2021. – Vol. 172. – № 6. – P. 103863.
11. Ling H. et al. Recent advances in bacteriophage-based therapeutics: Insight into the post-antibiotic era // Acta Pharmaceutica Sinica B. – 2022.
12. de Jonge P. A. et al. Molecular and evolutionary determinants of bacteriophage host range // Trends in microbiology. – 2019. – Vol. 27. – № 1. – P. 51-63.
13. Dennehy J. J., Abedon S. T. Adsorption: Phage acquisition of bacteria // Bacteriophages: biology, technology, therapy. – 2021. – P. 93-117.
14. Golomidova A. K. et al. The O-polysaccharide of *Escherichia coli* F5, which is structurally related to that of *E. coli* O28ab, provides cells only weak protection against bacteriophage attack // Archives of virology. – 2019. – Vol. 164. – P. 2783-2787.
15. Golomidova A. K. et al. Branched lateral tail fiber organization in T5-like bacteriophages DT57C and DT571/2 is revealed by genetic and functional analysis // Viruses. – 2016. – Vol. 8. – № 1. – P. 26.
16. Kulikov E. E. et al. High-throughput LPS profiling as a tool for revealing of bacteriophage infection strategies // Scientific reports. – 2019. – Vol. 9. – № 1. – P. 1-10.
17. Knirel Y. A. et al. Structure and gene cluster of the O antigen of *Escherichia coli* F17, a candidate for a new O-serogroup // International journal of biological macromolecules. – 2019. – Vol. 124. – P. 389-395.
18. Desplats C. et al. Snapshot of the genome of the pseudo-T-even bacteriophage RB49 // Journal of Bacteriology. – 2002. – Vol. 184. – № 10. – P. 2789-2804.
19. Rao V. B. et al. Bacteriophage T4 Head: Structure, Assembly, and Genome Packaging // Viruses. – 2023. – Vol. 15. – № 2. – P. 527.
20. Kaczorowska J. et al. A quest of great importance-developing a broad spectrum *Escherichia coli* phage collection // Viruses. – 2019. – Vol. 11. – № 10. – P. 899.
21. Wei X. et al. T4-like phages reveal the potential role of viruses in soil organic matter mineralization // Environmental Science & Technology. – 2021. – Vol. 55. – № 9. – P. 6440-6448.
22. Sorensen P. E. et al. New insights into the biodiversity of coliphages in the intestine of poultry // Scientific RepoRtS. – 2020. – Vol. 10. – № 1. – P. 15220.

23. Pirnay J. P. et al. Quality and safety requirements for sustainable phage therapy products // *Pharmaceutical research*. – 2015. – Vol. 32. – P. 2173-2179.
24. Abedon S. T. et al. Phage therapy: past, present and future // *Frontiers in microbiology*. – 2017. – Vol. 8. – P. 981.
25. Korf I. H. E. et al. Still something to discover: novel insights into *Escherichia coli* phage diversity and taxonomy // *Viruses*. – 2019. – Vol. 11. – № 5. – P. 454.
26. Miller E. S. et al. Bacteriophage T4 genome // *Microbiology and molecular biology reviews*. – 2003. – Vol. 67. – № 1. – P. 86-156.
27. Hu B. et al. Structural remodeling of bacteriophage T4 and host membranes during infection initiation // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2015. – Vol. 112. – № 35. – P. E4919-E4928.
28. Yap M. L., Rossmann M. G. Structure and function of bacteriophage T4 // *Future microbiology*. – 2014. – Vol. 9. – № 12. – P. 1319-1327.
29. Desplats C., Krisch H. M. The diversity and evolution of the T4-type bacteriophages // *Research in microbiology*. – 2003. – Vol. 154. – № 4. – P. 259-267.
30. Hyman P., van Raaij M. Bacteriophage T4 long tail fiber domains // *Biophysical Reviews*. – 2018. – Vol. 10. – № 2. – P. 463-471.
31. Trojet S. N. et al. The gp38 adhesins of the T4 superfamily: a complex modular determinant of the phage's host specificity // *Genome biology and evolution*. – 2011. – Vol. 3. – P. 674-686.
32. Dunne M. et al. *Salmonella* phage S16 tail fiber adhesin features a rare polyglycine rich domain for host recognition // *Structure*. – 2018. – Vol. 26. – № 12. – P. 1573-1582. e4.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ РАБОТЫ

Статьи

1. Efimov A. et al. Isolation and sequencing of three RB49-like bacteriophages infecting O antigen-producing *E. coli* strains // *F1000Research*. – 2021. – Vol. 10. – № 1113. – P. 1113.
2. Efimov A. D. et al. RB49-like Bacteriophages Recognize O Antigens as One of the Alternative Primary Receptors // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2022. – Vol. 23. – № 19. – P. 11329.
3. Летаров А. В. и др. Распознавание клеточной поверхности колифагами // *Проблемы медицинской микологии*. – 2020. – Т. 22. – № 3. – С. 98-98.

Efimov Alexandr Denisovich

RESEARCH CENTER OF BIOTECHNOLOGY RAS RB49-LIKE BACTERIOPHAGES RECOGNIZE O ANTIGENS AS ONE OF THE ALTERNATIVE PRIMARY RECEPTORS

Abstract. Bacterial antibiotic resistance among pathogens is one of the main problems in medicine. Alternatively, bacteriophages may be used to treat bacterial infections. The main problem of bacteriophages in medicine is their narrow host range. Therefore, there is a priority objective in the field of phage therapy to find approaches for host range extension. The first step of bacteriophage infection is the recognition of receptors on the bacterial surface. The O-antigen is able to effectively shield the bacterial surface and thereby making bacteria resistant to phages. RB49-like phages are able to infect O-antigen producing strains of *E. coli*, but the mechanisms of overcoming the protective properties of the O-antigen remain unclear. According to our data, all RB49-like phages in this work (except Brandy49) may use the O-antigen of *E. coli* F5 and F17 as primary receptors. The adsorption mechanism of Brandy49 differs from that of the other phages. Our results are important for the creation of phages with the host spectrum alteration ability.

Keywords: bacteriophage, RB49, O-antigen, adhesion.

Ефремов Глеб Ильич

аспирант ФИЦ Биотехнологии РАН 4 года обучения

профиль 1.5.3 Молекулярная биология

e-mail: gleb_efremov@mail.ru

Научный руководитель

Кочиева Елена Зауровна

доктор биологических наук, профессор,

зав. лабораторией системной биологии растений



АНАЛИЗ СТРУКТУРНЫХ И РЕГУЛЯТОРНЫХ ГЕНОВ БИОСИНТЕЗА КАРОТИНОИДОВ У КУЛЬТИВИРУЕМЫХ И ДИКОРАСТУЩИХ ВИДОВ *SOLANUM* СЕКЦИИ *LYCOPERSICON*

Аннотация. Томат *Solanum lycopersicum* L. является важной сельскохозяйственной культурой и, одновременно, моделью для изучения онтогенеза сочного плода. Каротиноид-цис-транс-изомераза *CRTISO* и 9-цис-эпоксикаротиноид-диоксигеназами *NCED* являются одними из ключевых ферментов биосинтеза каротиноидов, которые катализируют реакции, приводящие к образованию *all-trans*-ликопина и абсцизовой кислоты соответственно. В работе определены профили экспрессии генов *CrtISO* и *NCED1* и содержание каротиноидов в плодах на разных стадиях развития у видов и сортов томата с различной окраской спелого плода. Проведенный анализ генома томата позволил выявить три ортологичных гена каротиноид-цис-транс-изомеразы: *CRTISO*, *CRTISO-L1* и *CRTISO-L2*, белковые последовательности которых характеризовались общей организацией доменов и мотивов. Проведенный филогенетический анализ может свидетельствовать о более древнем происхождении *CrtISO-L2*, а также о сходстве функций *CrtISO* и *CrtISO-L1*. Были выявлены значительные различия в паттернах экспрессии *CRTISO* и его паралагов *CRTISO-L1* и *CRTISO-L2* в различных органах, на стадии зрелого плода и в процессе созревания у зеленоплодных и красноплодных видов, различающихся качественным и количественным составом каротиноидов.

Были впервые идентифицированы последовательности генов *SINCED1* и *SINCED2* у 12 сортов и видов томата. Проведенный структурно-филогенетический анализ показал, что гены являются безинтронными и идентичны друг другу на 74% (на белковом уровне – 71%) и содержат консервативный домен PLN02258. Полученные данные предполагают совместное участие *SINCED1* и *SINCED2* в биосинтезе АБК в процессе развития/созревания плода томата. Полученные экспрессионные данные предполагают разделение функций *NCED* между двумя ферментами: ключевая роль принадлежит гену *SINCED1*, пик активности которого приходится на этап смены окраски плода. Для гена *SINCED2* характерен более низкий уровень транскрипции и экспрессия в фотосинтезирующих тканях (листья, плоды ранних стадий развития).

Ключевые слова: каротиноиды, красноплодные и зеленоплодные виды томата, каротиноид-изомераза *CRTISO*; 9-цис-эпоксикаротиноид-диоксигеназы; *NCED*; созревание сочных плодов

Каротиноиды представляют собой группу тетраизопреноидов, которые участвуют в фотосинтезе, выработке фитогормонов и сигнальных молекул для роста, развития и защиты у растений. Наиболее важной функцией каротиноидов является защита от окислительного стресса в фотосинтезирующих тканях. В запасающих тканях каротиноиды определяют пигментацию, что важно для опыления (цветки) и распространения семян (плоды) [1–4]. Также каротиноиды влияют на онтогенез, являясь субстратами для синтеза фитогормонов, прежде всего, абсцизовой кислоты [4].

Биосинтез каротиноидов начинается с образования 15-цис-фитоина, который в несколько этапов преобразуется в полностью-транс-ликопин, являющегося субстратом для двух метаболических путей: b–b и b–e с образованием полностью-транс-a,b-каротинов и ксантофиллов. Цепочка реакций сопровождается цис-транс-изомерией системы сопряженных двойных связей. Основным ферментом преобразования цис-ликопина в транс-ликопин является каротиноид-цис-трансизомеразы *CrtISO* [5, 6]. Другим важным ферментом является 9-цис-эпоксикаротиноид-диоксигеназа (*NCED*) определяющая первый этап синтеза абсцизовой кислоты из эпоксикаротиноидов [7].

Образцы дикорастущих и культивируемых видов томата, значительно различающихся по качественному и количественному составу каротиноидов в зрелых плодах, делают их хорошей модельной системой для изучения значения каждого фермента, определяющего биосинтез каротиноидов.

Целью данной работы стало использование молекулярно-генетических и аналитических методов для характеристики ключевых генов метаболизма каротиноидов в процессе созревания плода у дикорастущих и культивируемых видов томата. Задачей данного этапа работы стало определение профилей экспрессии генов каротиноид-цис-трансизомеразы *CrtISO* и 9-цис-эпоксикаротиноид-диоксигеназы (*NCED*) и определение возможной корреляции уровней транскриптов с количеством накапливаемого ликопина, β -каротина и суммой каротиноидов у сортов и видов томата.

Каротиноид-цис-транс-изомераза *CrtISO* является одним из ключевых ферментов биосинтеза каротиноидов и катализирует реакцию цис-транс-изомеризации двойных связей, приводящих к образованию all-trans-ликопина.

Анализ референсного генома томата *S. lycopersicum* (*copm Heinz*) позволил идентифицировать три ортологичных гена каротиноид-цис-транс-изомеразы: *CRTISO*, *CRTISO-L1* и *CRTISO-L2*. Сравнительный анализ *CRTISO*, *CRTISO-L1* и *CRTISO-L2* выявил их общую доменную и мотивную структуру (из 20 идентифицированных мотивов 12 общих). Было обнаружено, что белки *CrtISO* содержат домен TIGR02730 (98-592 ак), характерный для каротин-изомераз, тогда как *CrtISO-L1* и *CrtISO-L2* – домен COG1233, специфичный для суперсемейства фитоин-дегидрогеназ. Предположительно сходная функция *CrtISO*, *CrtISO-L1* и *CrtISO-L2* в сочетании с низким сходством между ними (23–32%) может указывать их происхождение в результате давних дупликаций гена-предшественника. Проведенный филогенетический анализ может свидетельствовать о более древнем происхождении *CrtISO-L2*, а также о сходстве функций *CrtISO* и *CrtISO-L1*. Наличие всех трех гомологов у *Arabidopsis thaliana* позволяет предположить, что их возникновение предшествует расхождению высших растений на астериды и розиды.

Для уточнения функции *CrtISO*, *CrtISO-L1* и *CrtISO-L2* был определен профиль экспрессии генов в листьях и спелых плодах образцов зеленоплодного вида *S. habrochaites*, желтоплодного вида *S. cheesmaniae* и красноплодных видов *S. pimpinellifolium* и *S. lycopersicum*.

Сравнительный анализ обнаружил транскрипты трех генов в листьях и спелых плодах всех образцов видов томата. При этом наибольший уровень транскрипции *CRTISO* наблюдается в плоде на стадии смены окраски с зеленой на красную (стадия breaker, BR) и на стадии биологической спелости (стадия red ripe, RR). Транскрипция генов *CRTISO-L1* и *CRTISO-L2* наиболее активна в листе, а в плоде минимальна, причем экспрессия обоих генов значительно ниже, чем у гена *CRTISO*.

В спелых плодах томата уровень транскриптов *CrtISO-L1* и *CrtISO-L2* был крайне низок (кроме высокого уровня *CrtISO-L2* у *S. lycopersicum*) в сравнении с *CrtISO*, который наиболее высоко экспрессировался у *S. cheesmaniae* (в ~1.8, 7.5 и 45 раз выше, чем у *S. lycopersicum*, *S. pimpinellifolium* и *S. habrochaites*, соответственно). Более высокий уровень транскриптов *CrtISO* по сравнению с *CrtISO-L1* и *CrtISO-L2* подтверждает роль *CrtISO* в каротиногенезе как в листьях, так и в плодах. Значительно большее количество транскриптов *CrtISO-L1* и *CrtISO-L2* в листьях по сравнению с плодами может свидетельствовать о преимущественном участии этих генов в биосинтезе каротиноидов в фотосинтезирующей ткани.

Проведенная оценка зависимости содержания каротиноидов от уровня экспрессии генов *CrtISO*, *CrtISO-L1* и *CrtISO-L2* не выявила такой взаимосвязи в спелом плоде. Однако в листьях были обнаружены положительные корреляции с общим содержанием каротиноидов и уровнем транскриптов *CrtISO-L1/CrtISO-L2*. Такая зависимость может косвенно свидетельствовать об участии *CrtISO-L1* и *CrtISO-L2* в биосинтезе полностью-транс-z-каротина – пути, конкурентном по отношению к синтезу полностью транс-ликопина, с образованием неизвестных изопреноидов.

Проведенный молекулярно-генетический анализ гена *CrtISO* у 49 сортов *S. lycopersicum* с различной окраской зрелого плода показал, что оранжевоплодные сорта (Алтайский оранжевый, Хурма, Оранжевый гигант, Черри желто-оранжевые, Дебаро оранжевый, Органза) содержали делецию в 348 п.н (мутация tangerine 3183), в промоторе гена *CrtISO*. Полученные паттерны экспрессии *CrtISO* совпали с аллельным статусом (гомолгетрозиготностью) гена и присутствием делеции.

9-цис-эпоксикаротиноид-диоксигеназа (NCED) осуществляет первый и ключевой этап биосинтез из каротиноидов виолоксантина и неоксантина абсцизовой кислоты, являющейся основным гормоном контролирующим созревание плодов томата. В рамках данной работы были определены профили экспрессии генов 9-цис-эпоксикаротиноид-диоксигеназ *SINCED1* и *SINCED2*, а также содержание каротиноидов в плодах на разных стадиях созревания у сортов томата *S. lycopersicum*, а также проведена оценка возможной корреляции уровней транскриптов *SINCED1* и *SINCED2* с количеством накапливаемого ликопина, β -каротина и суммой каротиноидов.

Были получены последовательности генов *SINCED1* и *SINCED2* у 12 сортов и видов томата. Проведенный структурно-филогенетический анализ показал, что гены *SINCED1* и *SINCED2* являются безинтронными и идентичны друг другу на 74% (на белковом уровне – 71%). Белки *SINCED1* и *SINCED2* содержат консервативный домен PLN02258.

Для анализа экспрессии генов *SINCED1* и *SINCED2* при созревании плодов были взяты ткани плода на 4 стадиях развития/созревания (IG, MG, BR и FR) трех сортов, отличающихся содержанием каротиноидов и цветом зрелого плода (Heinz, Корнеевский и Копилка желтая). Показано, что пик экспрессии гена *SINCED1* соответствовал стадии BR, связанной со сменой зеленой окраски плода на желтую (Копилка желтая) или красную (Heinz, Корнеевский), после чего на стадии зрелого плода экспрессия гена резко падала. В случае *SINCED2* наиболее высокий уровень транскриптов обнаружен в плодах стадии незрелого плода IG.

Проведена оценка зависимости содержания каротиноидов от уровня экспрессии генов *SINCED1* и *SINCED2*. Полученные данные биохимического HPLC анализа подтвердили зависимость окраски плода от содержания и состава пигментов. Так, красная и малиново-красная окраска плодов сортов Heinz и Корнеевский соответствует большому количеству ликопина в спелом плоде, а желтая окраска плодов сорта Копилка желтая объясняется отсутствием ликопина и присутствием высокой концентрации β -каротина. Согласно полученным данным для красноплодных сортов Heinz и Корнеевский обнаружена статистически значимая взаимосвязь уровня транскриптов *SINCED1* и содержания β -каротина; в случае *SINCED2* корреляция менее выражена, однако тоже статистически возможна. Для желтоплодного сорта Копилка желтая такие связи отсутствуют. Интересно, что обнаруженные корреляции являются обратными: чем выше уровень транскриптов гена, тем ниже содержание β -каротина. Обнаруженная зависимость уровня транскриптов *SINCED1* и *SINCED2* от содержания β -каротина предполагает, что количество каротиноидов-предшественников АБК может выполнять роль индуктора генов *NCED*. Данные HPLC анализа показали, что спелые плоды сортов Heinz и Копилка желтая не содержат непосредственных предшественников АБК – виолоксантина и неоксантина. При этом их высокое содержание на начальных стадиях развития/созревания плода согласуется со снижением уровня транскриптов *SINCED1* и *SINCED2*, а также с ролью АБК как индуктора созревания, которая на более поздних стадиях переходит к этилену.

Таким образом, полученные данные предполагают совместное участие *SINCED1* и *SINCED2* в биосинтезе АБК в процессе развития/созревания плода томата. При этом ключевая роль принадлежит гену *SINCED1*, пик активности которого приходится на этап смены окраски плода. В то же время более низкие уровни транскриптов *SINCED2* и пик активности данного гена на более ранних стадиях развития плода предполагает разделение функций *NCED* между двумя ферментами. Обнаруженная взаимосвязь уровня транскриптов *SINCED1* и *SINCED2* с содержанием β -каротина может свидетельствовать о роли предшественников АБК как индукторов экспрессии генов *NCED*.

Основные выводы. Проведенный филогенетический анализ может свидетельствовать о более древнем происхождении *CrtISO-L2*, а также о сходстве функций *CrtISO* и *CrtISO-L1* и что их возникновение предшествует расхождению высших растений на астериды и розиды.

Ген *CrtISO* играет определяющую роль в биосинтезе каротиноидов как в плодах, так и в листьях. Гены *CrtISO-L1* и *CrtISO-L2* могут определять сдвиг биосинтеза каротиноидов в сторону полно-

стью-транс-*z*-каротина и терпеноидов, являющихся промежуточными продуктами в биосинтезе различных жировых соединений

Полученные данные предполагают совместное участие *SINCE1* и *SINCE2* в биосинтезе АБК в процессе развития/созревания плода томата. При этом ключевая роль принадлежит гену *SINCE1*, пик активности которого приходится на этап смены окраски плода.

Обнаруженная взаимосвязь уровня транскриптов *SINCE1* и *SINCE2* с содержанием β-каротина может свидетельствовать о роли предшественников АБК как индукторов экспрессии генов *NCED*.

ЛИТЕРАТУРА

1. Plant Secondary Metabolites and Their General Function in Plants / A. Böttger, U. Vothknecht, C. Bolle, A. Wolf. – 2018. – P. 3-17.
2. Phenolics and carotenoids contents and radical scavenging capacity of some selected solanaceous medicinal plants / R. Islam, M. N. Uddin, M. Ashrafuzzaman, M. I. U. Hoque // Journal of the Bangladesh Agricultural University. – 2018. – Vol. 16. – № 1.
3. 234. Tholl D. Biosynthesis and biological functions of terpenoids in plants / D. Tholl // Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology. – 2015. – Vol. 148. – P. 63-106.
4. Christianson D. W. Structural and Chemical Biology of Terpenoid Cyclases. Vol. 117 / D. W. Christianson. – 2017.
5. Biosynthesis of isoprenoids via the non-mevalonate pathway / W. Eisenreich, A. Bacher, D. Arigoni, F. Rohdich. – 2004.
6. Rodríguez-Concepción M. Supply of precursors for carotenoid biosynthesis in plants / M. Rodríguez-Concepción. – 2010.
7. Carotenoid metabolism in plants / N. Nisar, L. Li, S. Lu [и др.] // Molecular Plant. – 2015. – Vol. 8. – № 1. – P. 68-82.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ РАБОТЫ

Статьи

1. Ефремов Г.И., Ашихмин А.А., Кочиева Е.З., Щенникова А.В. Сравнительная характеристика генов 9-цис-эпоксикаротиноид-диоксигеназ *SLNCED1* и *SLNCED2* в процессе развития и созревания плода томата // Физиология Растений. – 2023. – Т. 70. – № 3. – С. 352-362.
2. Ефремов Г.И., Джос Е.А., Ашихмин А.А., Кочиева Е.З., Щенникова А.В. Влияние содержания каротиноидов и активности гена каротиноид-цис-транс-изомеразы *CRTISO* на окраску плода // Физиология Растений. – 2022. – Т. 69. – № 4. – С. 352-362.
3. Филюшин М. А., Дьяченко Е. А., Ефремов Г. И., Кочиева Е. З., Щенникова А. В. Вариативность и экспрессия паралогов фитоенсинтазы (*PSY*) у видов перца клады *annuum* // Генетика. – 2021. – Т. 57. – № 3. – С. 280-296 (Q4).
4. Slugina, M.A., Efremov, G.I.; Shchennikova, A.V.; Kochieva, E.Z. Characterization of RIN Isoforms and Their Expression in Tomato Fruit Ripening // Cells. – 2021. – Vol. 10 (7). doi: 10.3390/cells10071739.
5. Efremov, G.I.; Slugina, M.A.; Shchennikova, A.V.; Kochieva, E.Z. Characterization of 15-cis-zeta-Carotene Isomerase Z-ISO in Cultivated and Wild Tomato Species Differing in Ripe Fruit Pigmentation // Plants. – 2021. – Vol. 9 (11). doi: 10.3390/plants10112365.
6. Efremov, G.I.; Slugina, M.A.; Shchennikova, A.V.; Kochieva, E.Z. Differential Regulation of Phytoene Synthase *PSY1* During Fruit Carotenogenesis in Cultivated and Wild Tomato Species (*Solanum section Lycopersicon*) // Plants. – 2020. – Vol. 9 (9). doi: 1169.10.3390/plants9091169.
7. Дьяченко Е.А., Филюшин М.А., Ефремов Г.И., Щенникова А.В., Кочиева Е.З. Структурно-функциональные особенности изоформ фитоинсинтазы *PSY1* и *PSY2* у сортов перца *Capsicum annuum* L. // ВОГиС. – 2020. – Т. 24. – № 7. – С. 687-696. doi: 10.18699/VJ20.663.
8. Щенникова А.В., Дьяченко Е.А., Ефремов Г.И., Филюшин М.А., Кочиева Е.З. Вариативность и филогения паралогов фитоинсинтазы *PSY1* и *PSY2* перца у различных видовых комплексов рода *Capsicum* // ДАН. – 2020. – Т. 495. – № 1. – С. 590-597

Тезисы

1. Ефремов Г.И., Слугина М.А. Изменение окраски спелых плодов у видов томата (*Solanum* секция *Lycopersicon*) как результат эволюции регуляторных последовательностей генов каротиноидного пути // Материалы V (XIII) Международной ботанической конференции молодых учёных (Санкт-Петербург, 25–29 апреля 2022 г.) / Спб.: БИН РРАН. – 2022. – С. 107.
2. Efremov G.I., Shchennikova A.V., Kochieva E.Z. Z-ISO: a catching up step towards formation of colored carotenoids in tomatoes // Abstracts of The 6th International Scientific Conference «Plant Genetics, Genomics, Bioinformatics, and Biotechnology (PlantGen 2021)» (June 14-18 2021). Novosibirsk; ICG SB RAS, 2021. – P. 61.
3. Ефремов Г.И., Тукусер Я. П., Слугина М.А. Аллельный полиморфизм гена фитоинсинтазы SPSY1 и биохимический анализ содержания ликопина и бета-каротина у современных сортов томата овощного (*Solanum lycopersicum*) // Материалы 20–ой Всероссийской конференции молодых ученых «Биотехнология в растениеводстве, животноводстве и сельскохозяйственной микробиологии» (Москва, 16–17 июня 2020 г.) / М.: ФГБНУ ВНИИСБ – 2020. – С. 101-102.
4. М.А. Слугина, Г.И. Ефремов, А.В. Щенникова, Е.А. Джос, Е.З. Кочиева Плоды томата: от эволюции промоторов к эволюции окраски // Сборник тезисов международной конференции «125 лет прикладной ботаники в России» (Санкт-Петербург, 25 – 28 ноября 2019 г.). Спб: ФИЦ ВИГРР им. Н.И. Вавилова. – С. 187.

Efremov Gleb Ilich

RESEARCH CENTER OF BIOTECHNOLOGY RAS ANALYSIS OF STRUCTURAL GENES OF CAROTENOID METABOLISM IN CULTIVARS AND WILD SPECIES OF TOMATO SPECIES

Abstract. Tomato *Solanum lycopersicum* L. is an important agricultural crop and, at the same time, a model for studying the ontogenesis of a fleshy fruit. Carotenoid cis-trans isomerase CRTISO and 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenases NCED are the key enzymes in carotenoid biosynthesis that catalyze reactions leading to the formation of all-trans-lycopene and abscisic acid, respectively. In the work the expression profiles of the CrtISO and SINCE1 genes and the carotenoid content in fruits at different stages of development in tomato species and varieties with different ripe fruit color. The analysis of the tomato genome revealed three orthologous carotenoid-cis-trans isomerase genes: CRTISO, CRTISO-L1, and CRTISO-L2, the protein sequences of which were characterized by a common organization of domains and motifs. The performed phylogenetic analysis may indicate a more ancient origin of CrtISO-L2, as well as the similarity of the functions of CrtISO and CrtISO-L1. Significant differences were found in the patterns of expression of CRTISO and its paralogs CRTISO-L1 and CRTISO-L2 in various organs, at the MG stage and during maturation in green and red-fruited species, differing in the qualitative and quantitative composition of carotenoids.

The SINCE1 and SINCE2 gene sequences were identified for the first time in 12 varieties and species of tomato. The structural and phylogenetic analysis showed that the genes are intronless and identical to each other by 74% (at the protein level, 71%) and contain the conserved PLN02258 domain. The data obtained suggest the both participation of SINCE1 and SINCE2 in ABA biosynthesis during the development/ripening of the tomato fruit. The obtained expression data suggest the differential functions between two enzymes: the key role belongs to the SINCE1 gene, whose activity peaks at the stage of fetal color change. The SINCE2 gene is characterized by a lower level of transcription and expression in photosynthetic tissues (leaves, fruits of early stages of development).

Keywords: carotenoids, red and green-fruited tomato species, carotenoid isomerase CRTISO; 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenases; NCED; fleshy fruit ripening.

Кулакова Мария Викторовна

аспирант ФИЦ Биотехнологии РАН 4 года обучения

профиль 1.5.4 Биохимия

e-mail: kulakova_masha95@mail.ru

Научный руководитель

Агафонов Михаил Олегович

доктор биологических наук,

руководитель группы геномного редактирования

промышленных микроорганизмов



ДОДЕЦИЛ СУЛЬФАТ НАТРИЯ ВЫЗЫВАЕТ РЕЗКОЕ УВЕЛИЧЕНИЕ КОНЦЕНТРАЦИИ КАЛЬЦИЯ В ЦИТОЗОЛЕ ЖИВЫХ КЛЕТОК ДРОЖЖЕЙ *OGATAEA PARAPOLYMORPHA*

Аннотация. Чувствительность клеток дрожжей рода *Ogataea* с инактивированной вакуолярной Ca^{2+} -АТФазой *Pmc1* супрессируется нарушением высокоаффинного Ca^{2+} -канала *Cch1*. С помощью генетически кодируемого индикатора кальция GEM-GECO мы обнаружили, что при добавлении SDS в среду в течение нескольких минут происходит сильное увеличение цитозольной концентрации кальция ($[\text{Ca}^{2+}]_{\text{цит}}$), за которым в норме следует постепенное снижение. Однако в клетках с нарушением *Pmc1* $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{цит}}$ не снижается в течение длительного времени. Если в дополнение к этой мутации нарушить ген *CCH1*, частично восстанавливается способность клеток справляться с повышением $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{цит}}$. Этот эффект может являться причиной супрессии чувствительности к SDS у клеток с нарушением Ca^{2+} -канала *Cch1*.

Ключевые слова: *Ogataea parapolymorpha*, вакуолярная Ca^{2+} -АТФаза, высокоаффинный Ca^{2+} -канал *Cch1*, GEM-GECO, SDS, гомеостаз кальция

Как и другие эукариоты, дрожжи используют Ca^{2+} в качестве вторичного мессенджера, позволяющего клеткам реагировать на различные внешние раздражители. Поэтому клетке необходимо поддерживать $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{цит}}$ на низком уровне, перекачивая эти катионы из цитозоля во внутриклеточные депо. У дрожжей это достигается в основном за счет работы вакуолярных переносчиков кальция, включая АТФазу *Pmc1*, а из внешней среды эти катионы в клетку попадают при участии кальциевых каналов *Cch1* и *Mid1* [3].

Ранее сотрудниками группы геномного редактирования промышленных микроорганизмов и лаборатории молекулярной генетики было обнаружено, что нарушение вакуолярной АТФазы *Pmc1* у дрожжей рода *Ogataea* приводит к увеличению чувствительности к присутствию в среде додецилсульфата натрия (SDS) [1]. Было показано, что данный фенотип супрессируется инактивацией гена *CCH1*, кодирующий высокоаффинный кальциевый канал плазмалеммы. Было выдвинуто предположение, что гиперчувствительность к SDS при нарушении *Pmc1* связана с повышением $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{цит}}$, а инактивация *CCH1* снижает ее. Однако прямого подтверждения того, что нарушения генов *Pmc1* и *CCH1* влияют на концентрацию кальция в цитозоле, получено не было. Для решения этой задачи был выбран метод отслеживания $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{цит}}$ с помощью генетически кодируемых индикаторов (GECI). В частности, к таким индикаторам относятся циркулярно пермутированные флуоресцентные белки, на С-конце которых находится кальмодулин (CaM), а на N-конце – Ca^{2+} /CaM-связывающий домен. Связывание с кальцием приводит к изменению конформации белка и изменению его флуоресцентных свойств. Как правило, это изменение интенсивности флуоресценции на одной длине волны, однако были разработаны и радиометрические сенсоры, у которых изменяется длина волны возбуждения или эмиссии. К таким сенсорам относится GEM-GECO. Максимум возбуждения его флуоресценции почти не

зависит от связывания кальция и находится в области 390-400 нм. Максимум эмиссии свободной от кальция формы находится на 513 нм, а кальций-связанной формы - около 450 нм [2].

Ранее нами было проведено исследование по изучению влияния продукции белка GEM-GECO на физиологию клеток дрожжей *O. parapolymorpha* [4]. Хотя продукция GEM-GECO в некоторых случаях влияла на рост клеток, она не вызывала их гибели. Это позволило нам провести эксперименты с его применением для отслеживания изменений $[Ca^{2+}]_{цит}$ в ответ на внешние стимулы. Для измерения флуоресценции GEM-GECO в индивидуальных клетках был использован метод проточной цитометрии. Перед измерениями ночные культуры, выращенные в жидкой питательной среде с сахарозой, разводили свежей средой в 50 раз и растили в течение 5 часов для получения логарифмической культуры. Для отслеживания динамики изменения $[Ca^{2+}]_{цит}$ в ответ на присутствие SDS, полученные логарифмические культуры разводили в 25 раз средой, содержащей сахарозу и 0,01% SDS (Минимальная ингибирующая концентрация для дрожжей *O. parapolymorpha*). Для получения нулевой точки измеряли флуоресценцию GEM-GECO в той же культуре, но без добавления SDS. В качестве характеристики $[Ca^{2+}]_{цит}$ использовали соотношение значений интенсивностей флуоресценции при длине волны 450 нм и 525 нм. Значения флуоресценции GEM-GECO определяли с учетом автофлуоресценции клеток.

Добавление SDS в культуральную среду вызывало резкий скачок $[Ca^{2+}]_{цит}$ в клетках дикого типа, после которого уровень цитозольного кальция постепенно снижался (Рис. 1). Похожая динамика изменения $[Ca^{2+}]_{цит}$ в ответ на присутствие SDS в среде наблюдалась у клеток с нарушением гена *CCH1*, однако уровень внутриклеточного кальция был ниже, чем у клеток дикого типа. В клетках мутантов *pmc1-Δ* и *pmc1-Δ cch1-Δ* такого резкого скачка $[Ca^{2+}]_{цит}$ в ответ на добавление SDS в культуральную среду не было обнаружено. В клетках с нарушением АТФазы Pmc1 $[Ca^{2+}]_{цит}$ со временем увеличивалась, в то время как в клетках двойного мутанта *pmc1-Δ cch1-Δ* уровень цитозольного кальция через 10 минут инкубации в среде с SDS начал снижаться. Очевидно, что нарушение канала Cch1 ослабляет негативный эффект делеции гена *PMC1*. Это может объяснять супрессию чувствительности клеток к SDS, вызванную делецией гена *CCH1*.

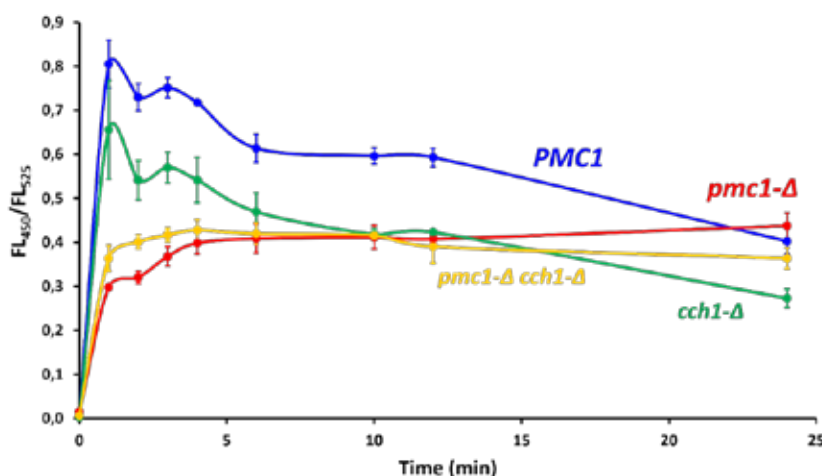


Рис. 1. Динамика изменения медианных значений соотношения флуоресценции GEM-GECO при длине волны 450 и 525 нм (FL_{450}/FL_{525}) в популяции клеток *O. parapolymorpha* дикого типа, *pmc1-Δ*, *cch1-Δ* и *pmc1-Δ cch1-Δ* при добавлении в культуральную среду 0,01% SDS

Важно было убедиться в том, что клетки при инкубации в среде с 0,01% SDS во время измерения флуоресценции GEM-GECO не погибают. Для этого логарифмические культуры клеток дрожжей *O. parapolymorpha* инкубировали в жидкой среде с добавлением 0,01% SDS в течение 30 минут, затем высевали суспензии клеток на чашки Петри с агаризованной питательной средой YPD (0,3% Yeast extract, 1% Peptone, 1% Dextrose). В качестве контроля использовали суспензию клеток, инкубированную в той же среде, но без добавления SDS. Культуры на чашках выращивали при температуре 37°C в течение 2 суток, после чего определяли количество колоний клеток. Выживаемость клеток дрожжей после инкубации в среде с SDS в течение 30 минут оказалась практически 100%. Это доказывает, что интенсивный вход кальция в клетку при воздействии на нее 0,01% SDS не связан с ее гибелью.

Кроме того, мы определили, способны ли концентрации SDS ниже минимальной ингибирующей индуцировать вход кальция в цитозоль. Для этого клетки дикого типа, продуцирующие

GEM-GECO, инкубировали в культуральной среде, содержащей SDS в концентрациях 0,002, 0,004 и 0,006%. С помощью проточной цитометрии мы обнаружили, что такое снижение концентрации SDS принципиально не меняет динамику изменения $[Ca^{2+}]_{\text{цит}}$, однако снижается амплитуда ответа.

Основные выводы. Присутствие в среде SDS вызывает резкое увеличение $[Ca^{2+}]_{\text{цит}}$ в клетках дрожжей *O. parapolymorpha* за счет поступления Ca^{2+} в клетки из внешней среды. Показано, что такой эффект не связан с гибелью клеток. Инактивация высокоаффинного Ca^{2+} -канала Cch1 в некоторой степени восстанавливает способность мутанта с нарушением вакуолярной АТФазы Pmc1 противостоять повышению $[Ca^{2+}]_{\text{цит}}$, индуцированному SDS.

ЛИТЕРАТУРА

1. Fokina A., Sokolov S., Hyun Ah Kang, Ter-Avanesyan M., Agaphonov M. Inactivation of Pmc1 vacuolar Ca^{2+} ATPase causes G_2 cell cycle delay in *Hansenula polymorpha* // Cell Cycle. – 2012. – Vol. 11 (4). – P. 778 – 784.
2. Koldenkova V., Nagai T. Genetically encoded Ca^{2+} indicators: Properties and evaluation // Biochimica et Biophysica Acta. – 2013. – Vol. 1833 (7). – P. 1787–1797.
3. Lange M., Peiter E. Calcium Transport Proteins in Fungi: The Phylogenetic Diversity of Their Relevance for Growth, Virulence, and Stress Resistance // Frontiers in Microbiology. – 2020. – Vol. 10. – P. 1-14.
4. Кулакова М.В. Физиологические проявления продукции генетически кодируемого индикатора кальция GEM-GECO в клетках дрожжей *Ogataea parapolymorpha* // Сборник тезисов ежегодной отчетной конференции аспирантов «ФИЦ Биотехнологии РАН». – 2022. – С. 80-84.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ РАБОТЫ

Kulakova, M.V.; Karginov, A.V.; Alexandrov, A.I.; Agaphonov, M.O. The GEM-GECO Calcium Indicator Is Useable in *Ogataea parapolymorpha* Yeast, but Aggravates Effects of Increased Cytosolic Calcium Levels // International Journal of Molecular Sciences. – 2022. – Vol. 23 (17). – 10004.

ОСНОВНЫЕ ДОСТИЖЕНИЯ

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

Kulakova Mariya Viktorovna

RESEARCH CENTER OF BIOTECHNOLOGY RAS SODIUM DODECYL SULPHATE CAUSES A DRAFT INCREASE IN CALCIUM CONCENTRATION IN THE CYTOSOL OF LIVING *OGATAEA PARAPOLYMORPHA* YEAST CELLS

Abstract. The sensitivity of *Ogataea* genus yeast cells with inactivated vacuolar Ca^{2+} -ATPase Pmc1 is suppressed by disruption of the high-affinity Ca^{2+} channel Cch1. Using the genetically encoded calcium indicator GEM-GECO, we have found that adding SDS to the medium causes a $[Ca^{2+}]_{\text{cyt}}$ strong increase in a few minutes, which is followed usually by its gradual decrease. However, in cells with impaired Pmc1 $[Ca^{2+}]_{\text{cyt}}$ does not decrease for a long time. If, in addition to this mutation, the CCH1 gene is disturbed, the ability of cells to cope with an increase in $[Ca^{2+}]_{\text{cyt}}$ is restored to some extent. This effect may be the reason for the suppression of sensitivity to SDS in cells with impaired Ca^{2+} channel Cch1.

Keywords: *Ogataea parapolymorpha*, vacuolar Ca^{2+} -ATPase, high-affinity Ca^{2+} channel Cch1, GEM-GECO, SDS, calcium homeostasis.

Работа выполнена при поддержке РФФИ (грант № 20-04-00330).

Марынич Надежда Константиновна

аспирант ФИЦ Биотехнологии РАН 4 года обучения

профиль 1.5.4 Биохимия

e-mail: marynich.nadya@gmail.com

Научный руководитель

Савицкий Александр Павлович

доктор химических наук, профессор,

г.н.с., зав. лабораторией физической биохимии



ПОЛУЧЕНИЕ FRET-СЕНСОРА MOXSAASOTI-ХРОМОПРОТЕИН И ЕГО ПРИМЕНЕНИЕ В СОВРЕМЕННЫХ МЕТОДАХ МИКРОСКОПИИ

Аннотация. Для исследования внутриклеточных процессов необходимо создание FRET пары, работающей в широком диапазоне клеточных компартментов (pH, окислительные условия). В настоящей работе проводился подбор и оптимизация доноров и акцепторов для создания мономерного FRET сенсора. В качестве донора выбран мономерный белок SAASoti для контроля концентрации сенсора за счет свойства фотоконверсии. Получен его бесцистеиновый вариант для работы в окислительных условиях клетки, введены замены для оптимизации фотоконверсии и созревания. При подборе акцептора были изучены флуоресцентные свойства 4 хромопротеинов в широком диапазоне pH. Для предыдущего акцептора KFP выявлено появление флуоресценции в присутствии ацетат ионов при низких значениях pH. В качестве акцептора из выбран мономерный хромопротеин Ultramarine.

Ключевые слова: бифотохромные флуоресцентных белки, хромопротеины, FRET-сенсоры, флуоресценция, апоптоз, каспаза 3

После открытия GFP и его применения как генетически-кодируемой метки, началось активное исследование его свойств, а также поиск других GFP-подобных флуоресцентных белков [1,2]. Развитие генной-инженерии позволило создать разнообразный спектр меток для применения в конкретных методах, однако направленная модификация свойств флуоресцентных белков всё еще не является тривиальным подходом. Явление флуоресцентного резонансного переноса энергии (FRET) между флуоресцентными белками нашло широкое применение для исследования процессов комплексообразования, фолдинга белков, а также протеазной активности [3–7]. Создание эффективного, мономерного сенсора для эффективной работы в клетках млекопитающих является важной задачей. Обнаружение протеолиза является одним из самых важных применений FRET-сенсоров, поскольку роль различных ферментов в молекулярной онкологии при прогрессировании опухоли находится в стадии тщательного изучения. Метод флуоресцентной корреляционной спектроскопии (ФКС) позволяет определить изменения в олигомерном состоянии белков, и, например, расщепление FRET сенсора за счет изменения скорости диффузии при флуктуации флуоресцентной молекулы в фокальном объеме. Этот метод обнаруживает только флуоресцентные молекулы, поэтому его можно использовать в сложных системах и в клетках. Однако при фокальном объеме 1 фемтолитр, для измерения этим методом требуется концентрация флуоресцирующей метки порядка 10^{-9} М. Для контроля концентрации флуоресцентных молекул удобно использовать фотоконвертируемые зелёно-красные флуоресцентные белки. Такой подход был продемонстрирован для FRET-сенсора SAASoti-23-KFP[8]. Однако способность к возгоранию флуоресценции и

тетрамерность KFP ограничивают применение этого белка слияния в методе ФКС, что накладывает определенные требования как к прибору, так и к планированию эксперимента.

Для нивелирования влияния аминокислотных остатков цистеина на фолдинг и олигомеризацию флуоресцентного белка был получен мономерный вариант *moxSAASoti* с заменами всех пяти а. о. цистеина, характеризующийся повышенной скоростью фотоконверсии, но сниженной фотохимической фотостабильностью красной формы. Поэтому для эффективного применения *moxSAASoti* во FRET-сенсоре необходима оптимизация свойств фотоконверсии и красной формы, а также улучшение созревания в клетках млекопитающих.

На основе результатов, полученных в работе [9] в белке *moxSAASoti* были введены соответствующие замены T23E и F97M. Новые варианты были экспрессированы, выделены и очищены. При анализе кинетики фотоконверсии на очищенных препаратах белков видно, что более интенсивная и стабильная флуоресценция красной формы образуется для варианта с заменой F97M. (Рис. 1).

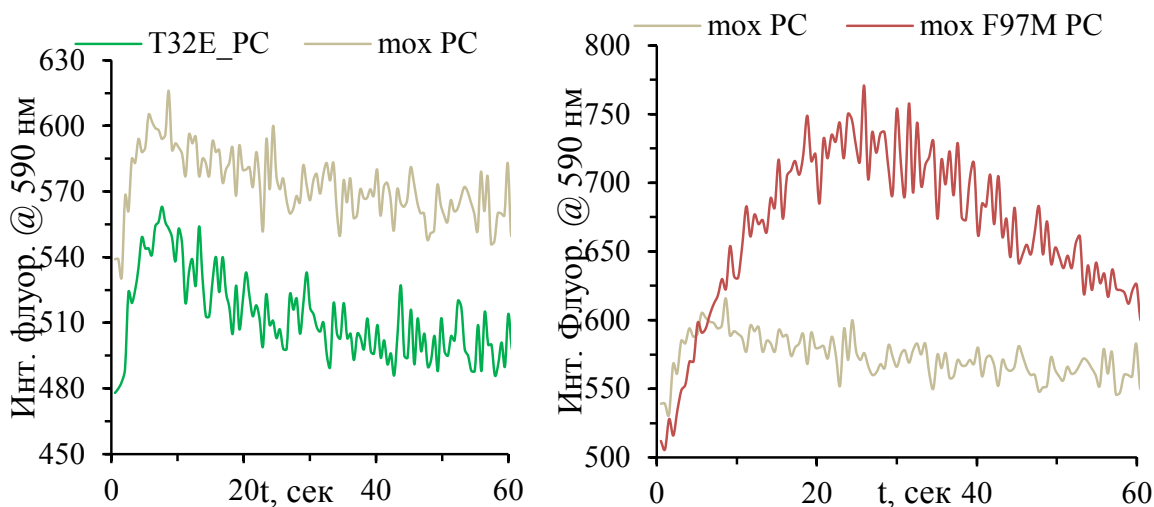


Рис. 1. Кинетики фотоконверсии *moxSAASoti* и его вариантов с заменами T32E и F97M. Регистрация велась на длине волны 590 нм. Облучение проводилось одновременно светом 400 нм для фотоконверсии и 560 нм для возбуждения флуоресценции красной формы. Буфер 250 mM Tris-HCl, pH 7,4

Дальнейшая характеристика проводилась для варианта F97M *moxSAASoti* как для более перспективного варианта. Были охарактеризованы его спектральные характеристики. Для F97M *moxSAASoti* характерны снижение коэффициента экстинкции зелёной формы и возрастание квантового выхода на 0,1, а также возрастание коэффициента экстинкции красной формы почти в два раза и квантового выхода в 4 раза.

Также показано, что новая форма имеет высокую фотостабильность красной формы. При облучении возбуждающим светом интенсивность флуоресценции не снижается в течение 5 минут. Был проведен сайт-насыщающий мутагенез по 97 положению. Отобраны два клона с заменами F97V и F97L. Новые варианты *moxSAASoti* были выделены и охарактеризованы. Для варианта F97L характерна одна из самых быстрых скоростей образования красной формы (быстрее только для исходного *moxSAASoti*), а также визуальное более высокая интенсивность флуоресценции красной формы, а для варианта F97V наименьшая скорость фотодеструкции.

Для оптимизации созревания *moxSAASoti* при 37°C на основании работы [10] и аминокислотном выравнивании были индивидуально введены замены I15K и H74K, G78N. Для анализа созревания, ДНК новых форм были трансформированы в *E.coli* BL21(DE3) и высеяны на агаризованную среду с индуктором транскрипции ИПТГ. После инкубации при 37°C в течение ночи, анализ интенсивности флуоресценции на 520 нм показал, что флуоресценция возросла только для варианта с заменой H74K (Рис. 2).

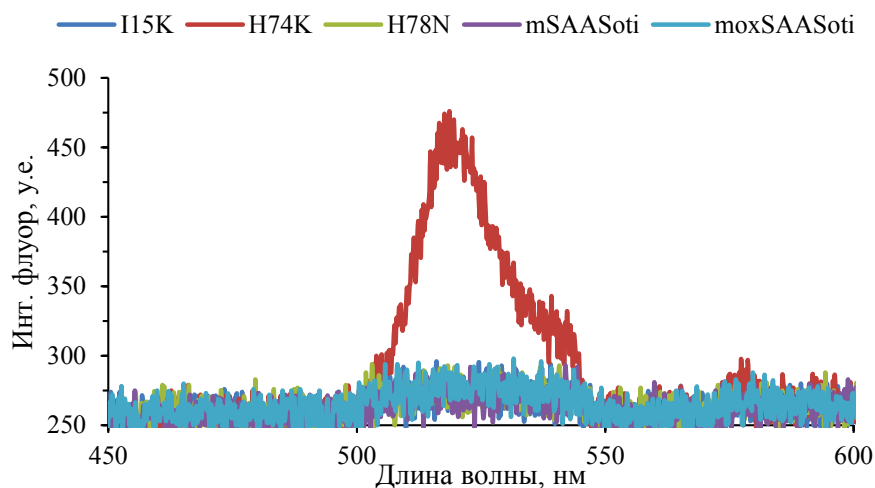


Рис. 2. Спектры флуоресценции колоний вариантов SAASoti. Спектры регистрировались при возбуждении светом 470 нм

Введенные замены не оказали влияния на фотопревращения moxSAASoti. Наиболее перспективным вариантом был выбран moxSAASoti H74K. Был проведен сайт-насыщающий мутагенез по положению 74. На одной из чашек получено 62 колонии, которые были пересеяны на среду с ИПТГ и инкубировались в течение ночи при 37°C. Измерялась интенсивность флуоресценции на длине волны 520 нм при возбуждении на 470 нм. (Рис. 3)



Рис. 3. Интенсивности флуоресценции на 520 нм колоний, содержащих клоны moxSAASoti со случайной заменой в 74 положении

Наиболее высокая интенсивность флуоресценции характерны для клона 12, более чем в 2 раза превышающая интенсивность для варианта H74K. Показано, что этот клон содержит замену H74A. Возможно, это связано с улучшением фолдинга нового варианта. Также для нового варианта выше глубина фотопереключения и глубина фотоконверсии. Положение 74 играет важную роль в параметрах созревания moxSAASoti, возможно, участвуя в электростатических взаимодействиях при фолдинге.

Также была обнаружена «счастливая» замена, приведшая также к улучшению созревания белка mEos2 – H121Y. Было решено проверить является ли это положение «горячей точкой» и у moxSAASoti. Для варианта moxSAASoti H125Y характерно двадцатикратное возрастание интенсивности флуоресценции клеток по сравнению с предыдущими вариантами.

В результате объединения всех замен путем одновременного сайт-насыщающего мутагенеза по положениям 74, 97 и 125 был получен вариант moxSAASoti H74K/F97M. Для него характерно небольшое снижение яркости красной формы, однако повышение ее фотостабильности.

При подборе акцептора для FRET пары, было обнаружено, что для белка KFP в присутствии ионов ацетата многократно увеличивается интенсивность флуоресценции при значениях pH 4 и 4,5. При этом возникает максимум возбуждения на 455 нм и при возбуждении флуоресценции на этой длине волны возникает два максимума в спектре эмиссии – на 530 и 590 нм. Основное предположение таково: протекают два параллельных процесса, происходящих в возбужденном состоянии хромофора при взаимодействии с ацетатом. При этом образуется *транс*-катионная форма и *цис*-анионная формы хромофора, которые флуоресцируют на 530 и 590 нм, соответственно. Потенциально, это свойство может быть применено в сенсорах для детекции ацетата.

Поэтому получены четыре не флуоресцирующих хромопротеина Ultramarine, gfasCP, anm2CP, spisCP, имеющие высокие значения интегралов перекрывания и ферстеровских радиусов с красным флуоресцентным белком TagRFP. Методами гель-фильтрации и ДСР показано, что Ultramarine является мономерным, gfasCP и spisCP димерными, а anm2CP димерным с примесью более крупных агрегатов. На основе белков TagRFP и Ultramarine создан FRET мономерный сенсор TagRFP-23Ultramarine, содержащий в линкере сайт узнавания каспазы-3. Новый сенсор является субстратом каспазы-3. После инкубации интенсивность флуоресценции TagRFP возросла более чем в 2 раза, а соотношение времен жизни флуоресценции свободного и связанного TagRFP изменилось в 5,8 раз в сторону свободного TagRFP. Возрастание этих двух показателей говорит о нарушении FRET между TagRFP и Ultramarine, то есть эффективным расщеплением сенсора каспазой-3.

Основные выводы. Впервые был получен бесцистеиновый вариант moxSAASoti с заменами всех пяти аминокислотных остатков цистеина. Он характеризуется возросшей скоростью фотоконверсии, но низкой фотохимической стабильностью красной формы. Для оптимизации этого свойства была успешно подобрана замена F97M, при введении которой значительно возросла молекулярная яркость и фотостабильность moxSAASoti. Также показано, что случайная замена в этом положении оказывает влияние не только на свойства фотоконверсии, но и на свойства фотопереключения moxSAASoti. Замена в 74 положении (лизин или аланин) улучшает созревание moxSAASoti при 37°C. Объединение замен в этих положениях привело к получению варианта moxSAASoti F97M/H74K с яркой и фотостабильной красной формой и улучшенным созреванием при 37°C.

Также показано, что присутствие ацетат ионов приводит к многократному возрастанию флуоресценции для белка KFP.

Из четырех хромопротеинов: Ultramarine, gfasCP, anm2CP, spisCP, был выбран в качестве акцептора для FRET-пары Ultramarine, имеющий высокие значения интеграла перекрывания и ферстеровского радиуса с красным флуоресцентным белком TagRFP, а также полностью мономерным, что подтверждено методами гель-фильтрации и ДСР. Новый сенсор TagRFP-23-Ultramarine, содержащий в линкере сайт узнавания каспазы-3 показал себя эффективным субстратом каспазы-3.

ЛИТЕРАТУРА

1. Shimomura O., Johnson F., Saiga Y. Extraction, purification and properties of Aequorin, a Bioluminescent Protein from the Luminous Hydromedusan, Aequoria // Luminescence of Aequorin. – 1962. – Vol. 1353 (165). – P. 223–239.
2. Tsien R.Y. The Green Fluorescent Protein // Annual Review Biochemistry. – 1998. – Vol. 67. – P. 509–544.
3. Piston D.W., Kremers G.J. Fluorescent protein FRET: the good, the bad and the ugly // Trends in Biochemical Sciences. – 2007. – Vol. 32(9). P. 407–414.
4. Rusanov A.L. et al. Lifetime imaging of FRET between red fluorescent proteins.
5. Rajoria S. et al. FLIM-FRET for Cancer Applications // Curr Mol Imaging. Bentham Science Publishers Ltd. – 2014. – Vol. 3 (2). – P. 144–161.

6. Goryashchenko A.S., Khrenova M.G., Savitsky A.P. Detection of protease activity by fluorescent protein FRET sensors: from computer simulation to live cells. – 2017.
7. Savitsky A.P. et al. FLIM-FRET imaging of caspase-3 activity in live cells using pair of red fluorescent proteins // *Theranostics*. – 2012. – Vol. 2 (2). – P. 215–226.
8. Solovyev I.D., Maloshenok L.G., Savitsky A.P. Application of Genetically Encoded Photoconvertible Protein SAASoti for the Study of Enzyme Activity in a Single Live Cell by Fluorescence Correlation Microscopy // *Materials*. MDPI. – 2022. – Vol. 15(14).
9. Fu Z. et al. mEosEM withstands osmium staining and Epon embedding for super-resolution CLEM // *Nat Methods*. Springer US. – 2020. – Vol. 17 (1). – P. 55–58.
10. McKinney S.A. et al. A bright and photostable photoconvertible fluorescent protein // *Nat Methods*. – 2009. – Vol. 6 (2). – P. 131–133.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ РАБОТЫ

Статьи

1. Marynich N. K., Khrenova M. G., Gavshina A.V., Solovyev I. D., Savitsky A.P. First biphotochromic fluorescent protein moxSAASoti stabilized for oxidizing environment // *Scientific Reports*. – 2022. – Vol. 12(1). – P. 7862. doi: 10.1038/s41598-022-11249-x.
2. Марынич Н.К., Грановский И.Э., Савицкий А.П. Новые FRET-пары флуоресцентных белков для определения активности каспаз in vitro // *Прикладная биохимия и микробиология*. – 2022. – Т. 58 (6). – С. 592-597.
3. Marynich N.K., Granovsky I. E., Savitsky A.P. New FRET Pairs of Fluorescent Proteins for In Vitro Caspase Activity Determination // *Applied Biochemistry and Microbiology*. – 2022. Vol. 58(6). – P. – 738–743.

Тезисы

1. Марынич Н.К., Савицкий А.П. Влияние замен аминокислотных остатков цистеина на физико-химические свойства бифотохромного флуоресцентного белка SAASoti // Сборник тезисов отчётной конференции аспирантов ФИЦ Биотехнологии РАН. Москва, 22–23 июня 2020 г. – М.: МАКС Пресс, 2020. – С. 43-46 (устный доклад).
2. Марынич Н.К., Гавшина А.В., Савицкий А.П. «moxSAASoti: первый бифотохромный флуоресцентный белок, устойчивый в окислительных условиях, для применения в суперразрешающей микроскопии» // XXXIV Международная зимняя молодежная научная школа «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии». – Москва, 2022. – С. 27 (тезисы и устный доклад).
3. Марынич Н.К., Создание биосенсора на основе FRET-пары TagRFP-хромобелок: подбор оптимального хромобелка // Ломоносов 2020 (устный доклад).
4. М.Г. Хренова, А.В. Гавшина, И.Д. Соловьев и др. Влияние динамических свойств фотопереключаемых и фотоконвертируемых белков семейства SAASoti на фотофизические и фотохимические свойства // III объединенный научный форум физиологов, биохимиков и молекулярных биологов - VII съезд биохимиков России. (г. Сочи, 3-7 октября 2022 г.) (устный доклад).
5. Savitsky A.P., Soloviev I.D., Meerovich I.G. et al. Multimodal MRI and life-time fluorescence sensors for theranostic applications // OASIS 8. International Conference & Exhibition on Optics & Electro-Optics. (Тель-Авив, Израиль, 12-13 декабря 2022 г.) (устный доклад).

**RESEARCH CENTER OF BIOTECHNOLOGY RAS
OBTAINING A FRET SENSOR MOXSAASOTI-CHROMOPROTEIN AND ITS
APPLICATION IN MODERN MICROSCOPY METHODS**

Abstract. To study intracellular processes, it is necessary to create a FRET pair operating in a wide range of cellular compartments (pH, oxidizing conditions). In the present work, donors and acceptors were selected and optimized to create a monomeric FRET sensor. The monomeric protein SAASoti was chosen as a donor to control the concentration of the sensor due to the photoconversion property. Its cysteine-free variant was obtained to work under the oxidative conditions of the cell, substitutions were introduced to optimize photoconversion and maturation. When selecting an acceptor, the fluorescent properties of 4 chromoproteins were studied in a wide pH range. For the previous KFP acceptor, fluorescence appeared in the presence of acetate ions at low pH values. The monomeric chromoprotein Ultramarine was chosen as an acceptor.

Keywords: biphotochromic fluorescent proteins, chromoproteins, FRET sensors, fluorescence, apoptosis, caspase 3.

Пелевина Анна Витальевна
аспирант ФИЦ Биотехнологии РАН 4 года обучения
профиль 1.5.11 Микробиология
annie.pelevina@yandex.ru
Научный руководитель



Пименов Николай Викторович
доктор биологических наук,
зам. директора по научной работе,
зав. лабораторией реликтовых микробных сообществ

НЕКОТОРЫЕ ОСОБЕННОСТИ РАЗВИТИЯ ФОСФАТ-АККУМУЛИРУЮЩИХ МИКРОБНЫХ СООБЩЕСТВ ПРИ РАЗНЫХ РЕЖИМАХ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ В ЛАБОРАТОРНЫХ РЕАКТОРАХ

Аннотация. *Отработаны режимы циклического культивирования микробных сообществ, обогащенных фосфат-аккумуляторными бактериями. При отъемно-доливном способе культивирования было получено микробное сообщество с низкой плотностью биомассы (0.2 г/л), эффективность удаления фосфора из среды составляла 50%. В ходе работы биореактора происходило изменение таксономического состава микроорганизмов и уменьшение разнообразия форм. Смена таксономического состава сопровождалась повышением эффективности удаления фосфатов и увеличением доли бактерий рода *Dechloromonas* – наиболее вероятным ФАО, в условиях отъемно-доливной культуры. Классический последовательно-периодический способ культивирования позволил получить эффективно работающее (удаление 86% фосфора из поступающей среды) фосфат-аккумуляторное микробное сообщество с высокой плотностью биомассы (4 г/л). В сообществе доминировали типичные ФАО – *Ca. Accumolibacter*. Полученное сообщество способно использовать широкий спектр органических субстратов.*

Ключевые слова: *очистка сточных вод, фосфат-аккумуляторные организмы, циклический тип метаболизма, «Ca. Accumolibacter», Rhodocyclaceae*

Фосфор играет ключевую роль в конструктивном и энергетическом метаболизме всех живых организмов. Фосфоритная руда – важный источник фосфора, который в основном используется при производстве удобрений – не возобновляемый ресурс с быстро истощающимися запасами. В тоже время, избыток сбрасываемого фосфора со сточными водами приводит к массовой эвтрофикации водоемов [2].

Удовлетворить потребность в фосфатах и снизить нагрузку на поверхностные водные объекты могут технологии биологической очистки сточных вод от фосфора с использованием активного ила. Эти технологии основаны на использовании особой группы микроорганизмов – фосфат-аккумуляторных организмов (ФАО), способных при циклической смене аэробных/анаэробных условий осуществлять удаление фосфора из фосфорсодержащей среды. Динамика формирования фосфат-аккумуляторного микробного сообщества, его состав и пространственная организация во многом определяются режимами его культивирования [3,5].

Целью исследований было изучение особенностей развития и эффективности работы фосфат-аккумуляторных микробных сообществ при разных режимах культивирования.

Микробные сообщества, обогащенные ФАО получают в лабораторных реакторах последовательно-периодического действия, принцип работы которых основан на чередовании анаэробных и аэробных фаз. Важным этапом является стадия отстаивания, которая сопровождается образованием агрегатов и осаждением обогащенных фосфатами клеток микроорганизмов. Агрегаты

имеют такую же сложную многокомпонентную структуру, как активный ил очистных сооружений. Но получить микробное сообщество с минимальным количеством компонентов, в котором доминируют ФАО, в таких реакторах практически невозможно.

Для получения обогащенных ФАО сообществ были разработаны два способа культивирования, основанные на циклическом чередовании аэробных/анаэробных фаз – отъемно-доливной, в котором для получения гомогенного сообщества, отсутствовала стадия отстаивания и классический последовательно-периодический способ культивирования. Посевным материалом служил флокулированный активный ил очистных сооружений г. Москвы.

При отъемно-доливном способе культивирования было получено микробное сообщество удаляющее фосфор из среды. Развитие сообщества прослеживали в течение 22 суток. Высокая скорость роста биомассы (3.5 сут) и ограничение по концентрации подаваемого органического вещества позволили получить культуру с низкой плотностью биомассы (0.2г/л), которая удаляла до 50% фосфора из подающейся среды.

Динамика фосфатов в среде свидетельствовала о цикличности процесса, при которой в анаэробной стадии содержание фосфора увеличивалось, а в аэробной фазе происходило его уменьшение в соответствии с известным механизмом биологического удаления фосфора [1].

Микроскопический контроль сообщества реактора выявил в его составе морфологически разные бактериальные формы, а картирование микробного сообщества методом рентгеновского микроанализа подтвердило наличие микровключений фосфора в клетках. Таксономический анализ состава микробного сообщества, проведенный по результатам высокопроизводительного секвенирования гена 16S рРНК, показал, что наиболее вероятным кандидатом на роль ФАО среди микроорганизмов, развивавшихся в отъемно-доливном биореакторе, были β -протеобактерии рода *Dechloromonas*.

Режим работы отъемно-доливного биореактора не позволял добиться высокой плотности биомассы, при которой была бы возможна стабильная работа с высокой эффективностью удаления фосфора.

При использовании классического последовательно-периодического способа культивирования было получено устойчивое, обогащенное ФАО микробное сообщество, которое эффективно удаляло фосфор. В ходе длительного культивирования (более 2 лет) было выявлено 3 стадии развития этого сообщества.

На первом этапе (0 – 40 суток) происходила адаптация микробного сообщества ила к селективным условиям культивирования в реакторе и постепенное накопление фосфат-аккумулирующих организмов. Эффективность удаления фосфора на этом этапе была 35%.

На 40 – 400 сутки (второй этап) эффективность удаления фосфора возрастала и достигала 86%. Содержание в биомассе фосфора составляло $10.6 \pm 0.1\%$ сухого веса. Было установлено, что развитие сообщества происходило с формированием двух морфологически разных типов агрегатов (морфотип I и морфотип II) (Рис.1 А, Б).

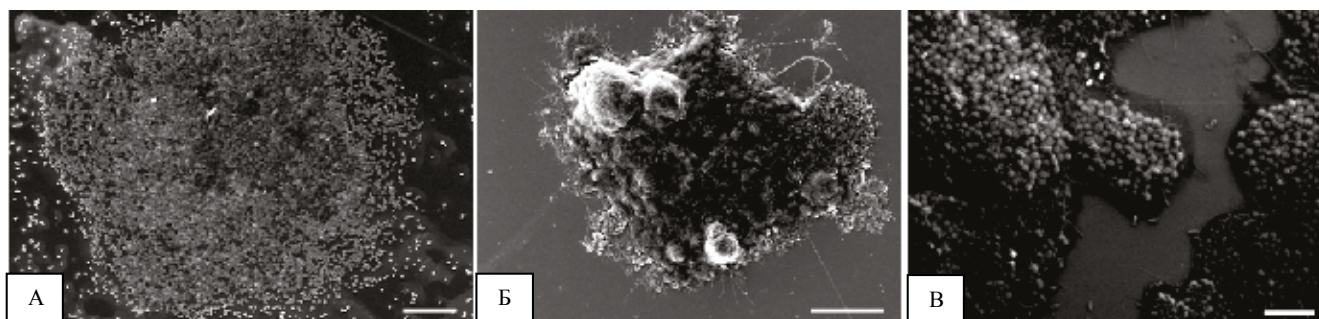


Рис. 1 – Электронные микрофотографии агрегатов: А – морфотип I; Б – морфотип II, 200 сутки культивирования, масштабная линейка – 50μm; В – морфотип I, 400 сутки культивирования, масштабная линейка – 10μm.

Агрегаты имели различия, как по физической структуре, так и по микробному составу. В

агрегатах морфотипа I доминировали типичные для очистных сооружений представители ФАО – *Ca. Accumulibacter* (39.5%), а также потенциальные ФАО – *Dechloromonas* и *Thiothrix* (3.77 и 5.35% соответственно). В сообществе присутствовали гликоген-аккумулирующие микроорганизмы (ГАО) семейства *Competibacteraceae* – *Ca. Competibacter*, которые считаются основными конкурентами ФАО за ацетат. Их доля была существенно меньше ФАО и составляла 8.28 %. В агрегатах II морфотипа доминировали ГАО – *Ca. Competibacter*, доля которых составляла 31.87%. ФАО почти в равных долях были представлены организмами *Ca. Accumulibacter* и *Dechloromonas* (9.89 и 8.02% соответственно), а также нитчатым организмом *Thiothrix* (3.44%).

На 400 сутки культивирования (третий этап) было обнаружено, что произошла селекция агрегатов микробного сообщества биореактора, в результате которой остался один тип агрегатов – агрегаты морфотипа I. Ключевыми представителями в котором были ФАО *Ca. Accumulibacter* (рис.1 В). Эффективность удаления фосфора на этом этапе достигла 86%. Балансовый расчет показал, что большая часть ацетата использовалась фосфат-аккумулирующими организмами для накопления внутриклеточных полифосфатов.

Эту культуру использовали в острых опытах для определения спектра доступных для ФАО источников углерода и энергии. Сточные воды многокомпонентны, при анаэробном сбраживании органических отходов на этапе ацидогенеза образуются как летучие жирные кислоты (ацетат, пропионат и бутират), так и другие низкомолекулярные карбоновые кислоты (например, сукцинат) [4]. Для исследования влияния внешнего источника углерода и энергии на цикл выделения/поглощения фосфора были выбраны следующие субстраты: соли ЛЖК (ацетат, пропионат, бутират), аминокислоты (глутаминовая кислота, аланин, аспарагиновая кислота), глюкоза, этанол, сукцинат, пируват. ЛЖК, пируват и сукцинат вызывали выброс фосфатов после их добавления в анаэробных условиях, а также выраженное потребление фосфатов в последующей аэробной фазе цикла. Наибольший эффект был обнаружен у ацетата, пропионата и пирувата. Наименьший – у сукцината. Бутират вызывал быстрое выделение фосфатов, однако скорость его поглощения в аэробной фазе была низкой. Аминокислоты вызывали выделение фосфатов, однако потребление фосфатов в аэробной фазе было низким. Заметного эффекта от использования культурой глюкозы и этанола не обнаружено.

Основные выводы. Отъемно-доливной способ культивирования позволил получить микробное сообщество с низкой плотностью популяции. Количественные изменения концентрации фосфатов в одном цикле работы биореактора свидетельствовали о развитии фосфат-аккумулирующих организмов в сообществе. Однако из-за низкой плотности популяции, сообщество было неустойчиво.

В ходе длительного культивирования ила очистных сооружений в лабораторном реакторе последовательно-периодического действия получено стабильно функционирующее фосфат-аккумулирующее микробное сообщество с высоким накоплением фосфора в биомассе. Селекция микробного сообщества в биореакторе привела к накоплению *Ca. Accumulibacter* – основного представителя физиологической группы фосфат-аккумулирующих организмов. Полученное сообщество способно использовать широкий спектр органических субстратов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Дорофеев А.Г., Николаев Ю.А., Марданов А.В., Пименов Н.В. Циклический метаболизм как способ существования микроорганизмов // Микробиология. – 2019. – Т. 88. – № 4. – С. 1–16.
2. Farley M. Eutrophication in fresh waters: an international review // Encyclopedia of Lakes and Reservoirs / Eds. Bengtsson L., Herschy R.W., Fairbridge R.W. Springer-Verlag New York Inc. 2012. – P. 258-270.
3. Gómez-Basurto F., Vital-Jácome M., Gómez-Acata E.S., Thalasso F., Luna-Guido M., Dendooven L. Microbial community dynamics during aerobic granulation in a sequencing batch reactor (SBR) // PeerJ. – 2019. V.7. – P. e7152.
4. Wainaina S, Lukitawesa, Kumar Awasthi M, Taherzadeh MJ. Bioengineering of anaerobic digestion for volatile fatty acids, hydrogen or methane production: A critical review. // Bioengineered. – 2019 – V. 10(1) – P. 437-458.

5. Weissbrodt D.G., Neu T.R., Kuhlicke U., Rappaz Y., Holliger C. Assessment of Bacterial and Structural Dynamics in Aerobic Granular Biofilms // *Frontiers in Microbiology*. – 2013. – V. 4. – P. 175.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ РАБОТЫ

Статьи

1. Пелевина А.В., Берестовская Ю.Ю., Грачёв В.А., Дорофеева И.К., Сорокин В.В., Дорофеев А.Г., Каллистова А.Ю., Николаев Ю.А., Котляров Р.Ю., Белецкий А.В., Равин Н.В., Пименов Н.В., Марданов А.В. Микробный консорциум, осуществляющий удаление фосфатов в циклическом аэробно-анаэробном культивировании // *Микробиология*. – 2021. – Т. 90. – № 1. – С. 76-89.
2. Пелевина А.В., Берестовская Ю.Ю., Грачев В.А., Дорофеев А.Г., Слатинская О.В., Максимов Г.В., Каллистова А.Ю., Николаев Ю.А., Груздев Е.В., Равин Н.В., Пименов Н.В., Марданов А.В. Микробное сообщество, аккумулирующее фосфат в лабораторном биореакторе с доминированием «*Candidatus Accumulibacter*» // *Микробиология*. – 2022. – Т. 91, № 5. – С. 631-637.

Тезисы

1. Пелевина А.В., Николаев Ю.А., Грачёв В.А., Дорофеев А.Г., Каллистова А.Ю., Берестовская Ю.Ю., Пименов Н.В., Котляров Р.Ю., Марданов А.В. Новые фосфат аккумулирующие бактерии микробного сообщества лабораторного биореактора // Всероссийская конференция с международным участием «Микробиология: вопросы экологии, физиологии, биотехнологии». (Москва, 23-24 декабря 2019 г.) – М.: МАКС Пресс. – С. 92 (тезисы и постерный доклад).
2. Пелевина А.В. Фосфат-аккумулирующее микробное сообщество лабораторного биореактора // Сборник тезисов отчётной конференции аспирантов ФИЦ Биотехнологии РАН. Москва, 22–23 июня 2020 г. – М.: МАКС Пресс, 2020. – С. 138-144 (тезисы и устный доклад).
3. Пелевина А.В. Микробное разнообразие во флоккулах активного ила лабораторного реактора, осуществляющего удаление фосфора // Сборник тезисов ежегодной отчетной конференции аспирантов Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук». – 2021. – С. 174-181 (тезисы и устный доклад).
4. Пелевина А.В., Берестовская Ю.Ю., Грачёв В.А., Дорофеева И.К., Сорокин В.В., Дорофеев А.Г., Каллистова А.Ю., Николаев Ю.А., Груздев Е.В., Белецкий А.В., Равин Н.В., Пименов Н.В., Марданов А.В. Фосфат-аккумулирующее микробное сообщество лабораторного реактора типа SBR // 3-й Российский микробиологический конгресс (Псков, 26 сентября – 1 октября 2021 г.) : материалы конгресса / редкол.: Бонч-Осмоловская Е.А., Ильина Н.А., Пименов Н.В.; сост.: Пименов Н.В., Бонч-Осмоловская Е.А., Ильина Н.А., Антал Т.К., Серова О.А., Фролов В.В., Бугеро Н.В. – Псков : ООО «Конкорд», 2021. – С. 96 (тезисы и устный доклад).
5. Груздев Е.В., Белецкий А.В., Пелевина А.В., Дорофеев А.Г., Грачев В.А., Пименов Н.В., Равин Н.В., Марданов А.В. Новые фосфат-аккумулирующие микроорганизмы, выявленные в результате метагеномного анализа микробного сообщества лабораторного биореактора, осуществляющего удаление фосфора // 3-й Российский микробиологический конгресс (Псков, 26 сентября – 1 октября 2021 г.) : материалы конгресса / редкол.: Бонч-Осмоловская Е.А., Ильина Н.А., Пименов Н.В.; сост.: Пименов Н.В., Бонч-Осмоловская Е.А., Ильина Н.А., Антал Т.К., Серова О.А., Фролов В.В., Бугеро Н.В. – Псков: ООО «Конкорд», 2021. – С. 166 (тезисы и постерный доклад).
6. Пелевина А.В. Закономерности формирования микробного сообщества фосфат-аккумулирующих бактерий в лабораторном биореакторе последовательно-периодического действия // Сборник тезисов ежегодной отчетной конференции аспирантов Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр» «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук». – М.: ВАШ ФОРМАТ – 2022. – С. 185-190 (тезисы и устный доклад).
7. Pelevina A.V., Berestovskaya J.J., Dorofeev A.G., Ravin N.V., Mardanov A.V., Pimenov N.V. Development of phosphate-accumulating microbial community in a sequencing batch reactor (SBR) // *Bioinformatics of Genome Regulation and Structure/Systems Biology (BGRS/SB-2022): The Thirteenth International Multiconference (04–08 July 2022, Novosibirsk, Russia); Abstracts /Institute of Cytology*

and Genetics, the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences. –Novosibirsk: ICG SB RAS, 2022. – 1148 p. – ISBN 978-5-91291-059-3. – P. 530. – DOI 10.18699/SBB-2022-298. (тезисы и постерный доклад).

8. Пелевина А.В., Берестовская Ю.Ю., Груздев Е.В., Сорокин В.В., Слатинская О.В., Марданов А.В. Особенности формирования фосфат-аккумулирующего микробного сообщества в лабораторном биореакторе последовательно-периодического действия // Актуальные аспекты современной микробиологии: XIII молодежная школа-конференция с международным участием. Институт микробиологии им. С.Н. Виноградского, ФИЦ Биотехнологии РАН. Москва, 16–18 ноября 2022 г. – М.: ВАШ ФОРМАТ, 2022. – С. 197-199 - ISBN 978-5-00147-435-7 (тезисы и устный доклад).

ОСНОВНЫЕ ДОСТИЖЕНИЯ, ПАТЕНТЫ

Пименов Н.В., Дорофеев А.Г., Николаев Ю.А., Грачев В.А., Пелевина А.В., Берестовская Ю.Ю., Каллистова А.Ю., Котляров Р.Ю., Белецкий А.В., Равин Н.В., Марданов А.В. Способ биологической очистки сточных вод от фосфатов. Патент на изобретение 2753657 С1, 19.08.2021. Заявка № 2020125577 от 24.07.2020.

Pelevina Anna Vital'evna

RESEARCH CENTER OF BIOTECHNOLOGY RAS SOME FEATURES OF THE DEVELOPMENT OF PHOSPHATE- ACCUMULATING MICROBIAL COMMUNITIES WITH DIFFERENT METHODS OF CULTIVATION

Abstract. The peculiarities of formation of a community of phosphate-accumulating microorganisms (PAO) in a laboratory bioreactor ensuring change of aerobic and anaerobic conditions during periodic draining and medium addition are investigated. This method of cultivation, a microbial community with a low biomass density (0.2 g / l) was obtained, the efficiency of phosphorus removal from the medium was 50%. During the work of the bioreactor, there was a change in the taxonomic composition of microorganisms and a decrease in the diversity of forms. The change the community composition was accompanied by an increase in the efficiency of phosphate removal and an increase in the number of bacteria *Dechloromonas* – the most likely PAO, in the conditions of weaning-topping culture. The classical sequential batch reactor made it possible to obtain an efficient (removal of 86% of phosphorus from the incoming medium) phosphate-accumulating microbial community with a high biomass density (4 g/l). The community was dominated by typical PAO – *Ca. Accumulibacter*. The resulting community is able to use a wide range of organic substrates.

Keywords: biological phosphorus removal, phosphate accumulating organisms (PAO), wastewater treatment, “*Candidatus Accumulibacter*”

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

Печенов Павел Юрьевич

аспирант ФИЦ Биотехнологии РАН 4 года обучения

профиль 1.5.6 Биотехнология

e-mail: pechenov.p@gmail.com

Научный руководитель

Летаров Андрей Викторович

доктор биологических наук,

зав. лабораторией вирусов микроорганизмов



ИССЛЕДОВАНИЕ БИОРАЗНООБРАЗИЯ БАКТЕРИОФАГОВ ЛАКТОКОККОВ НА ПРЕДПРИЯТИЯХ МОЛОЧНОЙ ПРОМЫШЛЕННОСТИ РОССИИ

Аннотация. Нами было исследовано биоразнообразие бактериофагов лактококков в 76 образцах молочной сыворотки, полученной вследствие сбоя технологического процесса сквашивания молока на предприятиях России. Методом ПЦР типирования была определена родовая принадлежность содержащихся в них вирусов молочнокислых бактерий, а также изолированы десять наиболее агрессивных фагов рода *Ceduovirus*, с последующим изучением их морфологии и полногеномным секвенированием.

Ключевые слова: молочнокислые бактерии, лактофаги, *Ceduovirus*

Молочнокислые микроорганизмы являются одними из самых часто используемых бактериальных культур при производстве продуктов питания человеком. Наиболее широко они представлены в процессах ферментации молока с целью получения кисломолочных продуктов и сыров. Комбинация культур с разными свойствами позволяет достигнуть желаемых технологических и органолептических свойств готового продукта, таких как вкус, аромат, вязкость и газообразование. Одним из самых широко распространенных видов является вид *Lactococcus lactis* [1].

В то же время, молоко и молочное сырье, поступающее на переработку, является естественным резервуаром обитания бактериофагов лактококков, способных нарушить технологический процесс с участием *L. lactis*. Факт же того, что подобные процессы происходят в больших объемах и часто не стерильных условиях, данная проблематика только усугубляется [2]. Это является причиной серьезных экономических потерь производителя. Ввиду такого серьезного риска инфекции стартовых культур фагами актуально и необходимо постоянно проводить мониторинг фаговой популяции, исследовать их биоразнообразие, морфологию и генетику [3].

Для исследования биоразнообразия бактериофагов лактококков на производствах кисломолочной продукции в Российской Федерации, нами было собрано 76 образцов молочной сыворотки после срыва технологического процесса ферментации молока. В результате было выявлено, что в 18 образцах содержатся бактериофаги рода *Ceduovirus*, 31 рода *Skunavirus*, 2 относятся к роду P335, 21 образец содержит смесь бактериофагов *Ceduovirus* и *Skunavirus*, 1 образец смесь *Skunavirus* и P335. Три образца по результату исследования не содержат детектируемых ПЦР вирионов [4].

Следующим этапом на культуре промышленных штаммов *Lactococcus lactis* нами было выделено 10 чистых культур бактериофагов, названных STA28, STA30, STA74, STA135, STA147, STA173, STA189, STA206, STA151, STA254. Последующее ПЦР типирование позволило отнести все выделенные фаги к роду *Ceduovirus*. Данный род подразделяется на два вида c2 и bIL67 по

генетическим факторам и используемому в качестве вторичного рецептора мембранных белков P_{ir} или Y_{jaE} соответственно [5]. С целью типирования на с2 и bIL67 выделенных нами вирусов мы провели работу по делетированию генов p_{ir} и u_{jaE} в хозяйских штаммах с помощью, разработанной нами ранее системы редактирования генома лактококков [6]. Инфекция полученными изолятами штаммов лактококков с делециями p_{ir} или u_{jaE} продемонстрировала, что бактериофаги STA28, STA206, STA254, STA251 были не способны расти на культурах с делецией гена p_{ir}, что позволило нам отнести их к группе с2. Бактериофаги же STA30, STA 74, STA135, STA147, STA 173, STA189 не способны расти на культурах с делецией гена u_{jaE}, что позволило отнести их группе bIL67.

Для исследования морфологии выделенных бактериофагов лактококков мы применили метод трансмиссионной электронной микроскопии. В результате, все они имели типичную для *Ceduvovirus* морфологию. Их размеры были 47 – 59 x 37 – 47 нм для капсида и 84 – 104 нм для хвоста, что типично для фагов данного рода [7].

Все выделенные и просиквенированные нами бактериофаги имеют высокую идентичность с бактериофагом *Lactococcus phage vB_Llc_bIBVp6/4* (более 95%). Сравнение выделенных бактериофагов, с наиболее близким по последовательности нуклеотидов геномом бактериофага vB_Llc_bIBVp6/4 показало, что 28 ORFs имеют гомологию нуклеотидной последовательности более 90%. 3 ORFs имеют гомологию выше 50% но меньше 90%. Данные результаты свидетельствуют о близком родстве выделенных нами бактериофагов. Для выделенных нами бактериофагов STA30, STA 74, STA135, STA147, STA 173, STA189 нуклеотидные последовательности наиболее значительно различаются для локусов, кодирующие гены, описанные как gp34, gp35 и gp36 у бактериофага bIL67 и фагов STA28, STA206, STA254, STA251 описанные как I14, I15 и I16 у с2, ответственные за распознавание первичных сахаридных рецепторов бактериофага на поверхности клетки и Y_{jaE} или P_{ir} белков, используемых в качестве вторичного фагового рецептора. При сравнении полученных геномов так же с бактериофагом с2 и бактериофагом bIL67 гомологию нуклеотидных последовательностей более 90% имеют только 8 ORFs. В их числе gp3/e5 предполагаемо анотированный как АТФаза семейства AAA, gp23/l2 предполагаемая резолваза, gp25/l4 структурный белок вирона, gp26/l5 протеаза, gp32/l12 терминаза. Остальные представлены ORFs кодирующими гипотетические белки.

Стоит отметить, что с момента последнего подобного исследования соотношение родов бактериофагов, выделяемых в промышленности значительно изменилось. Ранее отмечалось преимущественно, распространение бактериофагов рода *Ceduvovirus*, однако в результате нашей работы мы видим смещение популяции в сторону рода *Skunavirus*. Филогентические исследования и выравнивание отсеквенированных фаговых геномов показали, что очень похожие бактериофаги могут встречаться в отдаленных географических точках. Так же, насколько нам известно, это первое исследование бактериофагов рода *Ceduvovirus* на заводах молочной промышленности РФ. Полученные результаты представляют ценную информацию, которая может быть использована при разработке методов борьбы с ними и улучшении противифаговых свойств штаммов стартовых культур.

В дальнейшем мы планируем провести исследование бактериофагов рода *Skunavirus* и группы P335. Проведение данных исследований позволит нам подобрать эффективные подходы к редактированию генома промышленно-ценных штаммов лактококков с целью улучшения их устойчивости к фагам.

ЛИТЕРАТУРА

1. Aryana K.J., Olson D.W. A 100-Year Review: Yogurt and other cultured dairy products // *Journal of Dairy Science*. – 2017. – Vol. 100 – № 12. – P. 9987-10013.
2. González-González F., Delgado S., Ruiz L., Margolles A., Ruas-Madiedo P. Functional bacterial cultures for dairy applications: Towards improving safety, quality, nutritional and health benefit aspects // *Journal of Applied Microbiology*. – 2022. – Vol. 133 – № 1. – P. 212-229.
3. Garneau J.E., Moineau S. Bacteriophages of lactic acid bacteria and their impact on milk fermentations // *Microbial Cell Factories*. – 2011. – Vol. 10 Suppl 1. – № Suppl 1. – P. S20.

4. Labrie, S., Moineau, S. Multiplex PCR for Detection and Identification of Lactococcal Bacteriophages // *Applied Environmental Microbiology*. – 2000. – Vol. 66. – P. 987–994
5. Millen A.M., Romero D.A. Genetic determinants of lactococcal C2viruses for host infection and their role in phage evolution // *The Journal of General Virology*. – 2016. – Vol. 97. – № 8. – P. 1998–2007.
6. Pechenov P. Y., et al. New Effective Method of Lactococcus Genome Editing Using Guide RNA-Directed Transposition // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2022. – Vol. 22 (23). – P. 13978.
7. Chmielewska-Jeznach M., Bardowski J.K., Szczepankowska A.K. Lactococcus Ceduvirus Phages Isolated from Industrial Dairy Plants-from Physiological to Genomic Analyses // *Viruses*. – 2020. – Vol. 12. – № 3. – P. 280.
8. Aryana K.J., Olson D.W. A 100-Year Review: Yogurt and other cultured dairy products // *Journal of Dairy Science*. – 2017. – Vol. 100 – № 12. – P. 9987–10013.
9. González-González F., Delgado S., Ruiz L., Margolles A., Ruas-Madiedo P. Functional bacterial cultures for dairy applications: Towards improving safety, quality, nutritional and health benefit aspects // *Journal of Applied Microbiology*. – 2022. – Vol. 133 – № 1. – P. 212–229.
10. Garneau J.E., Moineau S. Bacteriophages of lactic acid bacteria and their impact on milk fermentations // *Microbial Cell Factories*. – 2011. – Vol. 10 Suppl 1. – № Suppl 1. – P. S20.
11. Labrie, S., Moineau, S. Multiplex PCR for Detection and Identification of Lactococcal Bacteriophages // *Applied Environmental Microbiology*. – 2000. – Vol. 66. – P. 987–994
12. Millen A.M., Romero D.A. Genetic determinants of lactococcal C2viruses for host infection and their role in phage evolution // *The Journal of General Virology*. – 2016. – Vol. 97. – № 8. – P. 1998–2007.
13. Pechenov P. Y., et al. New Effective Method of Lactococcus Genome Editing Using Guide RNA-Directed Transposition // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2022. – Vol. 22 (23). – P. 13978.
14. Chmielewska-Jeznach M., Bardowski J.K., Szczepankowska A.K. Lactococcus Ceduvirus Phages Isolated from Industrial Dairy Plants-from Physiological to Genomic Analyses // *Viruses*. – 2020. – Vol. 12. – № 3. – P. 280.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ РАБОТЫ

Статьи

1. Pechenov P.Y., Garagulya D.A., Stanovov D.S., Letarov A.V. New Effective Method of Lactococcus Genome Editing Using Guide RNA-Directed Transposition // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2022. – Vol. 23 (22). – P. 13978.

Pechenov Pavel Yurievich

RESEARCH CENTER OF BIOTECHNOLOGY RAS THE STUDY OF THE BIODIVERSITY OF LACTOCOCCAL BACTERIOPHAGES AT THE ENTERPRISES OF THE DAIRY INDUSTRY OF RUSSIA

Abstract. We have studied the biodiversity of lactococcal bacteriophages in 76 samples of whey obtained as a result of failures of the technological process of milk fermentation at Russian enterprises. The generic affiliation of lactic acid bacteria viruses contained in them was determined by PCR typing, and ten of the most aggressive phages of the genus Ceduvirus were isolated, followed by the study of their morphology and genome-wide sequencing.

Keywords: lactic acid bacteria, lactophages, CRISPR/Cas.

Бакунова Алина Константиновна

аспирант ФИЦ Биотехнологии РАН 3 года обучения

профиль 1.5.4 Биохимия

e-mail: albakunova@mail.ru

Научный руководитель

Безсуднова Екатерина Юрьевна

доктор химических наук

с.н.с. лаборатории инженерной энзимологии



СПЕЦИФИЧНОСТЬ И СТАБИЛЬНОСТЬ ТРАНСАМИНАЗЫ ИЗ *HALISCOMENOBACTER HYDROSSIS* В РЕАКЦИЯХ С D-АМИНОКИСЛОТАМИ И ПЕРВИЧНЫМИ (R)-АМИНАМИ

Аннотация. Пиридоксаль-5'-фосфат-зависимые трансаминазы относятся к промышленно значимым ферментами и применяются для стереоселективного аминирования органических соединений. В текущем году продолжено исследование трансаминазы D-аминокислот из *Haliscomenobacter hydrossis* (TA_Halhy), определены структурные факторы стабильность холоформы TA_Halhy, а также подобраны условия реакции, стабилизирующие холофермент. Методом точечного мутагенеза получен вариант TA_Halhy активный в реакциях с первичными ароматическими (R)-аминами, вариант R90I охарактеризован кинетическими методами. Методом рентгеноструктурного анализа выявлены структурные основы специфичности варианта R90I к первичным ароматическим аминам.

Ключевые слова: трансаминаза D-аминокислот, стабильность, субстратная специфичность, первичные (R)-амины, биокатализ.

Пиридоксаль-5'-фосфат (PLP)-зависимые трансаминазы играют ключевую роль в метаболизме аминокислот в живых организмах: они катализируют обратимый стереоселективный перенос аминогруппы с аминокислоты/амин на кетокислоту/кетон с образованием новой аминокислоты/амин и новой кетокислоты/кетона. В биотехнологии ТА применяются для целей стереоселективного аминирования органических соединений [1]. Разработка биокатализатора на основе природных трансаминаз опирается на понимание взаимосвязи структуры и функции ферментов, в том числе структурных основ субстратной специфичности и стабильности.

Ранее нами обнаружена, выделена в рекомбинантной форме и охарактеризована трансаминаза D-аминокислот из бактерии *Haliscomenobacter hydrossis* (TA_Halhy). TA_Halhy активна с разнообразными D-аминокислотами; активность с L-аминокислотами и первичными (R)-аминами не обнаружена. Удельная активность трансаминазы в реакциях аминирования α -кетокислот достигает 200 U/mg, энантиомерный избыток продукта, D-аминокислоты, превышает 99% [2]. Установлено, что организация активного центра TA_Halhy и канонической трансаминазы D-аминокислот из *Bacillus* sp. YM-1 различаются [3].

В текущем году проведен анализ факторов, (1) влияющих на стабильность холофермента, молекулу ТА с кофактором PLP, ковалентно связанным с боковой группой каталитического остатка лизина; (2) определяющих субстратную специфичность TA_Halhy. По результатам анализа стабильности холофермента в буфере и в ходе реакции определены факторы, которые способствуют диссоциации/стабилизации холоформы TA_Halhy, и подобраны оптимальные условия регенерации активной формы фермента. Кроме того, вклад отдельных остатков в под-

держание рабочей конформации кофактора PLP в активном центре TA_Halhy проанализирован методом точечного мутагенеза.

В ходе определения структурных основ субстратной специфичности TA_Halhy получены варианты фермента с одиночными и двойными заменами, в том числе вариант R90I, активный как в реакциях с D-аминокислотами, так и с первичными ароматическими (R)-аминами. Получены кристаллы холоформы TA_HalhyR90I и ее комплекса с фенилгидразином, аналогом субстрата (R)-1-фенилэтиламина, проведен рентгеноструктурный анализ кристаллов, получены структуры и проанализированы изменения в активном центре TA_Halhy в результате замены R90I.

Основные выводы. Избыток кетосубстрата и снижение температуры стабилизируют холоформу TA_Halhy в ходе реакции.

R28 участвует в поддержании рабочей конформации PLP.

Эффективное связывание фенильной группы (R)-1-фенилэтиламина в активном центре варианта TA_HalhyR90I обусловлено подвижностью R28 и наличием гидрофобной области связывания, сформированной остатками F33, Y35, I90 и Y147.

ЛИТЕРАТУРА

1. Wu S., Snajdrova R., Moore J.C., Baldenius K., Bornscheuer U.T. Biocatalysis: enzymatic synthesis for industrial applications // *Angew. Chemie - Int. Ed.* – 2021. – Vol. 60. – P. 88-119.
2. Bakunova A.K., Isaikina T.Yu., Popov V.O., Bezsudnova E.Yu. Asymmetric synthesis of enantiomerically pure aliphatic and aromatic D- amino acids catalyzed by transaminase from *Haliscomenobacter hydrossis* // *Catalysts*. – 2022. – Vol. 12(12):1551 – P. 1-17.
3. Bakunova A.K., Nikolaeva A.Y., Rakitina T. V., Isaikina T.Y., Khrenova M.G., Boyko K.M., Popov V.O., Bezsudnova E.Y. The uncommon active site of D-amino acid transaminase from *Haliscomenobacter hydrossis*: biochemical and structural insights into the new enzyme // *Molecules*. – 2021. – Vol. 26(16). – P. 1-18.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ РАБОТЫ

Статьи

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

Тезисы

1. Бакунова А.К., Ракитина Т.В., Бойко К.М., Безсуднова Е.Ю. Трансаминаза D-аминокислот из *Haliscomenobacter hydrossis* – потенциальный биокатализатор синтеза природных и неприродных D-аминокислот // *Современные проблемы теоретической и экспериментальной химии: Межвуз. сборник науч. трудов XV Всероссийск. конф. молодых ученых с международ. участием*. – Саратов: Изд-во «Саратовский источник». – 2021. – С. 54-56.
2. Bakunova A.K., Matyuta I.O., Nikolaeva A.Yu., Boyko K.M., Popov V.O., Bezsudnova E.Yu. Interaction of D-cycloserine with a D-amino acid transaminase from *Haliscomenobacter hydrossis* //

Bioinformatics of Genome Regulation and Structure/Systems Biology (BGRS/SB-2022): The Thirteenth International Multiconference. Institute of Cytology and Genetics, the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences. – Novosibirsk: ICG SB RAS. – 2022. – P. 273.

3. Бакунова А.К., Бойко К.М., Николаева А.Ю., Ракитина Т.В., Попов В.О., Безсуднова Е.Ю. Трансаминаза из *Haliscomenobacter hydrossis*: причины и смысл перестройки активного центра при диссоциации кофактора пиридоксаль-5'-фосфата // VI съезд биохимиков России. – Сочи (Дагомыс) – М.: Издательство «Перо». – 2021. – Т. 2. – С. 121 (тезисы и устный доклад).

4. Bakunova A.K., Matyuta I.O., Boyko K.M., Khrenova M.G., Popov V.O., Bezsudnova E.Yu. Revealing the structural basis of promiscuous activity of D-amino acid transaminase from *Haliscomenobacter hydrossis* // Novel Enzymes 2023. 7th International conference on Novel Enzymes. Greifswald (Germany) / Austria: Published by ChemIT. – 2023. – P. 111 (тезисы и постерный доклад).

Bakunova Alina Konstantinovna

RESEARCH CENTER OF BIOTECHNOLOGY RAS

STUDY OF TRANSAMINASE FROM *HALISCOMENOBACTER HYDROSSIS*: SPECIFICITY AND STABILITY IN REACTIONS WITH D-AMINO ACIDS AND PRIMARY (R)-AMINES

Abstract. Pyridoxal-5'-phosphate-dependent transaminases are industrially significant enzymes and used for stereoselective amination of organic compounds. In the current year, the study of transaminase D-amino acids from *Haliscomenobacter hydrossis* (TA_Halhy) has been continued, structural factors determining the stability of TA_Halhy holoform have been determined, and reaction conditions stabilizing the holoenzyme have been found. A variant of TA_Halhy active in reactions with primary aromatic (R)-amines has been obtained using site-directed mutagenesis, and the R90I variant has been characterized by kinetic methods. Structural basis of the specificity of the R90I variant towards primary aromatic amines have been identified using X-ray structural analysis.

Keywords: D-amino acid transaminase, stability, substrate specificity, primary (R)-amines, biocatalysis

Работа выполнена при поддержке РНФ (грант № 19-14-00164).

Бидюк Виктория Александровна

аспирант ФИЦ Биотехнологии РАН 3 года обучения

профиль 1.5.3 Молекулярная биология

e-mail: victoria.bidiuk@gmail.com

Научный руководитель

Кушников Виталий Владимирович

доктор биологических наук,

зав. лабораторией молекулярной генетики



РОЛЬ ОКИСЛИТЕЛЬНОГО СТРЕССА И ДЕФИЦИТА АРОМАТИЧЕСКИХ АМИНОКИСЛОТ В МЕХАНИЗМЕ ДЕЙСТВИЯ НОВЫХ ФУНГИЦИДНЫХ НУКЛЕОЗИДОВ С ЛИПОФИЛЬНОЙ ГРУППОЙ

Аннотация. В данной работе проведено исследование механизма действия новой перспективной группы противогрибковых веществ – модифицированных нуклеозидов (SOV). При изучении изменения уровня 64 белков-индикаторов в ответ на воздействие SOV4 было обнаружено увеличение уровня ряда белков участвующих в синтезе аминокислот, а также тиоредоксина, что свидетельствует об индукции окислительного стресса. Было показано, что окислительный стресс играет ключевую роль в токсичности SOV4, поскольку добавление антиоксидантов существенно снижало эффективность этих веществ. Также была обнаружена прямая связь между способностью клетки синтезировать и транспортировать тирозин и триптофан и устойчивостью к действию изучаемого вещества. Более того, антиоксиданты могли снижать токсичность SOV4 только на фоне функционального пути биосинтеза Tyr и Trp. Это демонстрирует непосредственную связь между ароматическими аминокислотами и окислительным стрессом, и, по литературным данным, эта связь может играть значительную роль при воздействии широкого ряда стрессовых воздействий.

Ключевые слова: грибковые патогены, гибель клеток, окислительный стресс, ароматические аминокислоты

Грибковые патогены вызывают серьезные заболевания у человека, а также наносят значительный экономический ущерб в области сельского хозяйства, промышленности и объектам культуры [1]. На данный момент существует проблема поиска новых эффективных противогрибковых средств, как в медицине, так и других областях.

В данной работе мы провели исследование механизма действия новых потенциальных антимикотических соединений, для которых ранее была показана высокая ингибирующая активность против грибов-деструкторов, способных повреждать произведения темперной живописи [2]. На данном этапе был получен ряд N⁴-алкильных производных 2'-дезоксцитидина (SOV4, SOV5 и SOV8), которые содержали дополнительные модификации по 3'-положению остатка 2'-дезоксирибозы, и обладали повышенной активностью [3]. Данные, представленные в этой работе, получены для производного SOV4.

В качестве модельного организма были использованы дрожжи *Saccharomyces cerevisiae* штамм BY4742. Было определено, что клеточная гибель наступает уже через несколько минут после обработки клеток минимальной ингибирующей концентрацией (МИК) SOV4, при этом у клеток теряется способность к образованию колоний, и наблюдается массовая пермеабилзация клеточной мембраны. При концентрации меньшей, чем МИК, происходит замедление роста культуры.

Для изучения клеточного ответа мы определили изменение уровня продукции некоторого минимального набора реперных белков [4] в ответ на воздействие SOV4. Для этого использовали из-

бранные штаммы из коллекции штаммов с индивидуально меченными GFP белками (64 белка) и уровень продукции определяли при помощи цитометрии [4]. В результате проведенного анализа было обнаружено, что в дрожжевых клетках повышается уровень белков, ответственных за биосинтез ароматических аминокислот (ААК), а также ряда других генов, в том числе тиоредоксина Trx2, участвующего в защите клетки от окислительного стресса. Делеция генов, ответственных за синтез ААК, повышала чувствительность к SOV4, при этом она возникала только у штаммов, неспособных синтезировать тирозин и триптофан, тогда как синтез других аминокислот никак не влиял на эффективность действия SOV4.

Для проверки роли транспорта ААК были проверены штаммы с делецией генов TAT1 и TAT2. Белок Tat1 является низкоафинным транспортером триптофана и высокоафинным для тирозина, Tat2 - высокоафинный транспортер тирозина и триптофана [5]. Также был получен штамм с двойной делецией *tat1Δtat2Δ*. Штаммы *tat1Δ* и *tat1Δtat2Δ* продемонстрировали повышенную чувствительность к SOV4 (Рис. 1), что подтверждает важность не только синтеза, но и транспорта ААК из окружающей среды.

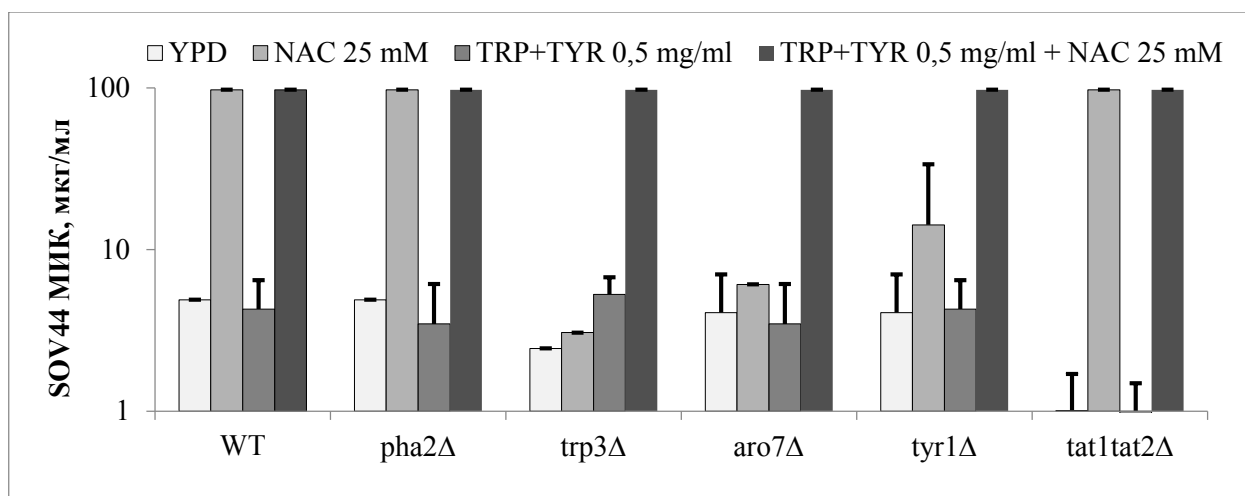


Рис. 1. МИК SOV4 для штаммов с делецией генов синтеза (*PHA2*, *TRP3*, *ARO7* и *TYR1*) и транспорта (*TAT1* и *TAT2*) ароматических аминокислот

Мы предположили, что если воздействие SOV4 на клетки связано с нарушением работы транспорта ААК, то избыток ААК в среде должен восполнить дефицит и защитит клетку от токсичного воздействия SOV4. Перед инкубацией с SOV4 в среду были добавлены тирозин и триптофан в существенном избытке (0,5 мг/мл), однако чувствительность штаммов с делецией генов синтеза ААК повысилась только незначительно (рис.1), а чувствительность дикого типа никак не изменилась.

Поскольку при действии SOV4 происходил подъем уровня белка тиоредоксина Trx2, участвующего в защите клетки от окислительного стресса, мы предположили, что ингибирующее действие SOV4 связано с его способностью вызывать окислительный стресс.

Мы показали, что добавление антиоксидантов N-ацетил цистеина (NAC), аскорбиновой кислоты или глутатиона в концентрации 25 мМ существенно снижает МИК SOV4 для дрожжей дикого типа, а также снижает долю мертвых клеток, и возвращает в норму уровень упомянутых выше белков биосинтеза ароматических АК. Эффект добавления антиоксидантов был пропорционален их концентрации. Однако, оказалось, что антиоксиданты не способны предотвратить клеточную гибель в штаммах с делецией генов биосинтеза тирозина и триптофана. Для этих штаммов, NAC способствует защите клетки от воздействия SOV4 только в случае присутствия в среде избытка ААК (рис.1). При этом, защитные свойства антиоксидантов в штамме с делецией генов транспорта ААК проявляются на уровне дикого типа, несмотря на высокую чувствительность этих мутантов к действию SOV4. Примечательно, что штаммы с делецией генов, ответственных за транспорт ААК, реагируют на присутствие антиоксидантов так же, как и дикий тип. Это может указывать как на необязательность данной транспортной системы в выживании клетки в присут-

ствии SOV4 и антиоксидантов, и достаточность только внутреннего синтеза, так и на то, что эти белки являются не единственными, которые способны обеспечить транспорт ААК внутрь клетки.

Основные выводы. Таким образом, окислительный стресс играет одну из ключевых ролей в механизме действия SOV4. При этом, для повышения устойчивости клетки к SOV4 необходимо не только присутствие мощной антиоксидантной защиты, но и достаточный уровень ААК внутри клетки (что может быть достигнуто путем как внутреннего синтеза, так и транспортом извне). Полученные результаты согласуются с опубликованными ранее для ряда других веществ [6,7], что говорит об универсальности связи ААК и окислительного стресса в защите клетки от различных типов токсических воздействий.

Кроме того, в недавно опубликованной работе Турко и др. [8] было проанализировано большое количество опубликованных работ, посвященных поиску чувствительных делеционных мутантов к различным химическим веществам. Авторы обнаружили, что делеция генов *TRP1-5* и *ARO1-2* приводит к повышению чувствительности к большому количеству стрессоров различной химической природы, и по своей распространенности среди чувствительных штаммов уступает только штаммам с нарушением пути биосинтеза эргостерола. Помимо этого, ранее уже было показано, что работа транспортера Tat2 напрямую связана с синтезом эргостерола, а значит и свойствами мембраны, которая является первым препятствием на пути различных стрессоров. Это указывает на некую универсальность механизма устойчивости к стрессорам, в которых участвуют или которые регулируют ААК. В работе Моосманн и др. были обнаружены антиоксидантные свойства у ААК, входящие в состав трансмембранных белков[9], что, может является непосредственным механизмом, который обеспечивает связь между антиоксидантной защитой клетки, уровнем ААК в клетке, свойствами клеточной мембраны и чувствительностью к различным по своей природе стрессорам, в том числе и к изучаемому веществу.

ЛИТЕРАТУРА

1. Alexandrova L.A. et al. 3'-Amino modifications enhance the antifungal properties of N4-alkyl-5-methylcytidines for potential biocides // New Journal of Chemistry. – 2022. – Vol. 46. – P. 5614–5626.
2. Ayers M.C., Sherman Z.N., Gallagher J.E.G. Oxidative stress responses and nutrient starvation in mchm treated *saccharomyces cerevisiae* // G3: Genes, Genomes, Genetics. Genetics Society of America. – 2020. – Vol. 10 (12). – P. 4665–4678.
3. Bauer B.E. et al. Weak organic acid stress inhibits aromatic amino acid uptake by yeast, causing a strong influence of amino acid auxotrophies on the phenotypes of membrane transporter mutants // Eur J Biochem. – 2003. – Vol. 270 (15). – P. 3189–3195.
4. Zhgun A. et al. Detection of potential biodeterioration risks for tempera painting in 16th century exhibits from State Tretyakov Gallery // PLoS One. Public Library of Science. – 2020. – Vol. 15 (4).
5. Levshin I.B. et al. Antifungal Thiazolidines: Synthesis and Biological Evaluation of Mycosidine Congeners // Pharmaceuticals. – 2022. – Vol. 15 (5). – P. 563.
6. Moosmann B., Behl C. Cytoprotective antioxidant function of tyrosine and tryptophan residues in transmembrane proteins // Eur J Biochem. – 2000. – Vol. 267 (18). – P. 5687–5692.
7. Rodrigues M.L., Nosanchuk J.D. Fungal diseases as neglected pathogens: A wake-up call to public health officials // PLoS Negl Trop Dis. Public Library of Science. – 2020. - Vol. 14 (2).
8. Schmidt A., Hall M.N., Koller A. Two FK506 Resistance-Confering Genes in *Saccharomyces cerevisiae*, TAT1 and TAT2, Encode Amino Acid Permeases Mediating Tyrosine and Tryptophan Uptake // MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY. – 1994. – Vol. 14 (10). – P. 6597–6606.
9. Turco G. et al. Global analysis of the yeast knock-out phenome // bioRxiv. 2022. P. 2022.12.22.521593.

RESEARCH CENTER OF BIOTECHNOLOGY RAS
THE ROLE OF OXIDATIVE STRESS AND DEFICIENCY OF AROMATIC
AMINO ACIDS IN THE MECHANISM OF ACTION OF NEW FUNGICIDAL
NUCLEOSIDES WITH LIPOPHYLIC GROUP

Abstract. Fungal pathogens can cause serious disease in humans and also cause significant economic damage in the areas of agriculture, industry and cultural conservation. At the moment, there is a need for new effective antifungal agents. In this work, we studied the mechanism of action of modified nucleosides, termed SOV, which possess fungicidal activity. Oxidative stress has been shown to play a key role in SOV4 toxicity. A direct relationship was also found between the ability of the cell to synthesize and transport tyrosine and tryptophan and resistance to the action of the studied substance. Moreover, antioxidants could reduce SOV4 toxicity only if Tyr and Trp biosynthetic pathway is functional. This demonstrates a connection between deficiency of aromatic amino acids and oxidative stress, and according to the literature, this relationship may play a significant role when cells are exposed to a wide range of stress conditions.

Keywords: antifungal agents, cell death, oxidative stress, aromatic amino acids.

Варфоломеева Лариса Александровна

аспирант ФИЦ Биотехнологии РАН 3 года обучения

профиль 1.5.4 Биохимия

e-mail: l.varfolomeeva@fbras.ru

Научный руководитель

Бойко Константин Михайлович

кандидат биологических наук

с.н.с. лаборатории инженерной энзимологии



ИЗУЧЕНИЕ МЕХАНИЗМА ДЕЙСТВИЯ ТИОЦИАНАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ МЕТОДОМ РЕНТГЕНОСТРУКТУРНОГО АНАЛИЗА

Аннотация. Тиоцианатдегидрогеназа (TcDH) осуществляет деградацию тиоцианата по «цианатному» пути с образованием цианата и элементной серы и переносом электронов на акцептор. Активный центр TcDH содержит уникальный трехъядерный медный центр. Были определены структуры апоформы фермента из бактерии *Hydrogenophila bacterium* (hbTcDH) и комплекса фермента с аналогом субстрата селеноцианатом (SeCN⁻). Для установления состояний окисления ионов меди активного центра hbTcDH были получены спектры электронного парамагнитного резонанса (ЭПР) свободного фермента и комплекса с субстратом. Полученные данные позволили уточнить некоторые детали механизма функционирования фермента

Ключевые слова: тиоцианатдегидрогеназа, трехъядерный медный кластер, комплекс с селеноцианатом, рентгеноструктурный анализ, ЭПР-спектроскопия, кристалл

Тиоцианат (SCN⁻) может служить одновременным источником азота и энергии для галоакцилофильной бактерии *Thioalkalivibrio paradoxus* Arh1. Превращение SCN⁻ в цианат (CNO⁻) и элементную серу (S⁰) с переносом двух электронов на акцептор катализирует медьсодержащий фермент – тиоцианатадегидрогеназа (tpTcDH). Гомологи данного фермента были обнаружены и у других микроорганизмов. Для гомолога из *Hydrogenophila bacterium* (hbTcDH) были установлены пространственные структуры атомного разрешения для свободного фермента и его комплекса с ингибитором - тиомочевинной. В обеих структурах димер hbTcDH асимметричен: у одной субъединицы субстратный канал закрыт подвижной петлей (“закрытая” конформация), у второй - открыт (“открытая” конформация). Высокое разрешение позволило охарактеризовать тонкую структуру трехъядерного медного центра hbTcDH (Cu1, Cu2, Cu3) и его перестройку при изменении конформации фермента и связывании ингибитора. В то же время некоторые детали функционирования фермента оставались неясными, в частности, причина асимметрии димера фермента в кристалле и изменение степеней окисления ионов меди активного центра hbTcDH в процессе каталитической реакции.

Структура hbTcDH с полным трехъядерным медным центром (холоформа) была получена нами ранее методом активации рекомбинантного препарата апоформы фермента избытком ионов меди. Для выяснения причины асимметрии димера были получены кристаллы апоформы hbTcDH в кристаллизационных условиях, аналогичных таковым для кристаллов холоформы. Полученные кристаллы апоформы принадлежали другой пространственной группе - C222₁, а субъединицы белка находились исключительно в “закрытой” конформации. Таким образом, присутствие в активном центре ионов меди влияет на конформацию субъединиц и упаковку молекул белка в кристалле.

Далее были получены структуры hbTcDH с аналогом субстрата - селеноцианатом (SeCN⁻). SeCN⁻ был обнаружен в активном центре обеих субъединиц димера hbTcDH, находящихся как в “закрытой”,

так и в “открытой” конформациях. Интересно, что в субъединице в “закрытой” конформации находится молекула SeCN^- . В то время как в субъединице в “открытой” конформации располагается только один атом селена, положение которого однозначно определено по его аномальному сигналу. По полученным данным можно предположить ориентацию молекулы субстрата SCN^- при связывании в активном центре фермента.

Для исследования динамики изменения степени окисления каждого из трех ионов меди активного центра в ходе связывания субстрата и каталитической реакции были получены ЭПР-спектры холоформы hbTcDH . ЭПР-спектр свободной холоформы hbTcDH был идентичен спектру свободной холоформы tpTcDH и может быть описан как спектр с тремя сигналами от трех не взаимодействующих ионов меди Cu^{2+} . При инкубировании hbTcDH с 1 мМ SCN^- в отсутствие акцептора электронов происходит уменьшение интенсивности ЭПР-спектра во времени, что связано, вероятно, с частичным восстановлением ионов меди активного центра до состояния +1. Тем не менее, однозначно соотнести ЭПР-сигнал и соответствующий ему ион меди активного центра представляется затруднительным. Планируется получить и определить структуры рекомбинантных форм hbTcDH с точечными мутациями, препятствующими связыванию определенных ионов меди активного центра, что должно облегчить интерпретацию ЭПР-спектров.

Основные выводы. Димер апоформы hbTcDH (без связанных ионов меди в активном центре) симметричен: оба мономера находятся в “закрытой” конформации. Присутствие ионов меди в активном центре hbTcDH влияет на упаковку молекул hbTcDH в кристалле и на конформацию субъединиц. Установлена структура комплекса hbTcDH с аналогом субстрата SeCN^- . Молекула лиганда обнаружена только в субъединице hbTcDH , находящейся в “закрытой” конформации. ЭПР-спектр свободной холоформы hbTcDH соответствует ЭПР-спектру от трех не взаимодействующих ионов Cu^{2+} и идентичен ЭПР-спектру свободной холоформы гомологичного фермента из tpTcDH из бактерии *Thioalkalivibrio paradoxus* Arh1. Инкубирование холоформы hbTcDH с 1 мМ SCN^- в отсутствие акцептора электронов характеризуется уменьшением интенсивности ЭПР-спектров во времени.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИИ ПО ТЕМЕ РАБОТЫ

Статьи

1. Khrenova M.G., Soloveva A.Yu., Varfolomeeva L.A., Tikhonova T.V., Popov V.O. The O to S substitution in urea brings inhibition activity against thiocyanate dehydrogenase // *Mendelev Communication*. – 2021. – Vol. 31(3). – P. 373-375.
2. Varfolomeeva L.A., Solovieva A.Yu., Shipkov N.S., Kulikova O.G., Dergousova N.I., Rakitina T.V., Boyko K.M., Tikhonova T.V., Popov V.O. Probing the Role of a Conserved Phenylalanine in the Active Site of Thiocyanate Dehydrogenase // *Crystals*. – 2022. Vol. 12. – P. 1787.

Тезисы

1. Варфоломеева Л.А., Поляков К.М., Комолов А.С., Ракитина Т.В., Бойко К.М., Тихонова Т.В., Попов В.О. Модификация поверхностных остатков тиоцианатдегидрогеназы (ТCDH) предотвращает двойникование кристаллов фермента // Сборник тезисов «XXXIII Зимняя молодежная научная школа «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии» (Москва, 8–11 февраля 2021 г., ИБХ РАН). – 2021. – С. 8 (тезисы и стендовый доклад).
2. Варфоломеева Л.А., Бойко К.М. Изучение механизма реакции тиоцианатдегидрогеназы методом рентгеноструктурного анализа // Сборник тезисов отчетной конференции аспирантов ФИЦ Биотехнологии РАН. Москва, 21–25 июня 2021 г. / под ред. В.О. Попова, А.Н. Фёдорова; сост. Е.С. Титова. – М.: ВАШ ФОРМАТ. – 2021. – С. 44–47 (тезисы и устный доклад).
3. Варфоломеева Л.А., Поляков К.М., Шипков Н.С., Дергусова Н.И., Бойко К.М., Тихонова Т.В., Попов В.О. Перестройки медного кластера тиоцианатдегидрогеназы из *Hydrogenophila bacterium* в процессе каталитической реакции на основе рентгеноструктурных данных с атомным разрешением // Сборник тезисов «XXXIV Зимняя молодежная научная школа «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии» (Москва, 8–11 февраля 2022 г., ИБХ РАН). – 2022. – С. 13 (тезисы и устный доклад).

4. Варфоломеева Л.А., Бойко К.М. Изучение механизма реакции тиоцианатдегидрогеназы методом рентгеноструктурного анализа // Сборник тезисов отчётной конференции аспирантов ФИЦ Биотехнологии РАН. Москва, 23–30 июня 2022 г. / под ред. В.О. Попова, А.Н. Фёдорова; сост. Е.С. Титова, С.В. Соловьева. – М.: ВАШ ФОРМАТ. – 2022. – С. 59–63 (тезисы и устный доклад).

5. Варфоломеева Л.А., Поляков К.М., Цаллагов С.И., Шабалин И.Г., Хренова М.Г., Бойко К.М., Ракитина Т.В., Хаген В.Р., Тихонова Т.В., Попов В.О. Новый медь-содержащий фермент тиоцианатдесульфуразы – от структурных исследований к механизму действия // Сборник тезисов “III Объединенный научный форум физиологов, биохимиков и молекулярных биологов. VII Съезд биохимиков России. X Российский симпозиум «белки и пептиды». VII Съезд физиологов СНГ” (Сочи – Дагомыс, 3–8 октября 2021 г.) – 2022. – Т II. – С. 122 (тезисы и устный доклад).

6. Варфоломеева Л.А., Соловьева А.Ю., Шипков Н.С., Дергоусова Н.И., Ракитина Т.В., Бойко К.М., Тихонова Т.В., Попов В.О. Консервативный остаток f436 не участвует в сборке медного кластера активного центра, но стабилизирует конформацию последнего в тиоцианатдегидрогеназе // Сборник тезисов «Актуальные аспекты современной микробиологии XIII молодежная школа-конференция с международным участием. Сателлитная конференция для молодых ученых «Современная структурная биология» (Москва, 16–18 ноября 2022 г.). – М. – 2022. – С. 48-49 (тезисы и постерный доклад).

ОСНОВНЫЕ ДОСТИЖЕНИЯ

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

Varfolomeeva Larisa Aleksandrovna

RESEARCH CENTER OF BIOTECHNOLOGY RAS STUDY OF THE MECHANISM OF THE ACTION OF THIOCYANATE DEHYDROGENASE BY THE METHOD OF X-RAY ANALYSIS

Abstract. Thiocyanate dehydrogenase (TcDH) degrades thiocyanate through the “cyanate” pathway with formation of cyanate and elemental sulfur and electron transfer to an acceptor. TcDH contains a unique trinuclear copper center. In this work we structurally studied the apo-form of the TcDH from *Hydrogenophilia bacterium* (hbTcDH) as well as its complex with a substrate analogue - selenocyanate (SeCN⁻). To study oxidation states of the copper ions of the hbTcDH active center we further utilized electron paramagnetic resonance (EPR) for free enzyme and its complex with a substrate. The obtained results shed light on details of the enzyme’s molecular mechanism.

Keywords: thiocyanate dehydrogenase, trinuclear copper cluster, complex with selenocyanate, X-ray diffraction analysis, EPR spectroscopy, crystal.

Захарычева Алиса Павловна

аспирант ФИЦ Биотехнологии РАН 3 года обучения

профиль 1.5.11 Микробиология

e-mail: alice-keytown@ya.ru

Научный руководитель

Хижняк Татьяна Владимировна

доктор биологических наук,

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

микроорганизмов



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

Аннотация. В промышленной биотехнологии активно используются различные ферменты из мезофильных микроорганизмов в производственных процессах. Однако, в настоящее время наблюдается нехватка специфических ферментов устойчивых к экстремальным условиям. Галоархеи могут стать источником экстремозимов с интересными свойствами. Ген гликозидазы из семейства GH5, полученный из новой галоархеи *Natronobiforma cellulositropha* AArce15, был клонирован в двух различных микроорганизмах: бактериальном и архейном. Подбирается способ очистки рекомбинантных гликозидаз с сохранением активности фермента.

Ключевые слова: гиперсолёная среда, галоархеи, гидролитические ферменты, гликозидаза

В промышленности биотехнологии наиболее активно используют класс гидролитических ферментов (или гидролаз): на них приходится 75% всех производимых ферментов. Большинство ферментов получают из небольшого количества мезофильных видов грибов, бактерий и дрожжей, поэтому они оптимально работают в узких диапазонах физических и химических условий. Они часто ингибируются в экстремальных условиях промышленных процессов, которые осуществляются, например, при высоких и низких температурах, при кислых или щелочных значениях pH, при повышенной солёности. В связи с этим возникла потребность в поиске новых ферментов со специфическими свойствами [1, 2].

Гиперсолёные среды являются интересными объектами для изучения и поиска новых экстремофильных микроорганизмов, которые могут стать источником ферментов (экстремозимов) с новыми свойствами. Несмотря на осмотический и тепловой стресс, в этих средах обитает значительное микробное разнообразие с преобладанием архей и бактерий. Галофильные археи относятся к классу *Halobacteria*. Большинство представителей галоархей относятся к экстремальным галофилам – оптимальный рост клеток наблюдается при 2.5–5 М соли. Для жизни в условиях осмотического стресса галоархеи используют стратегию “salt-in”, т. е. концентрация ионов калия и хлорида внутри клетки аналогична ионному составу окружающей среды. Белки внутри клеток галоархей остаются функциональными и в нативной форме благодаря увеличению кислотных остатков на поверхности белка, уменьшению количества гидрофобных остатков, а также наличию дополнительных пептидных вставок с кислыми аминокислотами [3].

Цель исследования – изучение гидролитических ферментов гликозидаз на примере целлюлаз экстремально галоалкалофильной археи *Natronobiforma cellulositropha* AArce15 [4]. В задачи

третьего года входили продолжение исследования рекомбинантной целлюлазы (ID 2642502327) из клонов *Escherichia coli* 6-3_1 (плазмида pET-46 Ek/LIC, His6-таг) и *Haloferax volcanii* 3-2_1 (плазмида pTA1392, Strep-таг) и получение чистого гомогенного ферментного препарата.

Предварительно разделяли смесь растворимых белков *E. coli* и *H. volcanii* в ПААГ, далее идентифицировали целевой белок при помощи метода MALDI. Теоретическая масса рекомбинантного белка должна была составлять 106,6 kDa, однако после сверхэкспрессии доминирующая полоса была обнаружена на уровне 150 kDa. Для последующего подтверждения, что именно эта фракция содержит целевой белок, образцы полос геля *E. coli* и *H. volcanii* были отданы на идентификацию MALDI. Анализ показал, что в образце из *E. coli* 6-3_1 присутствует целевой белок; в образцах *H. volcanii* 3-2_1 идентифицировать целлюлазу не удалось – были обнаружены белки только самого трансформанта. Для того, чтобы убедиться, что гидролитической активностью обладает рекомбинантный белок, а не ферменты *H. volcanii*, была измерена активность в исходном лизате клонов *H. volcanii* 3-2_1 и *H. volcanii* без плазмиды (отрицательный контроль) после сверхэкспрессии. В отрицательном контроле активность отсутствовала, следовательно, за разложение субстратов отвечает рекомбинантная эндоглюканаза.

Второй задачей была очистка рекомбинантных ферментов при помощи хроматографии на подходящих колонках. Плазмида в *H. volcanii* 3-2_1 была сконструирована со Strep-тагом, который позволяет чистить целевые белки на стрептавидиновой колонке. В работе использовали 1 мл колонку HiTrap Streptavidin HP (Cytiva) на хроматографе низкого давления Äktastart (GE Healthcare). Клеточный лизат элюировали восходящим градиентом от буфера А (20 mM фосфатного буфера pH 7.5, 2 M NaCl) к буферу В (2 M NaCl, 6 M гуанидин-хлорида, pH 5.0) с последовательным отбором фракций. Фракции, содержащие наибольшее количество белка объединяли, затем ультрафильтровали с заменой буфера на фосфатный и 2 M NaCl. Однако, гидролитическая активность по отношению к бета-глюкану и лихенану в очищенной сумме фракций не обнаружена. Это может быть связано с необратимой денатурацией целлюлазы при элюировании в буфере с высокой концентрацией гуанидин-гидрохлорида.

Для очистки фермента из *E. coli* 6-3_1 использовали никель-сефарозную колонку, которая обладает сродством к His6-тагу, имеющегося в плазмидной конструкции клона. Данный тип колонки чувствителен к высокому содержанию соли (макс. до 1 M NaCl), а рекомбинантный белок, предположительно чувствителен к низкому, поэтому предварительно перед чисткой была измерена активность фермента в лизис буфере с разным содержанием NaCl (0, 150, 250, 350, 500 mM, 1, 1.5, 2 M). Клетки разрушали при помощи ультразвука в буфере, содержащем 50 mM Tris-HCl pH 7.5, 0-2 M NaCl, 20 mM имидазола и 1 mM PMSF. Перед измерением активности фермент в течение суток инкубировали в лизис буфере в холодильнике при t=14 °C. В результате обнаружено, что при любой концентрации соли фермент сохраняет свою активность. Следовательно, можно использовать низкую концентрацию (<1M) соли в системе для очистки эндоглюканазы на данной колонке.

Далее, в задаче по очистке эндоглюканазы из *E. coli* 6-3_1 использовали 5 мл колонку HisTrap High Performance (GE Healthcare) на хроматографе низкого давления Äktapure (GE Healthcare). Лизат элюировали восходящим градиентом от буфера А (0.5 M NaCl, 50 mM Tris-HCl pH 7.5, 5 mM имидазола) к буферу В (0.5 M NaCl, 50 mM Tris-HCl pH 7.5, 200 mM имидазола). В процессе элюирования последовательно собирали фракции по 5 мл, после чего проводили электрофорез в ПААГ для подтверждения чистоты. Электрофоретический анализ показал, что после очистки на колонке присутствует как целевой белок, так и белки *E. coli* во всех фракциях, поэтому считаем, что нет специфического связывания нужного фермента с носителем колонки.

Было решено заменить способ очистки фермента - вместо металл-аффинной на анионно-обменную хроматографию. Использовали 5 мл колонку HiTrapQFF (Cytiva), принцип связывания с которой основан на белковом заряде. В процессе элюирования (восходящий градиент – от 150 mM NaCl до 1 M NaCl) были отобраны 20 фракций по 5 мл. Последующее электрофоретическое разделение в ПААГ показало, что целевой белок может находиться в фракциях с 1 по 15. Была проверена ферментная активность этих фракций в буфере с бета-глюканом (инкубация в течение 24 ч при t=37 °C). Активность обнаружена в 3 и 4 фракциях.

Основные выводы. В отличие от расчетных величин рекомбинантная целлюлаза из *E. coli*

6-3_1 обладает массой ~150 kDa (определено разделением в ПААГ); не удалось идентифицировать и определить массу эндоглюканазы из клона *H. volcanii* 3-2_1.

Обнаружено, что после очистки фермента из клона *H. volcanii* 3-2_1 на стрептавидиновой колонке, эндоглюканаза необратимо теряет свою активность из-за денатурирующих свойств гуанидин-гидрохлорида, который присутствует в буфере для элюирования.

Показано, что при очистке фермента из клона *E. coli* при помощи металл-аффинной хроматографии происходит неспецифическое связывание белков и, следовательно, данный способ не подходит для эффективной очистки ферментного препарата. При использовании анионно-обменной хроматографии удалось очистить эндоглюканазу из клона *E. coli* 6-3_1 с сохранением активности фермента.

ЛИТЕРАТУРА

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

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ РАБОТЫ:

Тезисы

1. Захарычева А.П., Хижняк Т.В. Рекомбинантные целлюлазы экстремально галоалкалофильной археи *Natronobiforma cellulositropha* // Актуальные аспекты современной микробиологии, XIII молодежная школа-конференция с международным участием, Институт микробиологии им. С.Н. Виноградского, ФИЦ Биотехнологии РАН, Москва, 16-18 ноября 2022 г. – 2022. – С. 79–81. – М: ВАШ ФОРМАТ. – ISBN: 978-5-00147-435-7 (тезисы).
2. Захарычева А.П. Изучение гидролитических ферментов экстремально галофильной археи *Natronobiforma cellulositropha* // Сборник тезисов ежегодной отчетной конференции аспирантов Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук», Москва, 23-30 июня 2022 г. – С. 157–164. – М: ВАШ ФОРМАТ. – ISBN: 978-5-00147-399-2 (тезисы и устный доклад).
3. Захарычева А.П., Хижняк Т.В., Ельченинов А.Г. Новые экстремально гало(алкало)фильные гидролитические энзимы археи гиперсоленых озер // 3-й Российский микробиологический конгресс (Псков, 26 сентября - 1 октября 2021 г.): материалы конгресса. – 2021. – С. 185–186. – ООО «Конкорд». – ISBN: 978-5-6046553-7-5 (тезисы и постерный доклад).
4. Захарычева А.П. Экстремально гало(алкало)фильные гидролитические энзимы археи гиперсоленых озер // Сборник тезисов ежегодной отчетной конференции аспирантов Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук», Москва, 21-25 июня 2021 г. – С. 151–156. – М: ВАШ ФОРМАТ. – ISBN: 978-5-00147-303-9.

**RESEARCH CENTRE OF BIOTECHNOLOGY RAS
HYDROLYTIC ENZYMES STUDY FROM THE EXTREMELY
HALOALKALOPHILIC ARCHAEA *NATRONOBIFORMA CELLULOSITROPHA***

Abstract. Industrial biotechnology makes extensive use of various enzymes from mesophilic microorganisms in production processes. However, there is currently a shortage of specific enzymes resistant to extreme conditions. Haloarchaea can be a source of extremozymes with interesting properties. The GH5 family glycosidase gene derived from the novel haloarchaea *Natronobiforma cellulositropha* AArce15 has been successfully cloned in two different organisms, *Escherichia coli* and *Haloferax volcanii*. The purification method for each enzyme is selected.

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

Работа выполнена при поддержке РФФИ (грант № 20-14-00250).

Кривицкая Александра Вячеславовна

аспирант ФИЦ Биотехнологии РАН 3 года обучения

профиль 1.5.4 Биохимия

e-mail: al_krivickaya@mail.ru

Научный руководитель

Хренова Мария Григорьевна

доктор физико-математических наук, профессор РАН,

руководитель группы молекулярного моделирования



ЭВОЛЮЦИЯ МЕХАНИЗМА ИНГИБИРОВАНИЯ ПЕНИЦИЛЛИН-СВЯЗЫВАЮЩЕГО БЕЛКА 2 ИЗ *NEISSERIA GONORRHOEA* АНТИБИОТИКОМ ЦЕФТРИАКСОНОМ

Аннотация. В данной работе рассмотрены механизмические аспекты эволюции реакции ингибирования пенициллин-связывающего белка 2 (PBP2) из *Neisseria Gonorrhoeae* антибиотиком цефтриаксоном методами молекулярного моделирования. Комбинированными методами квантовой механики/молекулярной механики описан эффект активации субстрата ферментом, установлены молекулярные механизмы реакций в активных центрах вариантов PBP2. Методом классической молекулярной динамики проанализированы конформационные перестройки в структурах исследуемых ферментов. Показано, что рост резистентности в ряду исследуемых ферментов связан как с изменениями в молекулярном механизме химической реакции в активном центре, так и с понижением сродства к антибиотику, связанному с конформационными перестройками петли $\beta 3$ - $\beta 4$.

Ключевые слова: пенициллин-связывающие белки, PBP2, цефтриаксон, *Neisseria Gonorrhoeae*, бактериальная резистентность, молекулярная динамика, комбинированный метод квантовой механики/молекулярной механики

На долю β -лактамных антибиотиков приходится 70% всех лекарственных средств. Для β -лактамных антибиотиков существует два основных механизма устойчивости. Это модификация мишени и инактивация антибиотиков бактериальными ферментами β -лактамазами. Мишенью для β -лактамных антибиотиков являются пенициллин-связывающие белки, которые ответственны за формирование клеточной стенки бактерий [1]. Из-за внешнего сходства между природным субстратом пенициллин-связывающих белков и β -лактамными антибиотиками, последние могут встраиваться в активный центр транспептидазного домена пенициллин-связывающего белка и образовывать с ним устойчивый ковалентный комплекс. Это приводит к гибели бактериальной клетки. Ингибирование транспептидазного домена пенициллин-связывающих белков используется при лечении различных заболеваний, включая гонорею. В данной работе рассмотрены механизмические аспекты эволюции реакции ингибирования пенициллин-связывающего белка 2 (penicillin-binding protein 2, PBP2) из *Neisseria Gonorrhoeae* антибиотиком цефтриаксоном методами молекулярного моделирования.

Пенициллин-связывающие белки 2 из *Neisseria Gonorrhoeae* являются критически важными ферментами в формировании клеточной стенки бактерий. Антибиотик цефалоспоринового ряда, цефтриаксон — единственный препарат, используемый в настоящее время для лечения гонореи, он встраивается в активный центр PBP2 вместо природного субстрата, необратимо ингибируя фермент за счет образования ковалентного комплекса. Однако известны случаи резистентности PBP2 к этому антибиотику. PBP2 из штамма FA19 не проявляет устойчивость к цефалоспорином, штаммы 35/02 и H041 обладают рядом мутаций, которые позволяют им проявлять устойчивость

к действию антибиотиков. Экспериментальные данные по константам скорости второго порядка (k_2/K_s) демонстрируют, что эффективность ингибирования падает в 150 раз и 2300 раз для 35/02 и H041, соответственно [2]. Для FA19 из литературы известны индивидуальные параметры (k_2 и K_s), но для мутантных форм определить их экспериментально не представляется возможным [3]. Деацилирование комплекса ацил-фермент происходит медленно, поэтому считается, что реакция происходит необратимо. Таким образом, рост резистентности с точки зрения молекулярного механизма связан либо со снижением сродства PBP2 к цефтриаксону, либо со снижением скорости ацилирования.

Молекулярное моделирование механизма реакции ингибирования PBP2 из данных штаммов цефтриаксоном показало, что изменение положение субстрата в активном центре фермента ввиду мутации G545S отражается в формировании оксианионного центра и, как следствие, высоте энергетического барьера первой стадии реакции. Анализ молекулярно-динамических траекторий фермент-субстратных комплексов, в частности электронно-плотностных дескрипторов в отдельных кадрах траекторий, позволил идентифицировать реакционные и нереакционные структуры. Показано, что доля реакционных структур падает с ростом резистентности. Просканирована поверхность энергии Гиббса, определены элементарные стадии реакции. Установлено, что механизм реакции в активном центре PBP2 из штамма дикого типа и мутантных штаммов отличаются: разрыв связи C–N и отрыв фрагмента антибиотика происходит последовательно в белке из штамма дикого типа и одновременно в белках из мутантных штаммов. Новое положение субстрата в каталитическом кармане также влечет за собой изменения сродства к антибиотику. Основываясь на работе [4], была проведена классическая молекулярная динамика апо-формы PBP2 из исследуемых штаммов с последующим применением метода анализа динамических сетей [5]. Анализ конформационных изменений петли $\beta 3$ - $\beta 4$ показал, что ферменту, проявляющему наибольшую резистентность, соответствует плоская малоподвижная петля $\beta 3$ - $\beta 4$. В то время как в PBP2 из штамма дикого типа петля раскрыта и более подвижна.

Основные выводы. Мутация G545S приводит к снижению эффективности активации цефтриаксона ферментом. Разрыв связи C–N и отрыв фрагмента антибиотика в ходе реакции происходит последовательно в белке из штамма дикого типа и одновременно в белках из мутантных штаммов. Анализируя конформационные изменения петли $\beta 3$ - $\beta 4$, показано, что с ростом резистентности сродство PBP2 к цефтриаксону понижается.

ЛИТЕРАТУРА

1. Sauvage E., Kerff F., Terrak M., Ayala J. A., & Charlier P. The penicillin-binding proteins: structure and role in peptidoglycan biosynthesis //FEMS microbiology reviews. – 2008. Vol. – 32. – №. 2. – P. 234-258.
2. Shalaby M. A. W., Dokla E. M., Serya R. A., Abouzid K. A. Penicillin binding protein 2a: An overview and a medicinal chemistry perspective //European Journal of Medicinal Chemistry. – 2020. Vol. – 199. – P. 112312.
3. Singh A., Turner J. M., Tomberg J., Fedarovich A., Unemo M., Nicholas R. A., Davies C. Mutations in penicillin-binding protein 2 from cephalosporin-resistant *Neisseria gonorrhoeae* hinder ceftriaxone acylation by restricting protein dynamics: Crystal structures of PBP2 from ESC-resistant *N. gonorrhoeae* //Journal of Biological Chemistry. – 2020. Vol. – 295. – №. 21. – P. 7529-7543.
4. Tomberg J., Fedarovich A., Vincent L. R., Jerse A. E., Unemo M., Davies C., Nicholas R. A. Alanine 501 mutations in penicillin-binding protein 2 from *Neisseria gonorrhoeae*: structure, mechanism, and effects on cephalosporin resistance and biological fitness //Biochemistry. – 2017. Vol. – 56. – №. 8. – P. 1140-1150.
5. Tomberg J., Unemo M., Ohnishi M., Davies C., Nicholas R. A. Identification of amino acids conferring high-level resistance to expanded-spectrum cephalosporins in the penA gene from *Neisseria gonorrhoeae* strain H041 // Antimicrobial agents and chemotherapy. – 2013. Vol. – 57. – №. 7. – P. 3029-3036.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ РАБОТЫ

Статьи

1. Кривицкая А.В., Хренова М.Г. Молекулярное моделирование активации цефтриаксона в активных центрах пенициллин-связывающих белков 2 // Известия Академии наук. Серия химическая – 2022. № 5. С. 915-920 (переводная версия: Krivitskaya A.V., Khrenova M.G. Molecular modeling of ceftriaxone activation in the active sites of penicillin-binding proteins 2 // Russian Chemical Bulletin – 2022. Vol. – 71. – P. 915–920).
2. Krivitskaya A.V., Khrenova M.G. Evolution of Ceftriaxone Resistance of Penicillin-Binding Proteins 2 Revealed by Molecular Modeling // International Journal of Molecular Sciences – 2023. Vol. – 24. – P. 176.

Тезисы

1. Кривицкая А.В. Механизм и реакция гидролиза имипенема металло-β-лактамазами NDM-1 и L1. Ежегодная отчетная конференция аспирантов Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук» // Сборник тезисов отчётной конференции аспирантов ФИЦ Биотехнологии РАН. (Москва, 21-25 июня 2022 г.) / под ред. В.О. Попова, А.Н. Фёдорова; сост. Е.С. Титова. – М.: ВАШ ФОРМАТ. – 2022. – С. 64-68 (тезисы и устный доклад).
2. Кривицкая А.В. Механизм реакции ингибирования пенициллин-связывающего белка 2 из штаммов FA19, 35/02 и H041 *Nisseria gonorrhoeae* цефтриаксоном. XXII Ежегодная молодежная конференция с международным участием ИБХФ РАН-ВУЗЫ “Биохимическая физика”, Москва, 14-16 ноября 2022 г. (устный доклад).
3. Кривицкая А.В. Эволюция механизмов ингибирования пенициллин-связывающих белков бета-лактамами антибиотиками. Школа-конференция для молодых ученых «Суперпатогены - новый цивилизационный вызов», Сочи, Сириус, 14-15 ноября 2022 г. (устный доклад).
4. Кривицкая А.В., Хренова М.Г. Механизм реакции ингибирования пенициллин-связывающих белков цефтриаксоном. Тридцатая международная конференция математика. Компьютер. Образование, МГУ имени М.В. Ломоносова, Москва, 23-27 января 2023 г. (устный доклад).
5. Кривицкая А.В., Хренова М.Г. Механизм ингибирования пенициллин-связывающего белка 2 из штаммов FA19, 35/02 и H041 *Nisseria gonorrhoeae* цефтриаксоном. XXXV Зимняя молодежная научная школа «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии», Москва, 7-10 февраля 2023 г. (постерный доклад).
6. Кривицкая А.В., Хренова М.Г. Эволюция молекулярного механизма ингибирования пенициллин-связывающих белков цефтриаксоном. 65-я Всероссийская научная конференция МФТИ. В честь 115-летия Л.Д. Ландау, МФТИ, Долгопрудный, 3-8 апреля 2023 г. (устный доклад).
7. Кривицкая А.В., Хренова М.Г. Молекулярные механизмы антибиотикорезистентности, связанные с гидролизом β-лактамов антибиотиков. VII Съезд биофизиков России, Краснодар, 17 -23 апреля 2023 г. (устный доклад).
8. Кривицкая А.В., Хренова М.Г. Определение скорости инактивации цефалоспориновых антибиотиков металло-бета-лактамазами из квантово-химических моделей. Саммит разработчиков лекарственных препаратов «Сириус.Биотех», Сочи, Сириус, 11 -13 мая 2023 г. (устный доклад).

**RESEARCH CENTER OF BIOTECHNOLOGY RAS
EVOLUTION OF THE MECHANISM OF PBP2 INHIBITION FROM
NEISSERIA GONORRHOEAE BY THE ANTIBIOTIC CEFTRIAXONE**

Abstract. This work presents the results of the study of evolution of the mechanism of PBP2 inhibition from *Neisseria Gonorrhoeae* by the antibiotic ceftriaxone by combined quantum mechanics/molecular mechanics approach. The method of molecular dynamics was used to assess the conformational rearrangements of the proteins. The increase in resistance in the PBP2 series is associated both with a change in the molecular mechanism in the active site and with a decrease in affinity for ceftriaxone.

Keywords: penicillin-binding proteins, PBP2, ceftriaxone, *Neisseria Gonorrhoeae*, bacterial resistance, molecular dynamics, combined method of quantum mechanics / molecular mechanics.

Мальцева Анастасия Игоревна

аспирант ФИЦ Биотехнологии РАН 3 года обучения

профиль 1.5.11 Микробиология

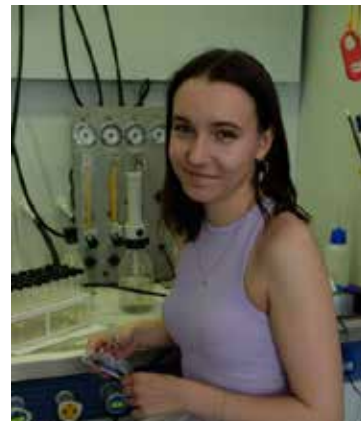
e-mail: an.malts@mail.ru

Научный руководитель

Фролов Евгений Николаевич

кандидат биологических наук,

зав. лабораторией метаболизма экстремофильных прокариот



ИЗУЧЕНИЕ РАЗНООБРАЗИЯ ПУТЕЙ АВТОТРОФНОЙ АССИМИЛЯЦИИ УГЛЕРОДА У ТЕРМОФИЛЬНЫХ ПРОКАРИОТ

Аннотация. В ходе протеомного анализа исследовано влияние внешних факторов среды на вклад трансальдозного варианта цикла Кальвина и пути Вуда-Льюнгдаля в общую ассимиляцию углекислоты у *D. acidiphilus* 3408-1^T. В частности показано, что понижение парциального давления водорода и соответствующее повышение окислительно-восстановительного потенциала среды приводит к увеличению экспрессии генов, кодирующих ферменты трансальдозного варианта цикла Кальвина, в то время как экспрессия генов пути Вуда-Льюнгдаля остаётся неизменной. Кроме того, была продолжена работа по описанию новых изолятов, в ходе которой была дана физиологическая и филогенетическая характеристика штамма 4217-1, являющегося третьим представителем филума *Thermodesulfobiota*.

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

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

На предыдущих этапах выполнения работы для термофильной сульфатредуцирующей бактерии *Desulfothermobacter acidiphilus* 3408-1^T на основании геномного, протеомного и биохимического анализов было показано одновременное функционирование трансальдозного варианта цикла Кальвина и пути Вуда-Льюнгдаля при автотрофном росте в присутствии водорода (донор электронов) и сульфата (акцептор электронов). Результаты были получены в оптимальных для данного микроба условиях роста при 55 °C и pH 4,5. Нами было выдвинуто предположение о том, что вклад каждого пути в общую ассимиляцию углекислоты может зависеть от внешних факторов, таких как температура, pH, парциальное давление газов и окислительно-восстановительный потенциал среды. В ходе протеомного анализа было показано, что значительного изменения экспрессии ключевых генов белков пути Вуда-Льюнгдаля при изменении температуры культивирования не происходило. Для ферментов цикла Кальвина изменение температуры оказывало влияние на экспрессию генов тех ферментов цикла, которые также принимают участие в центральном метаболизме углеводов, но не на экспрессию гена ключевого фермента цикла – РубисКО.

В отчётный период нами было исследовано влияние парциального давления водорода и окислительно-восстановительного потенциала среды на вклад трансальдозазного варианта цикла Кальвина и пути Вуда-Льюнгаля в общую ассимиляцию углекислоты у *D. acidiphilus* 3408-1^T. Важно отметить, данные параметры взаимосвязаны. Так увеличение содержания водорода в газовой фазе приводит к снижению окислительно-восстановительного потенциала среды, а уменьшение содержания водорода – к росту потенциала. В ходе предварительных экспериментов было установлено, что минимальное содержание водорода в газовой фазе, при котором наблюдался устойчивый рост *D. acidiphilus* 3408-1^T, составляло 15%, при этом скорость роста и урожай клеток были минимальными. Увеличение доли водорода с 15 до 40% приводило к увеличению как скорости роста, так и урожая клеток *D. acidiphilus* 3408-1^T, а при содержании водорода в газовой фазе от 40 до 90% ростовые параметры не менялись. Основываясь на полученных результатах биомассу для протеомного анализа, получали при культивировании *D. acidiphilus* 3408-1^T в атмосфере $H_2/CO_2=85/15$, в присутствии которой значение Eh среды было равно -172 мВ, и в атмосфере $H_2/CO_2=15/85$, которой соответствовало Eh -62 мВ. Температура инкубации в обоих вариантах составляла 55 °С, pH 4,5. Анализ протеомных данных показал, что при снижении содержания водорода в газовой фазе и соответствующем увеличении окислительно-восстановительного потенциала достоверного изменения экспрессии генов, кодирующих белки пути Вуда-Льюнгаля, не происходило, несмотря на то, что экспрессия некоторых генов была пониженной. В случае трансальдозазного варианта цикла Кальвина наблюдалось увеличение экспрессии генов, кодирующих ключевые ферменты данного автотрофного пути – РубисКО в 3,7 раза и фосфорибулокиназы в 4,9 раза, а также N-транскетолазы в 3,7 раза. Таким образом, уменьшение парциального давления водорода приводит к увеличению вклада цикла Кальвина в общую ассимиляцию углекислоты. По-видимому, это связано с повышением окислительно-восстановительного потенциала среды, который может оказывать влияние на эффективность работы пути Вуда-Льюнгаля, так как ключевой фермент данного пути, СО дегидрогеназа, для восстановления CO_2 до СО ($E_0' = -520$ мВ) нуждается в низкопотенциальных ферредоксинах, которые в литоавтотрофных условиях могут быть получены только за счет действия бифуркационной гидрогеназы, которая в свою очередь нуждается в высоких концентрациях водорода в среде.

Из пробы термального источника полуострова Камчатка в хемолитоавтотрофных условиях в присутствии водорода и сульфата был выделен третий представитель нового филума *Thermodesulfobiota* – штамм 4217-1. На данный момент в филуме известно два валидно описанных вида: *Thermodesulfobium narugense* и *Thermodesulfobium acidiphilum* [4]. По морфологии клетки нового штамма представляют собой слегка изогнутые палочки размером 1,5-3 мкм в длину и 0,4-0,5 мкм в толщину. Клетки подвижны в экспоненциальной фазе роста за счет одного полярно расположенного жгутика, но теряют подвижность в стационарной фазе. Спорообразование не было обнаружено. Клеточная стенка грамотрицательного типа. Облигатный анаэроб, требующий присутствия сульфида в среде в качестве восстановителя. Штамм 4217-1 рос в диапазоне температур от 7 до 50 °С с оптимумом при 42 °С, в интервале pH 3,0-6,7, с оптимумом 4,3-4,5 и концентрации соли в среде до 1% процента. Новый изолят оптимально рос в хемолитоавтотрофных условиях в присутствии сульфата в качестве акцептора электронов, водорода в качестве донора электронов и CO_2 в качестве источника углерода. Конечным продуктом метаболизма являлся сульфид. В качестве альтернативного донора электронов штамм 4217-1 использовал фумарат, а альтернативного акцептора электронов - тиосульфат. В отличие от ранее описанных видов филума *Thermodesulfobiota* штамм 4217-1 не рос в присутствии формиата как донора электронов. Последовательность гена 16S рРНК нового изолята имела сходство 98,09% с гомологичной последовательностью *Thermodesulfobium acidiphilum* и 98,37% с *Thermodesulfobium narugense*, для которых ранее было показано функционирование трансальдозазного варианта цикла Кальвина [5]. На основании приведенных результатов и филогенетического анализа штамм 4217-1 предположительно является представителем нового вида.

Основные выводы. Снижение парциального давления водорода и соответствующий этому рост окислительно-восстановительного потенциала среды в хемолитоавтотрофных условиях

приводит к увеличению экспрессии генов, кодирующих ферменты трансальдозного варианта цикла Кальвина у *D. acidiphilus* 3408-1^T.

Достоверного изменения экспрессии генов, кодирующих белки пути Вуда-Льюнгаля, при снижении парциального давления водорода и соответствующем росте окислительно-восстановительного потенциала среды в хемолитоавтотрофных условиях у *D. acidiphilus* 3408-1^T не происходит.

Дана фенотипическая и физиологическая характеристика *Thermodesulfobium* sp. штамм 4217-1, который предположительно является представителем нового третьего вида филума *Thermodesulfobiota*.

ЛИТЕРАТУРА

1. Berg I. A. Ecological aspects of the distribution of different autotrophic CO₂ fixation pathways // Applied and Environment Microbiology. – 2011. – Vol. 77. – P. 1925-36.
2. Nunoura T., Chikaraishi Y., Izaki R., Suwa T., Sato T., Harada T., Mori K., Kato Y., Miyazaki M., Shimamura S., Yanagawa K., Shuto A., Ohkouchi N., Fujita N., Takaki Y., Atomi H., Takai K. A primordial and reversible TCA cycle in a facultatively chemolithoautotrophic thermophile // Science. – 2018. – Vol. 359. – P. 559-563.
3. Song Y., Lee J.S., Shin J., Lee G.M., Jin S., Kang S., Lee J.K., Kim D.R., Lee E.Y., Kim S.C., Cho S., Kim D., Cho B.K. Functional cooperation of the glycine synthase-reductase and Wood-Ljungdahl pathways for autotrophic growth of *Clostridium drakei* // Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A. – 2020. Vol. – 117. – P. 7516-7523.
4. Frolov E.N., Lebedinsky A.V., Elcheninov A.G., Kublanov I.V. Taxonomic proposal for a deep branching bacterial phylogenetic lineage: transfer of the family Thermodesulfobiaceae to Thermodesulfobiales ord. nov., Thermodesulfobiia classis nov. and Thermodesulfobiota phyl. nov // Syst Appl Microbiol. – 2023. – Vol. 46(1). – P. 126388.
5. Frolov E.N., Kublanov I.V., Toshchakov S.V., Lunev E.A., Pimenov N.V., Bonch-Osmolovskaya E.A., Lebedinsky A.V., Chernyh N.A. Form III RubisCO-mediated transaldolase variant of the Calvin cycle in a chemolithoautotrophic bacterium // Proc Natl Acad Sci U.S.A. – 2019. Vol. – 116(37). – P. 18638-18646.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ РАБОТЫ

Статьи

1. Frolov E.N., Maltseva A.I., Elcheninov A.G., Kublanov I.V. Draft Genome Sequence of *Pyrobaculum* sp. Strain 3827-6, a Hyperthermophilic Crenarchaeon, Isolated from a Kamchatka Hot Spring // Microbiol Resour Announc. – 2023. – Vol. 12(1):e0115922.

Тезисы

1. Мальцева А.И. Изучение разнообразия путей автотрофной ассимиляции углерода у термофильных прокариот // Сборник тезисов ежегодной отчетной конференции аспирантов федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук». (Москва, 21-25 июня 2021 г.) / под ред. В.О. Попова, А.Н.Фёдорова; сост. Е.С. Титова. – М.: ВАШ ФОРМАТ. – 2021. – С. 157-162 (тезисы и устный доклад).
2. Мальцева А.И., Лебединский А.В., Кубланов И.В., Фролов Е.Н. Первый автотрофный представитель рода *Thermodesulfovibrio* // 3-й Российский Микробиологический конгресс (Псков, 26 сентября – 1 октября 2021 г.) / Псков: ООО «Конкорд». – 2021. – С. 227 (стендовый доклад).
3. Мальцева А.И. Изучение разнообразия путей автотрофной ассимиляции углерода у термофильных прокариот // Сборник тезисов ежегодной отчетной конференции аспирантов Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук». (Москва, 23-30 июня 2022 г.) / под ред. В.О. Попова, А.Н.Фёдорова; сост. Е.С. Титова. – М.: ВАШ ФОРМАТ. – 2022. – С. 165 (тезисы и устный доклад).

4. Мальцева А.И., Ельченинов А.Г., Кубланов И.В., Фролов Е.Н.. Одновременное функционирование двух путей автотрофной ассимиляции углерода у термофильной бактерии *Desulfothermobacter acidiphilus* // Актуальные аспекты современной микробиологии: материалы XIII молодежной школы-конференции с международным участием, Москва, 16-18 ноября 2022 г. – Москва, 2022. – С. 160 (стендовый доклад).

5. Фролов Е.Н., Мальцева А.И., Черных Н.А., Лебединский А.В., Кубланов И.В. Распространение трансальдозного варианта цикла Кальвина у термофильных прокариот // 3-й Российский микробиологический конгресс (Псков, 26 сентября – 1 октября 2021 г.). – Псков: ООО «Конкорд». – 2021. – С. 82 (устный доклад).

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

ОСНОВНЫЕ ДОСТИЖЕНИЯ, ПАТЕНТЫ

Диплом второй степени за лучший стендовый доклад на XIII Молодежной школе-конференции с международным участием «Актуальные аспекты современной микробиологии», 2022 г.

Maltseva Anastasia Igorevna

RESEARCH CENTER OF BIOTECHNOLOGY RAS

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

Abstract. A proteomic analysis investigated the influence of environmental external factors on the contribution of the transaldolase variant of the Calvin cycle and the Wood-Ljungdahl pathway to the total carbon dioxide assimilation in *D. acidiphilus* 3408-1^T. In particular, it was shown that a decrease in the partial pressure of hydrogen and a corresponding increase in the redox potential of the medium leads to an increase in the gene expression of the transaldolase variant of the Calvin cycle, while the expression of the Wood-Ljungdahl pathway enzymes remained unchanged. In addition, characterization work of new isolates was continued, during which the physiological and phylogenetic characterization of strain 4217-1, which is the third representative of the phylum Thermodesulfobiota, was carried out.

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

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

Нежданова Анна Владимировна

аспирант ФИЦ Биотехнологии РАН 3 года обучения

профиль 1.5.6 Биотехнология

e-mail: anna-negdanova@mail.ru

Научный руководитель

Щенникова Анна Владимировна

кандидат химических наук,

с.н.с. лаборатории системной биологии растений



MADS-ДОМЕННЫЕ ФАКТОРЫ ТРАНСКРИПЦИИ УЧАСТВУЮТ В РЕГУЛЯЦИИ БИОСИНТЕЗА КАРОТИНОИДОВ В ФОТОСИНТЕЗИРУЮЩЕЙ ТКАНИ *NICOTIANA TABACUM* L.

Аннотация. Транскрипционные факторы семейства *MADS-box* играют важные роли в развитии и адаптации растения, которые тесно связаны с биосинтезом каротиноидов, необходимых для фотосинтеза и фотозащиты. Продукты каротиногенеза стриголактоны и абсцизовая кислота вовлечены в регуляцию роста, развития и ответа на стрессы растения. В данной работе получены линии *Nicotiana tabacum* L. с CRISPR-Cas9-нокаутом гена фитоиндесатуразы *PDS*, осуществляющей первую модификацию предшественника каротиноидов. Растения отличались от контроля временем зацветания и мозаичной бело-зеленой окраской листьев за счет снижения содержания каротиноидов. Линии с поздним сроком цветения характеризовались ростом экспрессии *NtPDS* и снижением экспрессии *MADS-box* гена *NtSEP1*, предположительно участвующего в регуляции транскрипции генов биосинтеза каротиноидов у табака.

Ключевые слова: CRISPR/Cas9 геномное редактирование; *Nicotiana tabacum* L.; биосинтез каротиноидов; фитоиндесатураза *PDS*; *MADS-box* транскрипционные факторы

Среди метаболитов, синтезируемых растениями, важное место занимают каротиноиды, которые участвуют в окраске цветков и плодов, привлекая насекомых и животных для опыления и распространения семян, и незаменимы для фотосинтеза, фотозащиты, роста, развития и стрессовой реакции [1]. Побочными продуктами каротиногенеза являются фитогормоны стриголактоны и абсцизовая кислота (АБК), опосредующие сигнальные пути многих процессов онтогенеза, включая ответ на стрессы [2]. Подавление биосинтеза каротиноидов приводит к серьезным нарушениям развития растения.

Один из ключевых ферментов биосинтеза каротиноидов, фитоиндесатураза (*PDS*), катализирует первую фазу десатурации 15-*цис*-фитоина (предшественника всех каротиноидов). Суперэкспрессия гена *PDS* способствует росту содержания α - и β -каротинов, тогда как отсутствие активности *PDS* приводит к накоплению бесцветного фитоина, нарушению фотосинтеза и альбиносности листьев [3]. Эффект «отбеливания» в норме зеленой фотосинтезирующей ткани при ингибировании активности позволило исследователям использовать *PDS* в качестве репортерного гена для оценки эффективности CRISPR-Cas9-редактирования генома растений [4].

Известно, что в регуляции транскрипции многих генов каротиногенеза принимают участие *MADS*-доменные транскрипционные факторы (ТФ), в частности, ТФ *MADS-RIN* [5]. Ген *PDS* не входит в опубликованный список мишеней *MADS-RIN*. Однако замалчивание гена сопровождается не только сокращением количества каротиноидов в плодах томата, но и снижением экспрессии гена *MADS-RIN* и генов-мишеней *MADS-RIN* [3].

В данном исследовании мы использовали систему CRISPR-Cas9 для нокаута гена *PDS* в гено-

ме табака *Nicotiana tabacum* L. (сорт Самсун) с целью изучения адаптационного ответа растения, включая возможное изменение активности других генов каротиногенеза, а также MADS-box генов, кодирующих гомологи ТФ MADS-RIN.

С помощью программ CRISPRdirect и CRISPR MultiTargeter была проанализирована последовательность *NtPDS* и определен консервативный участок экзона II (GAGATTGTTATTGCTGGTGCAGG), пригодный в качестве гидовой РНК. На основе этого была получена конструкция pYLCRISPR/Cas9P35S-N, содержащая *NtPDSgRNA*, которую ввели в штамм агробактерии AGL0 и использовали для трансформации листовых эксплантов табака с последующей селекцией регенерантов на среде, содержащей канамицин (100 мг/л). Устойчивость к антибиотику (укоренение побегов) и наличие альбиносных участков на поверхности листа свидетельствовали о событии трансгенеза и нокаута гена, соответственно. Большинство регенерантов с признаками редактирования погибли (из-за почти 90-100% альбиносности). Из полученных 27 жизнеспособных линий 18 формировали зеленые листья и девять – мозаично альбиносные (зеленые с белыми пятнами). Кроме того, линии отличались от контроля по времени цветения и другим морфологическим признакам.

Анализ целевого сайта *NtPDS* в геноме трансгенных линий (клонирование и секвенирование) обнаружил различные варианты случайных мутаций (однонуклеотидные замены (SNP) и индели). Обнаруженные SNPs, синонимичный t351→с и несинонимичный t341→с (нейтральное замещение аминокислотного остатка V114→A), соответствуют аминокислотным остаткам (а. о.) в N-концевой области функционального домена PLN02612 белка (локализация 21–578 а. о.). Однонуклеотидные индели со сдвигом рамки считывания на 3'-конце экзона II гена *NtPDS* были детектированы у 30% трансгенных линий табака с мозаичным фенотипом. Было обнаружено, что в результате инделей образуются преждевременные стоп-кодоны и, как следствие, значительно укороченные варианты белка: 154 (350^351→ins^g# и 350^351→ins^t#) и 144 (t351→del(1nt)#) аминокислотных остатка при исходном размере *NtPDS* 582 а. о.

Учитывая, что индели в последовательности гена *NtPDS* вызвали заметные изменения морфологии трансгенных растений, включая пигментацию фотосинтезирующей ткани, можно предположить, что они являются результатом нарушения биосинтеза каротиноидов. Для подтверждения был проведен сравнительный анализ содержания каротиноидов (сумма), хлорофиллов (а и б) и антоцианов (сумма) в листьях табака дикого типа (WT) и двух позднецветущих линий L28 и L29. В результате было показано, что в сравнении с контролем количество каротиноидов и хлорофиллов в отредактированных линиях уменьшилось в среднем в ~1.5 раза, тогда как содержание антоцианов не изменилось.

С учетом химерности редактирования полученных линий L28 и L29 была проведена оценка экспрессии гена *NtPDS*, а также других генов каротиногенеза (*NtPSY2*, *NtCrtISO*, *NtZDS*, *NtLCYE* и *NtVDE*) в листьях. В результате было показано, что в сравнении с контролем экспрессия *NtPDS* у линий L28 и L29 снизилась в ~3.5-4.0 раза, в то время как уровень транскриптов остальных анализируемых генов (кроме *NtLCYE*) значительно вырос – от ~1.5 (*NtPSY2*) до ~20.0 (*NtVDE*) раз.

Поскольку рост уровня транскриптов генов каротиногенеза может происходить благодаря MADS-доменным ТФ [5], мы провели оценку влияния изменений в каротиногенезе отредактированных растений на экспрессию MADS-box генов *NtSEP1*, *NtSEP2*, *NtSEP3* (предполагаемые гомологи *MADS-RIN*), а также *NtAGL8* и *NtMADS23*, гомологи которых активируются в вегетативной ткани в ответ на стресс [6]. Среди выбранных для анализа генов в листьях экспрессировались только *NtSEP1* и *NtAGL8*. При этом в сравнении с контролем уровень транскриптов *NtSEP1* у L28 и L29 был более чем в 2 раза ниже, тогда как *NtAGL8* экспрессировался приблизительно на том же уровне.

Основные выводы. Полученные результаты позволяют предположить, что нокаут гена *NtPDS* останавливает биосинтез каротиноидов, что приводит к нарушениям фотосинтеза/фотозащиты, сроков цветения и морфологических характеристик растений табака. Дифференциальная экспрессия гена *NtSEP1* предполагает его участие в регуляции биосинтеза каротиноидов в листьях табака.

ЛИТЕРАТУРА

1. Bánfalvi Z. et al. Generation of transgene-free PDS mutants in potato by *Agrobacterium*-mediated transformation // BMC biotechnology. – 2020. – Vol. 20. – № 1. – P. 1-10.
2. Li S. et al. The RIN-MC fusion of MADS-box transcription factors has transcriptional activity and modulates expression of many ripening genes // Plant Physiology. – 2018. – Vol.176. – № 1. – P. 891-909.
3. Maoka T. Carotenoids as natural functional pigments // J. Nat. Med. 2020. Vol. 74. – № 1. – P. 1–16.
4. Mashiguchi K., Seto Y., Yamaguchi S. Strigolactone biosynthesis, transport and perception // The Plant Journal. – 2021. – Vol. 105. – № 2. – P. 335-350.
5. Naing A. H. et al. Silencing of the phytoene desaturase (PDS) gene affects the expression of fruit-ripening genes in tomatoes // Plant methods. – 2019. – Vol. 15. – № 1. – P. 1-10.
6. Castelán-Muñoz N. et al. MADS-box genes are key components of genetic regulatory networks involved in abiotic stress and plastic developmental responses in plants // Frontiers in Plant Science. – 2019. – Vol. 10. – P. 853.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ РАБОТЫ

Статьи

1. Nezhdanova A. V. et al. Effect of a Radical Mutation in Plastidic Starch Phosphorylase PHO1a on Potato Growth and Cold Stress Response // Horticulturae. – 2022. – Vol. 8. – № 8. – P. 730.

Тезисы

1. Нежданова А.В., Щенникова А.В. Влияние редактированной пластидной крахмалфосфо-риказы PHO1a на развитие и стрессовый ответ растений картофеля // Сборник тезисов конференции «Биотехнология: наука и практика». Актуальная биотехнология. – 2022. – Т.1. – С. 63-65 (устный доклад).
2. Нежданова А.В. и др. Получение редактированных растений картофеля с измененным метаболизмом сахарозы // Сборник тезисов конференции «Биотехнология: состояние и перспективы развития». – 2022. – №20. – С. 223-224 (постерный доклад).
3. Нежданова А.В., Щенникова А.В. CRISPR/CAS9 нокаут гена фитоиндесатуразы *PDS* в геноме табака *Nicotiana tabacum* L. блокирует биосинтез каротиноидов в листьях // Сборник тезисов конференции «26-ая Пущинская школа-конференция молодых ученых с международным участием «Биология – наука XXI века»». – 2023. – С. 298-299 (постерный доклад).

RESEARCH CENTER OF BIOTECHNOLOGY RAS
MADS-DOMAIN TRANSCRIPTION FACTORS ARE INVOLVED IN THE
REGULATION OF CAROTENOID BIOSYNTHESIS IN *NICOTIANA TABACUM*
L. PHOTOSYNTHESIS TISSUE

Abstract. MADS-box family transcription factors play important roles in plant development and adaptation, which are closely related to the carotenoid biosynthesis required for photosynthesis and photoprotection. The carotenogenesis by-products, strigolactones and abscisic acid, are involved in the regulation of plant growth, development, and stress response. In this work, we obtained *Nicotiana tabacum* L. lines with CRISPR-Cas9-knockout of the phytoene desaturase gene PDS, which catalyzes the carotenoid precursor first modification. The plants differed from the control in flowering time and mosaic white-green leaf pigmentation due to a decrease in the carotenoid content. Late flowering lines showed increased NtPDS expression and decreased expression of the MADS-box gene NtSEP1, which is presumably involved in the regulation of transcription of carotenoid biosynthesis genes in tobacco.

Keywords: CRISPR/Cas9 genome editing; *Nicotiana tabacum* L.; carotenoid biosynthesis; phytoene desaturase PDS; MADS-domain transcription factors.

В работе использована экспериментальная установка искусственного климата (ЭУИК) Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук»

Соловьева Анастасия Юрьевна

аспирант ФИЦ Биотехнологии РАН 3 года обучения

профиль 1.5.4 Биохимия

e-mail: nastya.soloveva1@yandex.ru

Научный руководитель

Тихонова Тамара Викторовна

кандидат химических наук,

с.н.с. лаборатории инженерной энзимологии



ИССЛЕДОВАНИЕ МЕХАНИЗМА АКТИВАЦИИ ТИОЦИАНАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ *IN VITRO* И *IN VIVO*

Аннотация. В работе изучается процесс встраивания ионов меди в активный центр тиоцианатдегидрогеназы (TcDH). Показано, что активация и каталитический цикл TcDH требуют присутствия ионов меди в разных степенях окисления: активация протекает в присутствии ионов Cu^+ , а для каталитического процесса ионы меди в активном центре должны находиться в состоянии Cu^{2+} . Для определения функциональной роли His-мотивов на C- и N-концах цитохрома C552 – потенциального акцептора электронов для TcDH, получена и охарактеризована укороченная форма C552. В геноме *Tv. paradoxus* локализован Met-богатый белок, который потенциально может участвовать в переносе и встраивании ионов меди в активный центр TcDH *in vivo*. Начат процесс получения рекомбинантной формы этого белка.

Ключевые слова: тиоцианатдегидрогеназа, медь, активация ферментов, медь-связывающий белок, цитохром C552

Медь является важным микроэлементом для всех живых организмов. Поскольку ионы меди обладают высокой токсичностью, потребление, распределение и использование их в клетке строго регулируется. Для этого в клетках существуют разнообразные мультикомпонентные системы транспорта, которые помогают эффективно и специфично доставить ионы меди к белкам-мишеням.

В активном центре фермента тиоцианатдегидрогеназы (TcDH) из бактерии *Thioalkalivibrio paradoxus* содержится каталитический кластер, состоящий из трех ионов меди [1]. Наличие всех трех ионов меди в кластере является критичным для катализа реакции окисления тиоцианата до цианата и элементарной серы. Целью данной работы является характеристика связывания ионов меди в активном центре TcDH *in vitro*, а также поиск потенциальных медь-связывающих белков, которые осуществляют встраивание *in vivo*.

Ранее было показано, что активация TcDH (в данном случае восстановление активности фермента после выделения) ионами Cu^+ происходит быстро (в течение нескольких секунд), в то время как активация Cu^{2+} – медленный процесс, протекающий в течение нескольких дней. На основании ранее полученных данных было сделано предположение, что два иона меди встраиваются в активный центр только в одновалентном состоянии. В продолжении работы были проведены эксперименты по активации нативного TcDH, содержавшего 0,4 иона меди, в анаэробном боксе, чтобы исключить влияние кислорода на активацию. Установлено, что при активации TcDH ионами Cu^+ в анаэробных условиях и измерении активности также в анаэробных условиях ферментативная активность TcDH составляет около 20% от максимальной, а после переноса этого же образца фермента в аэробные условия активность достигает 100 %. Мы предполагаем, что при переносе в аэробные условия кислород переводит ионы меди в активном центре TcDH из Cu^+ в степень окисления +2. Таким образом, можно выделить два процесса: первый – активация,

которая протекает в присутствии ионов Cu^+ , и каталитический процесс, для которого ионы меди в активном центре должны находиться в окисленном состоянии. Последний тезис подтверждается данными ЭПР [1].

Другим направлением настоящей работы является поиск и характеристика белков, способных принимать электроны от TcDH *in vitro* и потенциально выполнять функцию акцептора *in vivo*. Ранее в этой роли были рассмотрены два эндогенных одnogемовых цитохрома C552 и C546/556. Для обоих цитохромов были получены пространственные структуры: структура C552 – методом ЯМР, структура C546/556 – методом рентгеноструктурного анализа. Интересной особенностью цитохрома C552 является наличие длинных неупорядоченных His-содержащих мотивов на С- и N-концах полипептидных цепей, которые нетипичны для белков этого семейства. С целью изучения функции His-мотивов был получен укороченный рекомбинантный белок C552sh (short) без них. Выделенный гомогенный препарат C552sh не отличался по спектральным свойствам от полноразмерного цитохрома, а вот активность TcDH с C552sh в качестве акцептора была в 2 раза ниже, чем с C552. Для получения структуры C552sh был проведен поиск условий кристаллизации под руководством аспирантки лаборатории инженерной энзимологии Ларисы Варфоломеевой с помощью кристаллизационного робота Oryx4 (Douglas instruments, UK). Найденные условия кристаллизации фермента оптимизировали вручную методом диффузии паров в висячей капле. Для улучшения качества кристаллов был применен метод микросидинга. В дальнейшем планируется снять набор дифракционных данных с полученных кристаллов.

Встраивание ионов меди в активный центр TcDH *in vivo* осуществляется специальными медь-связывающими белками, поскольку концентрация свободных ионов меди в клетке жестко регулируется. Ранее нами был охарактеризован медь-связывающий белок CopC, ген которого расположен рядом с геном TcDH в геноме *Tv. paradoxus*. Для него была показана способность переносить ионы $\text{Cu}^{+/2+}$ в каталитический сайт TcDH. В геноме *Tv. paradoxus* в одном опероне с геном TcDH нами был обнаружен ген белка с неизвестной функцией, особенностью которого является присутствие в первичной структуре нескольких Met-содержащих мотивов, характерных для Cu^+ -связывающих белков. Мы предположили, что этот белок также может участвовать в транспорте и встраивании ионов меди в активный центр TcDH *in vivo*. С помощью программ AlphaFold и TMHMM была предсказана структура этого Met-богатого белка. Согласно модели, у белка есть трансмембранный домен, охватывающий остатки с 28 по 49, с вероятностью выше 0.8, N-конец – цитоплазматический, а С-конец, вероятно, периплазматический. На поверхности белка найден возможный сайт связывания ионов меди, формируемый 2 остатками His и 2 остатками Met. Методом гетерологической экспрессии в клетках *E. coli* была получена рекомбинантная форма Met-богатого белка. Однако, при выделении белок оказался в нерастворимой фракции. Попытка денатурации белка в 8М мочеvine и последующий рефолдинг не увенчалась успехом. Удаление трансмембранного домена также не привело к получению растворимого белка. В дальнейшем планируется провести рефолдинг Met-богатого белка без трансмембранного домена.

Основные выводы. Активация и каталитический цикл TcDH требуют присутствия ионов меди в разных степенях окисления: активация протекает только в присутствии ионов Cu^+ , а для каталитического процесса ионы меди в активном центре должны находиться в состоянии Cu^{2+} .

Получен и охарактеризован цитохром C552sh, не содержащий His-мотивы на С- и N-концах, активность TcDH с ним в качестве акцептора ниже, чем с полноразмерным белком.

В геноме *Tv. paradoxus* локализован Met-богатый белок, который может участвовать в переносе и встраивании ионов меди в активный центр TcDH *in vivo*. Начат процесс получения рекомбинантной формы этого белка.

ЛИТЕРАТУРА

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

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ РАБОТЫ

Статьи

1. Khrenova M. G., Soloveva A. Yu., Varfolomeeva L. A., Tikhonova T. V., Popov V. O. The O to S substitution in urea brings inhibition activity against thiocyanate dehydrogenase // *Mendelev Communication*. – 2021. – Vol. 31(3) – P. 373–375.
2. Britikov V. V., Bocharov E. V., Britikova E. V., Dergousova N. I., Kulikova O. G., Solovieva A. Y. et al. Unusual Cytochrome c552 from *Thioalkalivibrio paradoxus*: Solution NMR Structure and Interaction with Thiocyanate Dehydrogenase // *Int J Mol Sci*. – 2022. – Vol. 23(17) – P. 9969.
3. Varfolomeeva L.A., Solovieva A.Yu., Shipkov N.S., Kulikova O.G., Dergousova N.I., Rakitina T.V., Boyko K.M., Tikhonova T.V., Popov V.O. Probing the Role of a Conserved Phenylalanine in the Active Site of Thiocyanate Dehydrogenase // *Crystals*. – 2022. – Vol. 12(12) – P. 1787.
4. Tikhonova T.V., Osipov E. M., Dergousova N. I., Boyko K. M., Elizarov I. M., Gavrilov S. N., Khrenova M. G., Robb F. T., Solovieva A. Y., Bonch-Osmolovskaya E. A. et al. Extracellular Fe(III) reductase structure reveals a modular organization enabling S-layer insertion and electron transfer to insoluble substrates // *Structure*. – 2023. – Vol. 31(2) – P. 174–184.

Тезисы

1. Соловьева А.Ю. Изучение механизма действия тиоцианатдегидрогеназы методами стационарной кинетики // Сборник тезисов XXXIII Зимняя международная молодежная научная школа «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии» (Москва, 8-11 февраля 2021 г.) / под ред. д.х.н. Т.В. Овчинниковой, к.б.н. Е.А. Стукачевой, сост. к.б.н. Стукачева Е.А. – С. 38 (тезисы и стендовый доклад).
2. Соловьева А.Ю., Тихонова Т.В. Исследование механизма активации тиоцианатдегидрогеназы *in vitro* и *in vivo* // Сборник тезисов отчётной конференции аспирантов ФИЦ Биотехнологии РАН (Москва, 21–25 июня 2021 г.): / под ред. В.О. Попова, А.Н. Фёдорова; сост. Е.С. Титова. – М.: ВАШ ФОРМАТ. – 2021. – С. 53–56 (тезисы и устный доклад).
3. Соловьева А.Ю., Хренова М.Г., Тихонова Т.В., Попов В.О. Исследование механизма действия тиоцианатдегидрогеназы методом ингибиторного анализа // Сборник тезисов «III Объединенный научный форум физиологов, биохимиков и молекулярных биологов, VII съезд биохимиков России, X Российский симпозиум «белки и пептиды», VII съезд физиологов СНГ» (3-8 октября 2021 г.) / под ред. А.Г. Габибова и М.А. Островского – С. 131 (тезисы и стендовый доклад).
4. Соловьева А.Ю., Тихонова Т. В. Исследование механизма активации тиоцианатдегидрогеназы *in vitro* и *in vivo* // Сборник тезисов отчётной конференции аспирантов (Москва, 23–30 июня 2022 г.) / под ред. В.О. Попова, А.Н. Фёдорова; сост. Е.С. Титова, С.В. Соловьева – М.: ВАШ ФОРМАТ. – 2022. – С. 69–74 (тезисы и устный доклад).
5. Соловьева А.Ю., Варфоломеева Л.А., Дергоусова Н.И., Тихонова Т.В., Попов В.О. Необычные спектральные свойства одногомоового цитохрома с из галоалкалофильных бактерий рода *Thiokalivibrio* // Сборник тезисов XXXV Зимняя международная молодежная научная школа «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии» (Москва, 7-10 февраля 2023 г.) / под ред. д.х.н. Т.В. Овчинниковой, сост. Овчинникова Т.В., Шереметьева Э.В. – С. 35 (тезисы и стендовый доклад).

ОСНОВНЫЕ ДОСТИЖЕНИЯ

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

**RESEARCH CENTRE OF BIOTECHNOLOGY RAS
STUDY OF ACTIVATION MECHANISM OF THIOCYANATE
DEHYDROGENASE IN VITRO AND IN VIVO**

Abstract. We study the process of incorporation of copper ions into the active site of thiocyanate dehydrogenase (TcDH). It has been shown that the activation and catalytic cycle of TcDH require the presence of copper ions in different oxidation states: activation proceeds in the presence of Cu^+ ions, and for the catalytic process, copper ions in the active center must be in the Cu^{2+} state. To determine the functional role of His-motifs at the C- and N-termini of cytochrome C552, a potential electron acceptor for TcDH, a shortened form of C552 was obtained and characterized. In the genome of *Tv. paradoxus* localized a Met-rich protein that could potentially be involved in the transfer and incorporation of copper ions into the active site of TcDH in vivo. The process of obtaining a recombinant form of this protein has begun.

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

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

Дедыш Светлана Николаевна
доктор биологических наук,
зав. лабораторией молекулярной экологии
и филогеномики бактерий



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

Аннотация. Исследования в рамках кандидатской диссертации ставят целью направленный поиск новых природных высокопродуктивных штаммов метанотрофных бактерий как продуцентов кормового белка на основе метана для аквакультуры, а также оптимизацию их метаболизма с помощью современных подходов геной и метаболической инженерии. Одной из важных предпосылок для развития биотехнологий с использованием метанотрофных бактерий как продуцентов кормового белка из метана является наличие штаммов-продуцентов с требуемыми физиологическими и ростовыми характеристиками. Работа третьего года велась с двумя основными объектами: 1) полученным ранее штаммом *Methylococcus capsulatus* MIR и его мутантом с делециями по генам гликогенсинтаз – *glgA1* и *glgA2*, с анализом их ростовых характеристик; 2) новым представителем рода *Methylomonas*, штаммом MP1, для которого были определены продукционные характеристики и установлено таксономическое положение с описанием в качестве нового вида *Methylomonas rapida*.

Ключевые слова: Метанотрофные бактерии. Ростовые характеристики. Кормовой белок. Гликоген. *Methylococcus*. *Methylomonas*

Аэробные метанотрофы – это уникальная группа бактерий, распространенная повсеместно в экосистемах, где одновременно доступны и метан, и кислород. Микроорганизмы этой группы способны использовать парниковый газ метан (CH₄) в качестве источника углерода и энергии, играя важную роль в глобальном цикле углерода, в частности, существенно сокращая его выбросы в атмосферу [2; 4; 7]. Помимо биосферной значимости, метанотрофные бактерии имеют высокий биотехнологический потенциал, который особенно значителен у быстрорастущих представителей родов *Methylococcus* и *Methylomonas*. Одним из наиболее биотехнологически востребованных представителей аэробных метанотрофов является *Methylococcus capsulatus*, обладающий высокой скоростью роста при повышенных температурах и используемый как перспективный продуцент белково-витаминного концентрата – «гаприна» [1, 8]. Число охарактеризованных и использованных в производстве штаммов *M. capsulatus*, однако, остается ограниченным, причем все эти штаммы неспособны к росту на метаноле.

В настоящей работе был получен новый изолят *M. capsulatus*, штамм MIR, способный расти на метаноле в диапазоне концентраций от 0.05 до 3.5% (об./об.) в минеральной среде [6] при 42°C. Полная последовательность генома штамма MIR была определена с исполь-

зованием платформ Illumina и Oxford Nanopore Technologies. Размер генома штамма MIR составил 3,2 млн. п.о. В общей сложности было предсказано 2859 белок- кодирующих генов. Геном содержит две копии кластера генов, кодирующих мембранную метаномоноксигеназу (ММО) и один кластер генов растворимой ММО. Также кодируются метанолдегидрогеназы MxaFI и XoxF [5], а также три различных изофермента формиатдегидрогеназы. Поскольку пути ассимиляции C_1 являются общими для всех видов *Methylococcus* [3, 6], штамм MIR может служить модельным организмом для изучения метаболических основ способности роста на метаноле. Последовательность генома штамма MIR была депонирована в GenBank под регистрационным номером CP097161.1.

Далее была проведена работа по изучению ростовых характеристик штамма *M. capsulatus* MIR и мутанта по генам гликогенсинтаз – $\Delta glgA1\Delta glgA2$ – в условиях непрерывного культивирования, с анализом содержания белка в синтезируемой биомассе. Оба штамма показали способность к устойчивому росту в ферментере со скоростью протока $0,25\text{ ч}^{-1}$. Содержание белка в сухой биомассе составило 72,0% для штамма дикого типа и 66,3% для мутанта. Анализ сухой биомассы на содержание гликогена выявил значительное снижение его содержания в мутантном типе по сравнению с диким (Рис. 1).

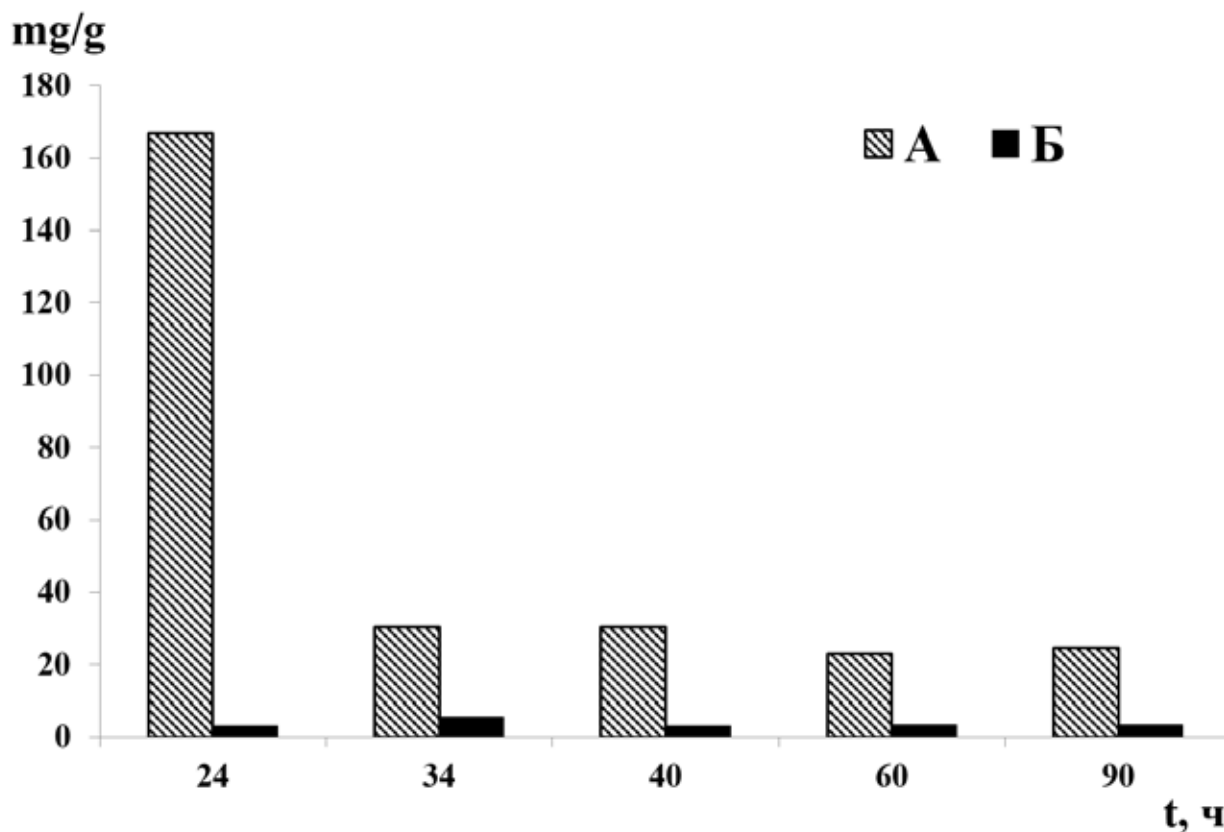


Рис. 1. Содержание гликогена в сухой биомассе *M. capsulatus* MIR дикого типа (А) и двойного мутанта (Б)

Вторым объектом проведенных исследований был новый представитель рода *Methylomonas* – штамм MP1. Род *Methylomonas* объединяет классических аэробных метанотрофов, растущих на метане и метаноле [3]. Штамм MP1 был выделен из проб донных отложений безымянного озера в Краснодарском крае, Россия ($44^{\circ}41'50.8''N$ $39^{\circ}18'49.9''E$). Аликвоту образца осадка использовали в качестве инокулята для получения накопительной культуры метанотрофных бактерий. Последние были получены с использованием разбавленной среды NMS. Полученная чистая культура штамма MP1 продемонстрировала высокие скорости роста при повышенных температурах (Рис. 2).

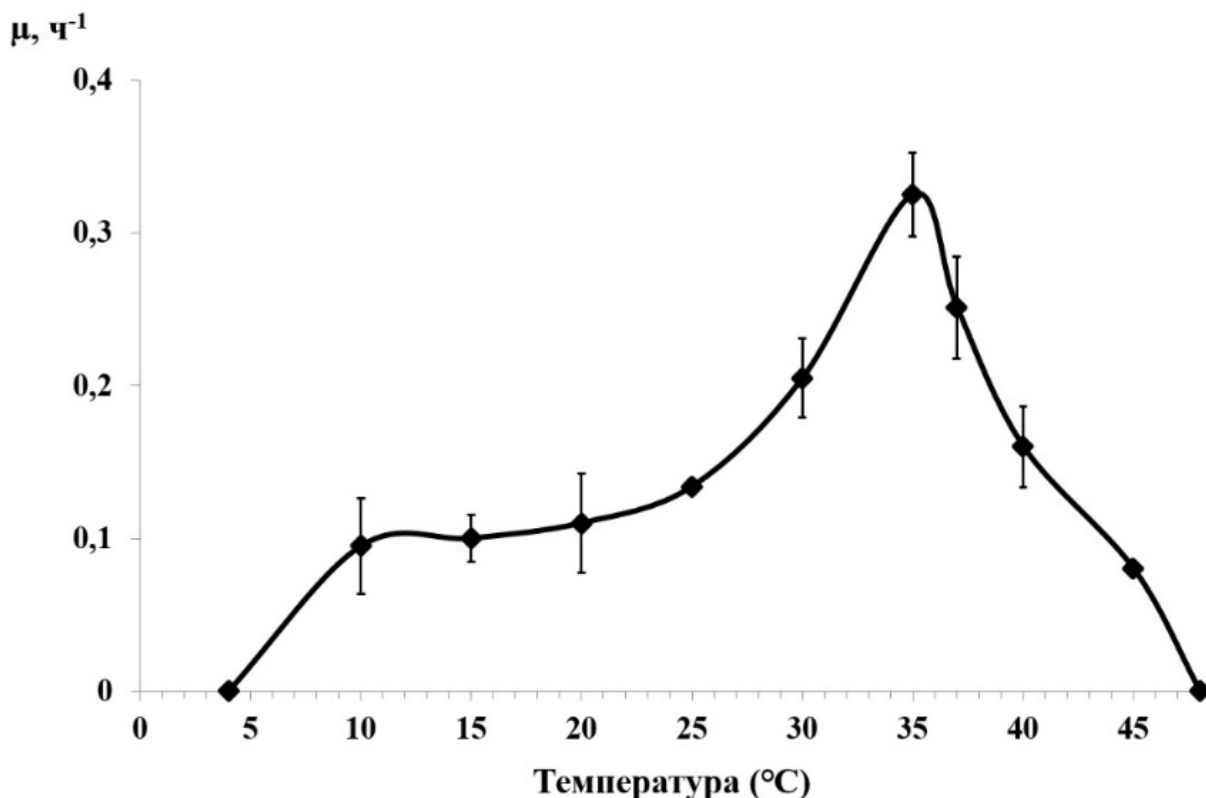


Рис. 2. Зависимость удельной скорости роста штамма *Methylobionas* MP1 на метане от температуры

Штамм MP1 был представлен высокоподвижными короткими палочками шириной $1,10 \pm 0,03$ мкм и длиной $2,10 \pm 0,08$ мкм. Колонии округлые, диаметром 3-5 мм, темно-оранжевого цвета, слизистые, с цельным краем и гладкой поверхностью. Анализ состава каротиноидов показал наличие производных ликопина. Электронная микроскопия выявила наличие одного полярного жгутика. Метанол поддерживал рост в широком диапазоне концентраций, до 5% (об./об.). Штамм MP1 рос в относительно узком диапазоне pH 5,5-7,3 с оптимумом при pH 6,6-7,2. Температурный диапазон роста составлял 8-45°C с оптимумом 35°C. Удельная скорость роста штамма в оптимальных условиях роста составляла 0,33 ч⁻¹.

Геном изолята имел размер 4,61 млн. п.о. и содержал три оперона рРНК, один оперон мембранной ММО и около 4450 белок-кодирующих генов. Сравнение генома штамма MP1 с таковыми у представителей ранее описанных видов рода *Methylobionas* показало лишь 82-85% идентичности нуклеотидных последовательностей, на основании чего он был описан как представитель нового вида этого рода, *Methylobionas rapida* sp. nov. Штамм MP1^T (=VKM B-3663T = KCTC 92586T) является типовым штаммом нового вида.

Полученный нами штамм MP1^T был способен к устойчивому росту с высокой продуктивностью (3,26 г/л) при непрерывном культивировании в биореакторе со скоростью потока 0,22 ч⁻¹.

Основные выводы. В результате работы для штамма MIR и его мутанта были получены ростовые характеристики в условиях непрерывного культивирования, а также данные по содержанию общего белка в сухой биомассе. Была показана способность стабильного роста в условиях непрерывного культивирования в ферментере со скоростью потока 0,25 ч⁻¹, что сопоставимо с таковыми у производственных штаммов.

Представителя нового вида *Methylobionas rapida* штамм MP1^T можно рассматривать как перспективный продуцент одноклеточного белка благодаря его способности к быстрому и продуктивному росту на природном газе.

ЛИТЕРАТУРА

1. Григорян А.Н. Использование природного газа для микробиологического синтеза // Москва: ОНТИ Микробиопром. – 1970. – 90 с.
2. Троценко Ю.А. Хмеленина В.Н. Экстремофильные метанотрофы // под ред. Гальченко В. Ф. Пушино: ОНТИ ПИЦ РАН. – 2008. – 206 с.
3. Bowman J. P. *Methylococcus* // Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria. – 2015. – P. 1–10.
4. Conrad R. The global methane cycle: recent advances in understanding the microbial processes involved. // Environmental microbiology reports – 2009. – Vol. 1(5). – P. 285–92.
5. Keltjens J. T. et al. PQQ-dependent methanol dehydrogenases: rare-earth elements make a difference // Applied Microbiology and Biotechnology. – 2014. – Vol. 98. – P. 6163–6183.
6. Oshkin I.Y., Danilova O.V., But S.Y., Miroshnikov K.K., Suleimanov R.Z., Belova S.E., Tikhonova E.N., Kuznetsov N.N., Khmelenina V.N., Pimenov N.V., Dedysh S.N. Expanding Characterized Diversity and the Pool of Complete Genome Sequences of *Methylococcus* Species, the Bacteria of High Environmental and Biotechnological Relevance // Frontiers in Microbiology. – 2021. – Vol. 12.
7. Trotsenko YA, Murrell J. C. Metabolic aspects of aerobic obligate methanotrophy. // Adv. Applied Microbiology. – 2008. – Vol. 63. – P. 183–229.
8. Zhivotchenko A.G., Nikonova E.S., Jorgensen M.H. Copper effect on the growth kinetics of *Methylococcus capsulatus* (bath) // Biotechnology Techniques. – 1995. – Vol. 9(3). – P. 163–168.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ РАБОТЫ

Статьи

1. Ошкин И. Ю., Сулейманов Р. З., Дедыш С. Н., и др. Термотолерантные метанотрофные бактерии из осадков реки Черная, Крым, и оценка их ростовых характеристик // МИКРОБИОЛОГИЯ. – 2021. – Т. 90(5). – С. 553–563.
2. Oshkin I.Y., Suleimanov R.Z., Dedysh S.N., et al. Expanding Characterized Diversity and the Pool of Complete Genome Sequences of *Methylococcus* Species, the Bacteria of High Environmental and Biotechnological Relevance // Frontiers in Microbiology. – 2021. – Vol. 12:756830.
3. Tikhonova E. N., Suleimanov R.Z., et al. *Methylomonas rapida* sp. nov., a novel species of fast-growing, carotenoid-producing obligate methanotrophs with high biotechnological potential // Systematic and Applied Microbiology. – 2023. – Vol. 46(2). – P. 126398.
4. Oshkin I. Y., Suleimanov R.Z., et al. Complete Genome Sequence of *Methylococcus capsulatus* MIR, a Methanotroph Capable of Growth on Methanol // Microbiology Resource Announcements. – 2022. – Vol. 11(9). – P. e00542-22.

Тезисы

1. Сулейманов Р.З. Поиск и метаболическая инженерия новых метанотрофных бактерий как продуцентов кормового белка для аквакультуры // Ежегодная отчетная конференция аспирантов Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук» (Москва, 21-25 июня 2021 г.) (устный доклад).
2. Сулейманов Р.З. Поиск и метаболическая инженерия новых метанотрофных бактерий как продуцентов кормового белка для аквакультуры // Ежегодная отчетная конференция аспирантов Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук» (Москва, 21-25 июня 2022 г.) (устный доклад).
3. Сулейманов Р.З. Новый вид термотолерантных метанотрофных бактерий рода *Methylomonas* с высокими ростовыми характеристиками. XIII Молодежная школа-конференция «Актуальные аспекты современной микробиологии» (16-18 ноября 2022 г.) (постерный доклад).

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

Abstract. Research within the framework of the Ph.D. thesis aims at a targeted search for new fast-growing strains of methanotrophic bacteria to be used as producers of feed protein from methane for aquaculture, as well as optimization of their metabolism using modern approaches of genetic and metabolic engineering. The work of the third year was carried out with two main objects: 1) the previously obtained *Methylococcus capsulatus* MIR strain and its mutant with deletions in the glycogen synthase genes *glgA1* and *glgA2*, with an analysis of their growth characteristics; 2) a new representative of the genus *Methylomonas*, strain MP1, for which production characteristics were determined and a taxonomic position was established with a description as a new species of *Methylomonas rapida*.

Keywords: Methanotrophic bacteria. Growth characteristics. Feed protein. Glycogen. *Methylococcus*. *Methylomonas*.

Шипков Николай Сергеевич

аспирант ФИЦ Биотехнологии РАН 3 года обучения

профиль 1.5.3 Молекулярная биология

e-mail: shipkov1995@yandex.ru

Научный руководитель

Попов Владимир Олегович

доктор химических наук,

зав. лаборатории инженерной энзимологии



СТРУКТУРА И СВОЙСТВА ТИОЦИАНАТДЕГИДРОГЕНАЗ ИЗ РАЗЛИЧНЫХ ИСТОЧНИКОВ

Аннотация. Тиоцианатдегидрогеназа (TcDH), выделенная из галоалкалофильной бактерии *Thioalkalivibrio paradoxus* – медьсодержащий фермент, катализирующий окисление тиоцианата по цианатному пути. Активный центр TcDH содержит 10 консервативных аминокислотных остатков, которые определяют принадлежность белка к тиоцианатдегидрогеназам. В некоторых гомологах TcDH обнаружена замена остатка His, который координирует ион Cu^{2+} на Gln. Такая замена представляет особый интерес так как, мутация H482Q в TcDH из *Tv. paradoxus* приводит к инактивации фермента. Для исследования был выбран гомолог TcDH из *Tautonia sociabilis*, который содержит замену His на Gln, он был получен в гомогенном состоянии и изучен.

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

Тиоцианатдегидрогеназа – фермент, катализирующий разложение тиоцианата по цианатному пути с образованием цианата, молекулярной серы и переносом двух электронов на внешний акцептор. Активный центр тиоцианатдегидрогеназы содержит 3 иона меди необходимые для катализа реакции. Впервые тиоцианатдегидрогеназу (tpTcDH) обнаружили в галоалкалофильной бактерии *Thioalkalivibrio paradoxus*, которая способна к росту на тиоцианате в качестве единственного источника энергии и азота. Тиоцианатдегидрогеназа из *Tv. paradoxus* была выделена и охарактеризована в лаборатории инженерной энзимологии, в частности исследовано влияние ионов меди и получена трехмерная структура молекулы tpTcDH методом рентгеноструктурного анализа [1]. Активный центр tpTcDH содержит набор из 10 аминокислотных остатков, обеспечивающих поддержание структуры трехядерного медного кластера и каталитические свойства TcDH. Гомологи tpTcDH обнаружены в геномах более, чем 50 бактерий. Было высказано предположение, что наличие в первичной структуре характерного шаблона из 10 каталитически важных аминокислот является маркером принадлежности белка к семейству тиоцианатдегидрогеназ [2,3].

Для проверки этой гипотезы были выбраны гомологи tpTcDH из бактерий *Thiohalobacter thiocyanaticus* HRh1 (ttTcDH) и *Hydrogenophilales bacterium* SM250 (hbTcDH), идентичность которых по аминокислотной последовательности с tpTcDH составляет 33 и 65%, соответственно. Оба белка содержат консервативный шаблон из 10 аминокислотных остатков. Галофильная бактерия *T. thiocyanaticus* способна к росту с тиоцианатом (SCN^-) в качестве единственного источника энергии и азота [4]. Ранее мной было показано, что *H. bacterium* также способна к росту с тиоцианатом в качестве источника азота. Оба белка обладали тиоцианатдегидрогеназной активностью только после насыщения ионами меди.

При множественном выравнивании аминокислотных последовательностей гомологов tpTcDH особое внимание привлек остаток His (His482 у tpTcDH), который в tpTcDH, ttTcDH и hbTcDH

координирует ион Cu^{3+} . Ряд гомологов содержали замену этого остатка на Gln или Glu. Учитывая, что мутации H482Q в tpTcDH и hbTcDH приводили к инактивации фермента, гомологи с такой заменой представляют большой интерес, так как у них может отличаться организация активного центра. Исследование таких гомологов позволит больше узнать о каталитическом механизме реакции разложения тиоцианата TcDH.

Для такого исследования был выбран гомолог tpTcDH из бактерии *Tautonia sociabilis* (tsTcDH). Степень гомологии tsTcDH с tpTcDH составляет около 50%. Все консервативные остатки кроме остатка His, аналогичного His482 у tpTcDH, у tsTcDH сохранены. На месте остатка His в первичной структуре tsTcDH расположен GlnXXX. Ген tsTcDH был выделен с помощью ПЦР из геномной ДНК бактерии *Tautonia sociabilis*. tsTcDH был получен методом гетерологичной экспрессии в *E. coli Rosetta* (DE3). К сожалению, весь белок оказался в тельцах включения. С помощью экспрессии tsTcDH в штамме *E. coli Rosetta* (DE3), который содержит плазмиду pGro7, и модификации метода очистки удалось получить растворимый tsTcDH в димерном состоянии, которое характерно для tpTcDH и hbTcDH. Полученный препарат белка был насыщен ионами меди и изучен на их содержание. Дальнейшие планы – проверка ферментативной активности tsTcDH и получение кристаллов белка для проведения рентгеноструктурного анализа.

Второй объект нашего исследования - ttTcDH, был выделен из периплазматической фракции бактерии *T. thiocyanaticus*, выращенной в присутствии тиоцианата. Очищенный ttTcDH находился в двух формах – свободный ttTcDH и в комплексе с тиоредоксин-подобным белком (TLP). Тиоцианатдегидрогеназной активностью обладал только комплекс ttTcDH-TLP.

Ген TLP предшествует гену ttTcDH в геноме *T. thiocyanaticus*. Такой паттерн организации генов не обнаружен для бактерий *Tv. paradoxus*, *H. bacterium* и *T. sociabilis*. Однако, подобная организация генов TLP-TcDH обнаружена в геномах других бактерий, содержащих гомологи tpTcDH, у которых идентичность по первичной последовательности не превышает 30 %. Такая организация генов, обнаруженная во многих бактериях, кажется не случайной. Функция этих тиоредоксин-подобных белков не ясна. Известно, что тиоредоксин-подобные белки способны связывать глутатион [6]. В работе [3] высказано предположение, что благодаря такой способности, TLP может выполнять функцию транспорта серы, образующейся в катализируемой ttTcDH реакции окисления тиоцианата.

Для исследования свойств ttTcDH и роли TLP были использованы методы гетерологичной экспрессии, но выход растворимого целевого белка был слишком мал для дальнейшей работы. Была проведена модификация способов экспрессии и выделения целевого белка. В результате удалось достигнуть значительного увеличения выхода ttTcDH и TLP.

Основные выводы. При исследовании гомологов TcDH в ряде бактерий были вариации остатка остатка His, координирующего ион меди Cu^{3+} , который был заменен на Glu или Gln. Одним из таких гомологов, содержащих замену His на Gln, является TcDH из бактерии *Tautonia sociabilis* (tsTcDH). При экспрессии tsTcDH в *E.coli* весь белок находился в тельцах включения. Оптимизация условий экспрессии и выделения tsTcDH позволили получить растворимый гомогенный препарат белка.

Продолжая прошлые исследования, были оптимизированы способы экспрессии и очистки ttTcDH и TLP, что позволило получить оба белка в растворимой форме в количестве достаточном для исследования взаимодействия двух белков и установления функции TLP.

ЛИТЕРАТУРА

1. Sorokin D.Y. et al. Thioalkalivibrio thiocyanoxidans sp. nov. and Thioalkalivibrio paradoxus sp. nov., novel alkaliphilic, obligately autotrophic, sulfur-oxidizing bacteria capable of growth on thiocyanate, from soda lakes //International journal of systematic and evolutionary microbiology. – 2002. – Vol. 52. – №. 2. – P. 657-664.
2. Tikhonova T.V. et al. Trinuclear copper biocatalytic center forms an active site of thiocyanate dehydrogenase //Proceedings of the National Academy of Sciences. – 2020. – Vol. 117. – №. 10. – P. 5280-5290.
3. Tsallagov S.I. et al. Comparative genomics of Thiohalobacter thiocyanaticus HRh1T and

Guyparkeria sp. SCN-R1, halophilic chemolithoautotrophic sulfur-oxidizing gammaproteobacteria capable of using thiocyanate as energy source //Frontiers in microbiology. – 2019. – Vol. 10. – P. 898.

4. Sorokin D.Y. et al. Isolation and characterization of an obligately chemolithoautotrophic Halothiobacillus strain capable of growth on thiocyanate as an energy source //FEMS microbiology letters. – 2014. – Vol. 354. – №. 1. – P. 69-74.

5. Lu J., Holmgren A. The thioredoxin antioxidant system //Free Radical Biology and Medicine. – 2014. – Vol. 66. – P. 75-87.

6. Nardini M. et al. Crystal structure of the glutaredoxin-like protein SH3BGR13 at 1.6 Å resolution //Biochemical and biophysical research communications. – 2004. – Vol. 318. – №. 2. – P. 470-476.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ РАБОТЫ

Тезисы

1. Shipkov N.S. et al. Novel thiocyanate dehydrogenases from sulfur-oxidizing bacteria Thiohalobacter thiocyanaticus HRh1 T and Guyparkeria sp. SCN-R1 // II Joint Symposium of the Russian Biochemical Society. – 2019 (постерный доклад).

2. Shipkov N.S. et al. Preliminary characterization of two novel thiocyanate dehydrogenases from halophilic sulfur oxidizing Gammaproteobacteria Thiohalobacter thiocyanaticus HRh1 T and Guyparkeria sp. SCN-R1 // 12th International Conference BIOCATALYSIS-2019: Fundamentals & Applications. – 2019.

3. Шипков Н.С., В.О. Попов Структура и свойства тиоцианатдегидрогеназ из различных источников // Сборник тезисов отчётной конференции аспирантов (Москва, 22–30 июня 2021 г.) / под редакцией В.О. Попова, А.Н. Фёдорова; сост. Е.С. Титова. - М.: МАКС Пресс. –2021. – С. 6–10 (устный доклад).

4. Н.С. Шипков, Н.И. Дергоусова, Т.В. Тихонова [и др.] Структура и свойства тиоцианатдегидрогеназ из различных источников // III объединенный научный форум физиологов, биохимиков и молекулярных биологов: Материалы: VII съезд биохимиков России. X российский симпозиум «Белки и пептиды». VII съезд физиологов СНГ, Сочи, Дагомыс, 03–08 октября 2021 г. Том 2. – Москва: Изд-во «Перо», 2021. – С. 119 (устный доклад).

Shipkov Nikolai Sergeevich

RESEARCH CENTRE OF BIOTECHNOLOGY RAS STRUCTURE AND PROPERTIES OF THIOCYANATEDEHYDROGENASES FROM VARIOUS SOURCES

Abstract. Thiocyanate dehydrogenase (TcDH) isolated from the haloalkalophilic bacterium Thioalkalivibrio paradoxus is a copper-containing enzyme that catalyzes the oxidation of thiocyanate via the cyanate pathway. The active center of TcDH contains 10 conserved amino acid residues that determine the protein's belonging to thiocyanate dehydrogenases. In some TcDH homologues, the replacement of the His residue, which coordinates the Co³⁺ ion with Gln, was found. Such a substitution is of particular interest since the mutation of H482Q in TcDH from Tv. paradoxus leads to inactivation of the enzyme. For the study, a TcDH homologue from Teutonia sociabilis was selected, which contains the replacement of His by Gln, it was obtained in a homogeneous state and studied.

Keywords: Thiocyanate, thiocyanate dehydrogenase, sulfur-oxidizing bacteria, cyanate pathway.

Бубнова Анастасия Николаевна

аспирант ФИЦ Биотехнологии РАН 2 года обучения

профиль 1.5.6 Биотехнология

e-mail: an_bubnova@mail.ru

Научный руководитель

Камионская Анастасия Михайловна

кандидат биологических наук,

заместитель директора по научной работе,

руководитель группы биоинженерии растений



ПОИСК ПОТЕНЦИАЛЬНЫХ ПРОМОТОРНЫХ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ ДЛЯ ВАЛИДАЦИИ *IN VIVO* ПО ПРИЗНАКАМ ДОСТУПНОСТИ ХРОМАТИНА И САЙТАМ ИНИЦИАЦИИ ТРАНСКРИПЦИИ

Аннотация. В данной работе проводился анализ промоторных последовательностей 1-й хромосомы генома риса *Oryza sativa*, предсказанных с помощью алгоритма, основанного на выравниваниях и математическом методе расчёта статистически значимых классов промоторов [1]. Последовательности были проанализированы на наличие возможных сайтов начала транскрипции (5'-концов потенциально транскрибируемых участков) вблизи них в направлении 3' (downstream). Также было изучено состояние доступности хроматина в области потенциальных промоторов. В результате работы отобраны потенциальные промоторные последовательности, располагающиеся в открытой области хроматина и имеющие вблизи точку старта транскрипции, для последующей их проверки *in vivo*.

Ключевые слова: промотор, сайт начала транскрипции, открытая область хроматина, *Oryza Sativa*

Промоторы, являясь регуляторными элементами генома, контролируют экспрессию генов посредством инициации транскрипции. Точная идентификация регуляторных элементов генома представляет собой важное значение для аннотирования геномов и понимания паттернов экспрессии генов. Несмотря на то, что предпринимается много попыток разработать вычислительные методы идентификации промоторных элементов, надежных инструментов для распознавания неаннотированных регуляторных последовательностей, не допускающих ложноположительных результатов, не существует. В связи с этим предсказанные *in silico* промоторные последовательности требуют экспериментальной валидации.

В данной работе изучались предсказанные промоторы 1-й хромосомы генома риса из базы данных Database of Potential promoter sequences [2]. Из данной базы были отобраны последовательности, удовлетворяющие следующим характеристикам: расположение в геноме не ближе 1000 оснований от аннотированных транскриптов, расположение не ближе 200 оснований от транспозонов и SINE-повторов. Для дополнительного изучения свойств предсказанных последовательностей была изучена степень доступности хроматина и наличие вблизи них в направлении 3' (downstream) сайтов начала транскрипции.

Проверка наличия открытого хроматина в области потенциальных промоторов проводилась путём анализа доступного для транспозазы хроматина с использованием результатов секвенирования АТАС-seq [3]. Такой способ позволяет идентифицировать открытые для посадки транскрипционных факторов области хроматина. Данные секвенирования АТАС-

seq необработанных контрольных образцов риса *O.Sativa* отбирались из базы данных SRA NCBI, затем выравнивались на геном *O.sativa* с использованием bowtie2 [4]. Полученный bam-файл индексировали и визуализировали в геномном браузере IGV [5]. На геном также были картированы последовательности потенциальных промоторов. Далее проводился отбор последовательностей, которые совпадают с открытыми областями хроматина в геноме (Рис. 1).

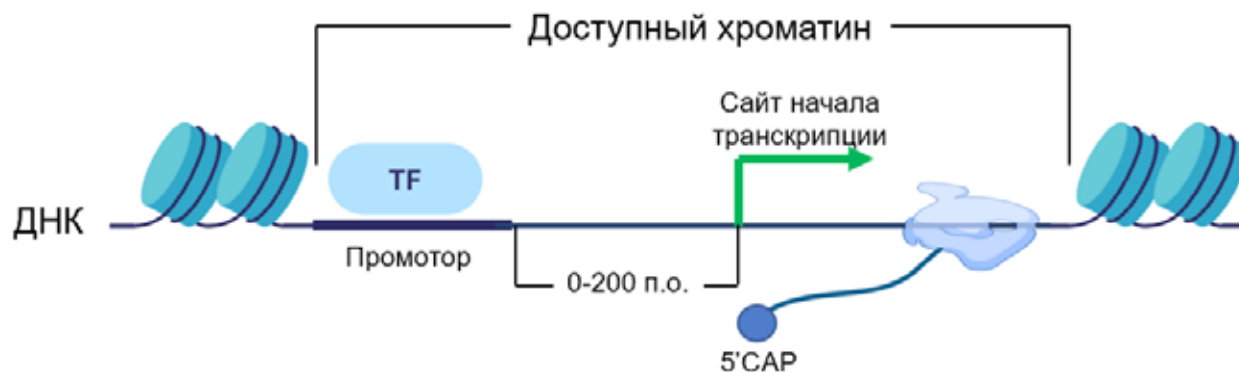


Рис. 1. Область расположения отбираемых последовательностей относительно сайтов начала транскрипции и доступного хроматина

Наличие транскрипции вблизи предсказанных промоторов в направлении 3' (downstream) выявлялось путём анализа данных секвенирования Cage-seq, которое основано на захвате полноразмерных РНК с кэп и секвенировании только первых 20–30 нуклеотидов с 5'-конца, так называемых CAGE-меток [6]. Секвенированные данные Cage-seq отбирались из базы данных SRA NCBI, выравнивались на геном *O.sativa* с использованием bowtie2 и сопоставлялись с картированными ранее данными по предсказанным промоторным последовательностям. Далее были отобраны те последовательности, за которыми в направлении 3' находились 5'-области из данных кэп-анализа сайтов старта начала транскрипции (рис. 1).

Из 126 первоначально выбранных последовательностей 9 удовлетворяют обоим условиям: расположение в открытой области хроматина и наличие вблизи сайта начала транскрипции. Данные последовательности наиболее вероятно являются промоторными областями и рекомендованы к дальнейшей экспериментальной проверке *in vivo*.

ЛИТЕРАТУРА

1. Korotkov E. V. et al. Mathematical Algorithm for Identification of Eukaryotic Promoter Sequences // Symmetry. – 2021. – Vol. 13. – № 6. – P. 917.
2. RegSite Database of Potential promoter sequences. Available online: <http://victoria.biengi.ac.ru/cgi-bin/dbPPS/index.cgi?orgChr=or-sa-chr1;recordIDFrom=;recordIDTo=;segmentFrom=;segmentTo=;matrFrom=;matrTo=;signFrom=;signTo=;fmaxFrom=;fmaxTo=;matrNum=;strDNA=;te=21960;pg=1>.
3. Yan F. et al. From reads to insight: a hitchhiker's guide to ATAC-seq data analysis // Genome biology. – 2020. – Vol. 21. – P. 1-16.
4. Langmead B, Salzberg S. Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. Nature Methods. 2012, 9:357-359.
5. James T. Robinson, Helga Thorvaldsdóttir, Wendy Winckler, Mitchell Guttman, Eric S. Lander, Gad Getz, Jill P. Mesirov. Integrative Genomics Viewer. Nature Biotechnology 29, 24–26 (2011).
6. Takahashi H. et al. CAGE (cap analysis of gene expression): a protocol for the detection of promoter and transcriptional networks // Gene Regulatory Networks: Methods and Protocols. – 2012. – P. 181-200.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ РАБОТЫ

Тезисы

1. Бубнова А.Н., Зубрицкий А.В., Камионская А.М. Поиск стартов начала транскрипции вблизи предсказанных потенциальных промоторов риса и изучение степени открытости хроматина. В сб.: Сборник тезисов IX Международной конференции молодых ученых: вирусологов, биотехнологов, биофизиков, молекулярных биологов и биоинформатиков в рамках площадки открытых коммуникаций OpenBio - 2022: Сб. тез. / АНО «Иннов. центр Кольцово». – Новосибирск: ИПЦ НГУ, 2022. – 764 с.

Bubnova Anastasiya Nikolaevna

RESEARCH CENTER OF BIOTECHNOLOGY RAS SEARCH FOR POTENTIAL PROMOTER SEQUENCES FOR *IN VIVO* VALIDATION BASED ON CHROMATIN ACCESSIBILITY AND TRANSCRIPTION INITIATION SITES

Abstract. In this work, we analyzed the promoter sequences of the 1st chromosome of the *Oryza sativa* rice genome predicted using an algorithm based on alignments and a mathematical method for calculating statistically significant classes of promoters [1]. The sequences were analyzed for possible transcription start sites (5'-ends of potentially transcribed regions) near them in the downstream direction. The state of chromatin in the region of potential promoters was also studied. As a result of the work, potential promoter sequences located in the open region of chromatin and having a transcription start point near the starting point were selected for their subsequent verification in the and in vivo systems.

Keywords: promoter, transcription start site, open chromatin region, *Oryza sativa*.

Галлямов Артур Альбертович

аспирант ФИЦ Биотехнологии РАН 2 года обучения

профиль 1.5.3 Молекулярная биология

e-mail: arturens96@gmail.com

Научный руководитель

Кушников Виталий Владимирович

доктор биологических наук,

в.н.с. лаборатории молекулярной генетики



ЗНАЧИМОСТЬ КОНТЕКСТА ПРИОНОГЕННЫХ ДОМЕНОВ ДЛЯ ПРОЯВЛЕНИЯ ИХ ПРИОННЫХ СВОЙСТВ НА ПРИМЕРЕ ПРИОННОГО БЕЛКА Rnq1

Аннотация. При конструировании прионных белков часто предполагается модульность прионогенных доменов. В большинстве дрожжевых прионных белков прионогенный домен располагается на аминоконцевых или карбоксиконцевых участках белка. Однако, оказавшись на противоположном конце белка или внутри при слиянии с другим белком, прионный домен может изменить свои свойства: нарушиться образование приона или передача прионной укладки с исходного прионного белка на химерный белок с тем же прионным доменом. Влияние контекста фланкирующих последовательностей прионогенного домена может быть существенным. На примере белка Rnq1, у которого прионогенный домен расположен на карбокси-конце, мы показываем изменение прионных свойств прионогенного домена с разными вариантами мутаций: 277-Rnq1, 355-Rnq1 и Rnq1-GFP.

Ключевые слова: прион, дрожжевой прион, амилоид, прионогенный домен, Rnq1, [RNQ⁺]

Rnq1 – дрожжевой белок с неизвестной в настоящее время функцией, образующий прион [RNQ⁺] [1, 2]. Этот прион способствует *de novo* образованию других дрожжевых прионов, в том числе приона [PSI⁺] на основе белка Sup35. Белок Rnq1 состоит из 405 аминокислотных остатков и имеет прионогенный домен в карбоксиконцевой части, начиная со 153-ей аминокислоты. Этот домен богат аспарагином и глутамином [1], что характерно и для других прионов дрожжей, и способен образовывать амилоид, наследуемый в ряду поколений дрожжей, т.е. прион. [3]. Этот прион, обозначаемый [RNQ⁺], способен катализировать *in vivo* образование другого приона, [PSI⁺], на основе фактора терминации трансляции Sup35 [4], и потому он часто обозначается как [PIN⁺].

Считается, что прионогенные домены являются модульными и сохраняют свои свойства при слиянии с другими белками. Это предположение активно используется при изучении прионных свойств новых белков. Наиболее часто используют гибриды предполагаемых прионных доменов с функциональным С-доменом белка Sup35, что дает фенотипическую индикацию прионного превращения, или с флуоресцентным белком GFP. В большинстве дрожжевых прионных белков прионогенные домены располагаются на аминоконцевых или карбоксиконцевых участках белка. При этом ряд наблюдений указывает, что перемещение такого домена на противоположный конец белка или смещение внутрь при слиянии с другим белком может нарушить образование приона или передачу прионной укладки от исходного природного приона. Тем не менее, при изучении прионных свойств белка Rnq1 его всегда присоединяли на аминоконец гибридов с Sup35 и GFP. Таким образом, одной из целей нашей работы стало показать важность контекста прионогенных доменов при конструировании прионных белков на примере Rnq1.

Принято считать, что прионный домен Rnq1 составляет обширная область из 250 остатков, богатая глутамином и аспарагином (QN). Однако в нашей лаборатории показали, что его амилоидная структура охватывает лишь последние 40 остатков. При этом ряд других работ [5] указывает на то, что другие части QN-богатой области важны для приона $[RNQ^+]$. Похожая ситуация выявлена и в прионном белке Swi1, в котором из 300 остатков QN-богатой области для прионных свойств важны лишь крайние 38. Поэтому второй целью работы было определение прионного потенциала белка Rnq1 лишенного 50 последних остатков.

Для решения поставленных задач в штамме 74-D694 дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* с прионом $[PIN^+]$ мы изменили ген *RNQ1* с тем, чтобы он кодировал либо гибрид Rnq1-GFP, либо белок без последних 50 или 128 остатков. Для получения гибрида *RNQ1*-GFP мы извлекли с помощью ПЦР такую конструкцию, маркированную геном *HIS3* из библиотеки GFP гибридов, и этим продуктом трансформировали наш штамм.

Для совершения делеций мы использовали технологию CRISPR. Штамм 74-D694 был трансформирован плазмидой pWS172, в которой содержится ген *CAS9*, направляющая РНК на кодирующую С-концевую часть Rnq1 последовательность, а также донорной ДНК для гомологической репарации двуцепочечного разрыва. В качестве донорной ДНК использовали ПЦР-продукт *RNQ1*, кодирующий укороченный с С-концевой части Rnq1. Таким образом мы получили геномную мутацию белка Rnq1 с укорочением до 277-ой и 355-ой аминокислоты (277-Rnq1 и 355-Rnq1 соответственно). Геномные мутации *RNQ1* были подтверждены с помощью ПЦР и вестерн-блоттинга (Рис.1).

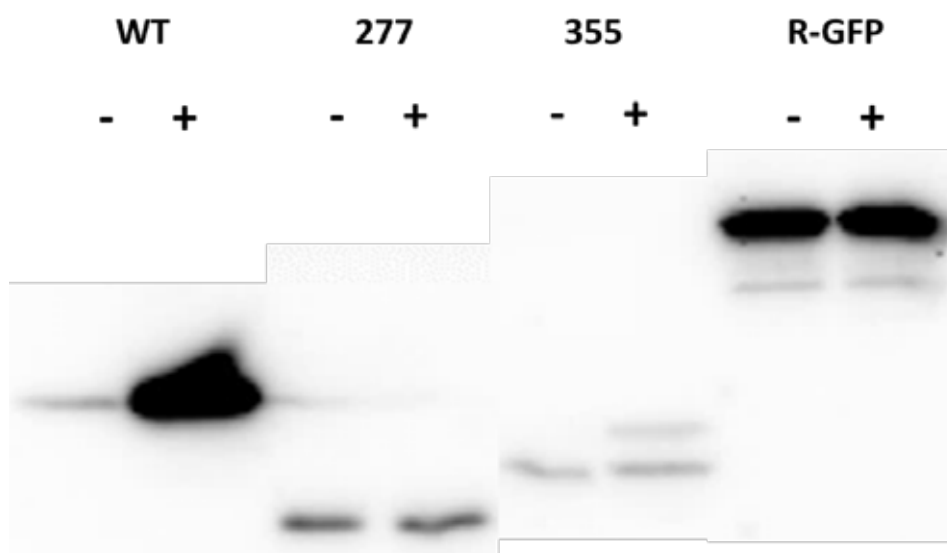


Рис. 1. Вестерн-блот с антителами на Rnq1 лизатов логарифмических дрожжевых культур. WT – штамм с полноразмерным Rnq1, 277 и 355 – штаммы с укороченным с N-конца Rnq1 до 277-ой и 355-ой аминокислоты соответственно, R-GFP – штамм со сшитым GFP к С-концевой части Rnq1. («+» - лизат кипятили в 2% SDS перед нанесением на гель, «-» - лизат не кипятили перед нанесением на гель)

В качестве одного из методов для проверки наличия дрожжевого приона используется его устойчивость к детергентам [6]. В полиакриламидный гель при SDS-PAGE входит белок в растворенной форме. Белок в прионной форме будет заходить только после растворения при кипячении в 2% SDS. Если количество прионного белка после кипячения лизата существенно увеличивается на вестерн-блоте, то это указывает на наличие приона, если количество белка одинаково до и после кипячения, то белок находится в неприонном состоянии. Этот эффект мы видим на рисунке 1: прион $[PIN^+]$ белка Rnq1 есть в исходном штамме, но отсутствует в мутированных, что говорит нам об отсутствии передачи прионной укладки с исходной прионной формы Rnq1 на укороченный Rnq1 и Rnq1-GFP.

Далее мы проверили, может ли Rnq1 в мутированных штаммах образовывать прион *de novo*. Для этого полученные штаммы с укороченным Rnq1 и сшитым Rnq1-GFP трансформировали двуми-кронной плазмидой pYES2 с соответствующим вариантом *RNQ1* в геноме. В плазмиде ген, находя-

щийся под контролем сильного индуцируемого *GAL1* промотора, кодирует 277-Rnq1-GFP, 355-Rnq1-GFP или полноразмерный Rnq1-GFP. Эта конструкция позволяет получать прионы [*PIN*⁺] при сверхпродукции Rnq1 [7]. Образование приона мы отслеживали, наблюдая характер агрегации Rnq1 с помощью флуоресцентной микроскопии. Культуру дрожжей инкубировали в течение суток в жидкой среде с галактозой для сверхпродукции Rnq1 и фиксировали паттерны свечения GFP (Рис.2).

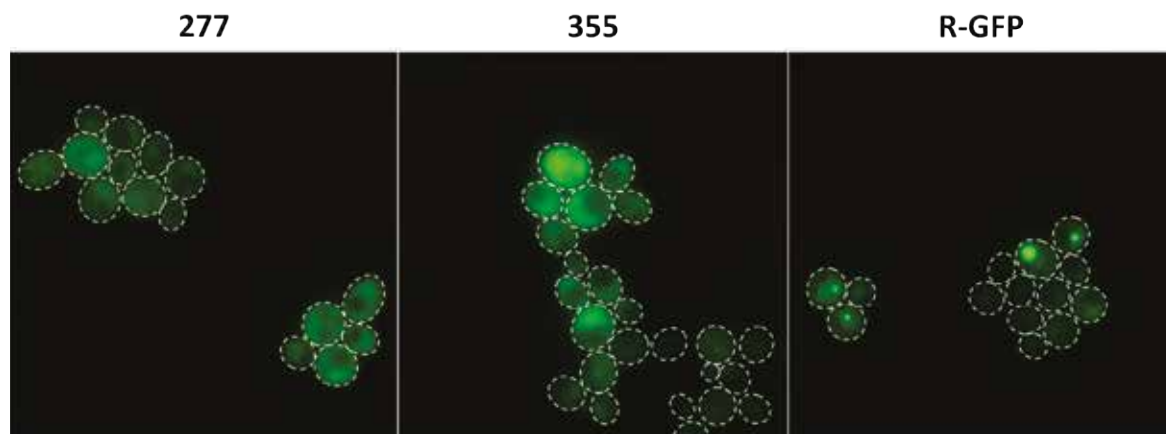


Рис. 2. Характер агрегации Rnq1 после одного дня индукции на галактозе. 277 и 355 – штаммы с укороченным с N-конца Rnq1 до 277-ой и 355-ой аминокислоты соответственно, R-GFP – штамм со сшитым GFP к С-концевой части Rnq1.

Диффузное свечение GFP в клетке позволяет говорить об отсутствии *de novo* образования приона в штаммах с 277-Rnq1 и 355-Rnq1, а концентрированное свечение в агрегатах, наоборот, о его возможном наличии в штамме Rnq1-GFP. На третий день индукции в галактозной среде характер агрегации сохранялся. Агрегаты в штамме с полноразмерным Rnq1-GFP оставались при добавлении 1,6-гександиола. Это явление свидетельствует в пользу предположения амилоидной природы светящихся агрегатов, что будет уточнено при дальнейшей проверке.

Основные выводы. Были получены штаммы с *277-RNQ1*, *355-RNQ1* и *RNQ1-GFP* в геноме. Было показано, что эти штаммы не наследуют прион [*PIN*⁺], то есть прионная укладка с Rnq1 дикого типа не передавалась на мутированные формы Rnq1. Образование [*PIN*⁺] *de novo* при сверхпродукции мутированных белков для 277-Rnq1 и 355-Rnq1 на третий день индукции на галактозе не наблюдалось. В дальнейшем мы планируем проверить возможность передачи прионной укладки с мутированных форм Rnq1 на исходный Rnq1, возможность образования приона [*PIN*⁺] на основе мутированных форм Rnq1, и в случае успеха картировать их прионные структуры, устойчивые к протеиназе К.

ЛИТЕРАТУРА

1. Sondheimer N., Lindquist S. Rnq1: an epigenetic modifier of protein function in yeast // *Molecular cell*. – 2000. – Vol. 5. – №. 1. – P. 163-172.
1. Salnikova A. B. et al. Nonsense suppression in yeast cells overproducing Sup35 (eRF3) is caused by its non-heritable amyloids // *Journal of Biological Chemistry*. – 2005. – Vol. 280. – № 10. – P. 8808-8812.
2. Wickner R. B., Dyda F., Tycko R. Amyloid of Rnq1p, the basis of the [*PIN*⁺] prion, has a parallel in-register β -sheet structure // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2008. – Vol. 105. – № 7. – P. 2403-2408.
3. Vitrenko Y. A. et al. Visualization of aggregation of the Rnq1 prion domain and cross-seeding interactions with Sup35NM // *Journal of Biological Chemistry*. – 2007. – Vol. 282. – № 3. – P. 1779-1787.
4. Kurahashi H. et al. A regulatory role of the Rnq1 nonprion domain for prion propagation and

polyglutamine aggregates // Molecular and cellular biology. – 2008. – Vol. 28. – № 10. – P. 3313-3323.

5. Kryndushkin D. S. et al. Yeast [PSI⁺] prion aggregates are formed by small Sup35 polymers fragmented by Hsp104 // Journal of Biological Chemistry. – 2003. – Vol. 278. – № 49. – P. 49636-49643.

6. Derkatch I. L. et al. Genesis and variability of [PSI] prion factors in *Saccharomyces cerevisiae* // Genetics. – 1996. – Vol. 144. – № 4. – P. 1375-1386.

Galliamov Artur Albertovich

RESEARCH CENTER OF BIOTECHNOLOGY RAS
THE CONTEXT OF PRIONOGENIC DOMAINS IS IMPORTANT
FOR THEIR PRION PROPERTIES MANIFESTATION ON THE EXAMPLE
OF PRION PROTEIN RNQ1

Abstract. When constructing prion proteins, the modularity of prionogenic domains is often assumed. In most yeast prion proteins, the prionogenic domain is located on the amino-terminus or carboxyl-terminus of the protein. However, once at the opposite end of the protein or inside fusion with another protein, the prion domain can change its properties: stopping the formation of a prion or the transfer of prion transmission from the original prion protein to a chimeric protein with the same prion domain. The influence of the context of the flanking sequences of the prionogenic domain can be significant. Using the example of the Rnq1 protein, in which the prionogenic domain is located on the carboxyl-terminus, we show a change in the prion properties of the prionogenic domain with different mutation variants: 277-Rnq1, 355-Rnq1 and Rnq1-GFP.

Keywords: prion, yeast prion, amyloid, prion domain, Rnq1, [RNQ⁺].

Галуза Олеся Александровна

аспирант ФИЦ Биотехнологии РАН 2 года обучения

профиль 1.5.11 Микробиология

e-mail: olesya_galuza@mail.ru

Научный руководитель

Николаев Юрий Александрович

доктор биологических наук,

зав. лабораторией выживаемости микроорганизмов



ВЫЖИВАЕМОСТЬ МОЛОЧНОКИСЛЫХ БАКТЕРИЙ В ГЕЛЯХ ОРГАНИЧЕСКОГО И СМЕШАННОГО СОСТАВА

Аннотация. Исследования в рамках кандидатской диссертации ставят целью поиск новых эффективных способов поддержания жизнеспособности молочнокислых бактерий (МКБ), используемых в продукции функционального питания и биопрепаратах.

Впервые предложено пролонгированное хранение МКБ при иммобилизации в гели из камедей растительного и бактериального происхождения. Получены результаты длительного хранения МКБ, иммобилизованных в силанольно-гуматные гели с разными органическими кислотами. Для *Enterococcus faecium* при хранении в течение двух месяцев наилучшим эффектом обладали аскорбиновая, яблочная и молочная кислоты. Для *Lactobacillus paracasei* при хранении в течение пяти месяцев — яблочная и молочная кислоты.

Ключевые слова: молочнокислые бактерии, пищевые гели, геллановая камедь, гуаровая камедь, ксантановая камедь, силанольно-гуматные гели, выживаемость бактерий, длительное хранение, выживаемость

Молочнокислые бактерии (МКБ) являются важной группой бактерий-симбионтов, получивших широкое применение благодаря своим полезным свойствам в промышленности (производство биологически-активных веществ и продукции функционального назначения), медицине (энтеральное и диетическое питание), фармакологии (пробиотики и метабиотики) и сельском хозяйстве (препараты для силосования и восстановления нормобиоза животных) [1]. В настоящее время известны разнообразные положительные эффекты молочнокислых пробиотических бактерий, подтвержденные многочисленными клиническими исследованиями. МКБ играют важную роль в поддержании колонизационной резистентности — оказывают выраженную антагонистическую активность, продуцируя бактериоцины и другие важные противомикробные вещества, поддерживают естественную микрофлору кишечника, помогают усваивать микроэлементы из пищи, участвуют в синтезе витаминов и аминокислот, повышают иммунитет, сбраживают лактозу с образованием молочной кислоты и других продуктов [2, 3].

Существенным недостатком МКБ как биотехнологических объектов является снижение количества их живых клеток в биопрепаратах и продуктах, поэтому высок интерес к изучению адаптационных механизмов молочнокислых бактерий. Понимание механизмов длительного выживания, в том числе — перехода жизнеспособных клеток бактерий в покоящееся состояние и факторов, которые индуцируют данный процесс, способствуют разработке новых подходов в улучшении условий хранения пробиотической продукции и бакпрепаратов, а также их более эффективного применения [4].

Самый распространённый метод получения биопрепаратов, сушка, является затратным и не всегда обеспечивает сохранность всей биомассы.

Одним из способов пролонгирования технологических свойств клеток бактерий является иммобилизация в различные по составу гели, преимущества которых заключаются в следующем [5, 6]:

1) Позволяют сохранять длительную активность иммобилизованных клеток, защищая от физико-химических изменений (рН, температура и др.).

- 2) Обеспечивают более высокую плотность клеток, что приводит к их увеличению продуктивности.
- 3) Повышают устойчивость к высокой концентрации субстрата и ингибированию конечным продуктом.
- 4) Снижают риски микробной контаминации из-за высокой плотности клеток и повышенной ферментативной активности.

Имобилизации в гели широко не применяется для продления жизнеспособности биопрепаратов на основе бактерий. Известны лишь единичные работы, например, по иммобилизации углеводородокисляющих бактерий в гели на основе силанольных производных гуминовых веществ [7, 8].

Задачами данной работы стали разработка эффективных способов иммобилизации МКБ в биосовместимые гели и исследование механизмов длительного поддержания их жизнеспособности.

В работе использованы два типа гелей: 1) камеди (гуаровая, геллановая и ксантановая) в концентрации 10 г/л; 2) гель на основе органосиланов (3-аминопропилтриэтоксисилана), гуматов (Паохумус, ООО Родагро), и органических кислот, используемых в качестве титранта. *Объекты исследования* – штаммы молочнокислых бактерий *Lactobacillus paracasei* AK508 и *Enterococcus faecium* M3185.

Камеди, гетерополисахариды микробного или растительного происхождения, широко используются в пищевой промышленности в качестве загустителей и стабилизаторов. При гидратации камеди способны образовывать гели, которые целесообразно применять для иммобилизации клеток молочнокислых бактерий.

При иммобилизации клеток бактерий *E. faecium* в гели из камедей и последующей инкубации в течение месяца наибольшая доля жизнеспособных клеток сохранялась в геллановой, гуаровой и ксантановой камеди. В геллановой количество КОЕ было в 11,2 раза выше, чем в контроле, в гуаровой — в 4,4 раза, в ксантановой — в 1,4 раза (Рис. 1). При инкубации в течение трех месяцев титр жизнеспособных клеток в геллановой камеди был на уровне контроля, а в ксантановой и гуаровой камеди — в 1,52 раза больше.

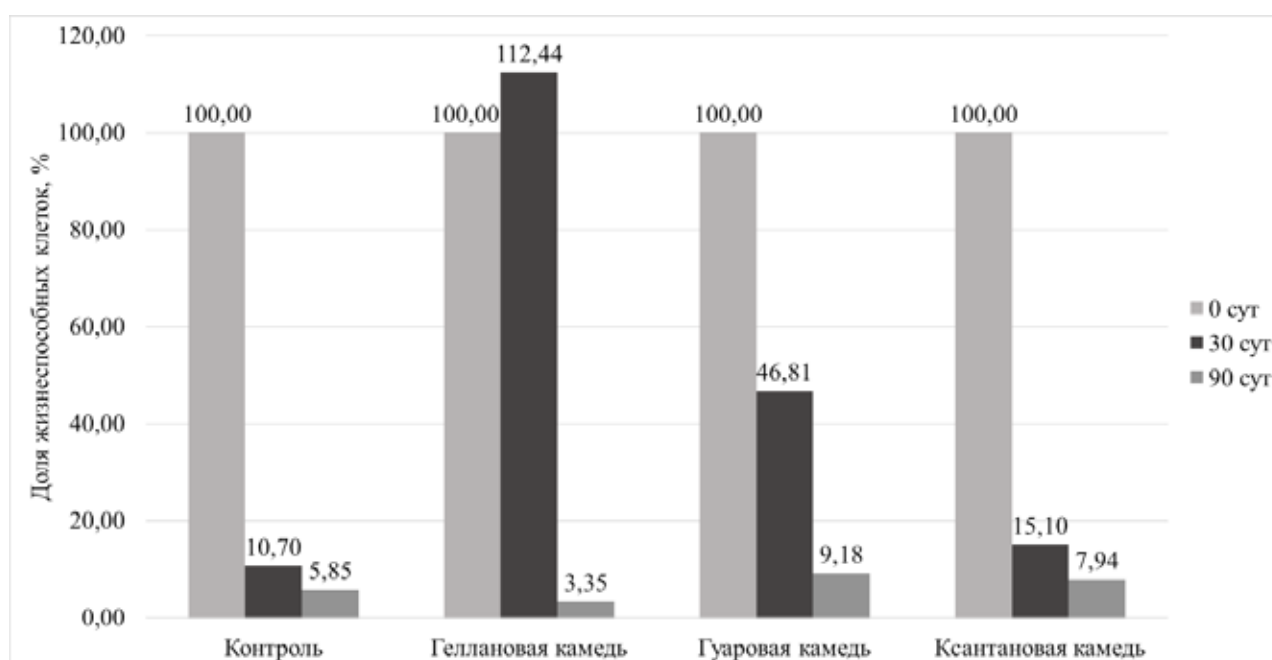


Рис.1. Доли жизнеспособных клеток *E. faecium*, иммобилизованных в гели из камедей, при хранении в течение трех месяцев, %.

При иммобилизации культуры *L. paracasei* в гели из камедей и последующей инкубации в течение месяца наилучший результат показала геллановая камедь. Доля жизнеспособных клеток была в 2 раза больше, чем в контроле. Через два месяца это значение увеличилось и было 9 раз выше, чем в контрольном варианте, а в гуаровой и ксантановой камеди - в 3 раза (Рис. 2).

Геллановая камедь оказывает лучший пролонгирующий эффект на жизнеспособность клеток МКБ. Это можно объяснить иммобилизацией клеток МКБ на рыхлые уплотнения полимера (Рис.

3), и переходу в состояние биопленки [5]. Кроме того, полисахариды могут быть источниками питания для бактерий, что способствует пролонгированию их жизнеспособности [9].

Гуаровая камедь оказывает пролонгирующее действие на выживание *E. faecium* на протяжении трех месяцев хранения культуры, что, очевидно, обусловлено составом полимера (галактозы), которая высвобождается в среду под воздействием гидролаз бактерий и служит источником энергии для поддержания их жизнеспособности [9].

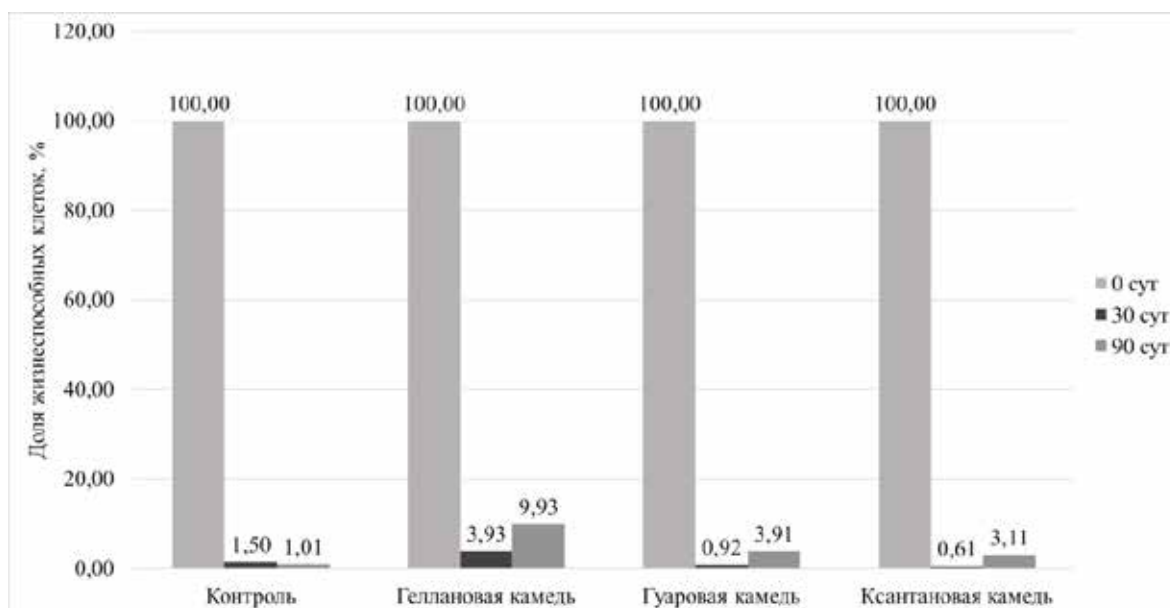


Рис.2. Доли жизнеспособных клеток *L. paracasei*, иммобилизованных в гели из камедей, при хранении в течение трех месяцев, %

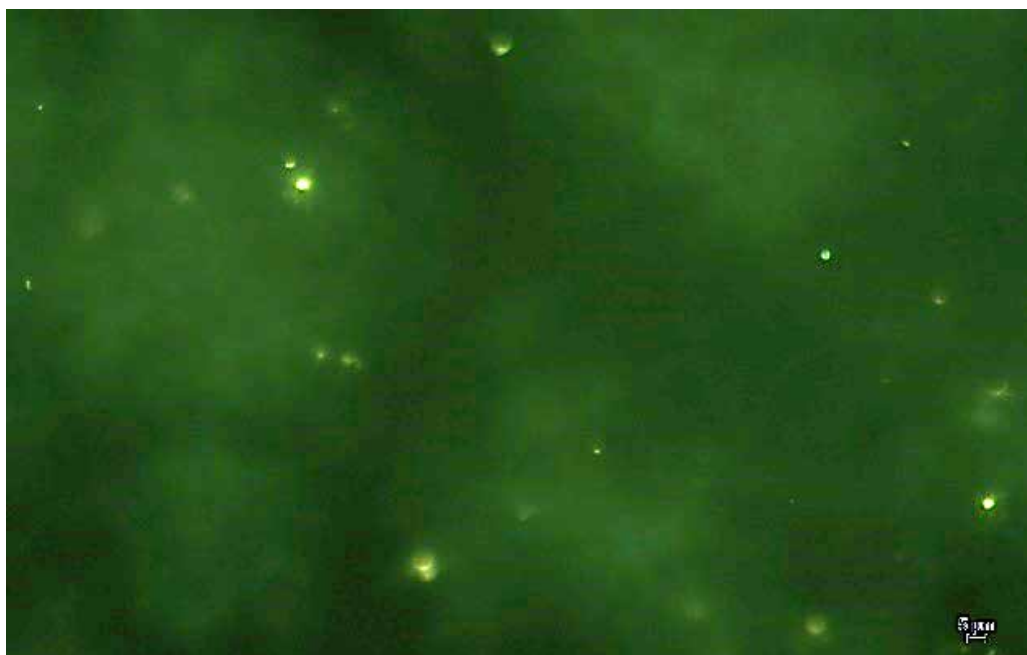


Рис.3. Нативный препарат геллановой камеди (уплотнения из полимера), флуоресцентная микроскопия, краситель акридиновый оранжевый, 5 нм.

Пищевые гели из геллановой и гуаровой камеди способствуют сохранению титра жизнеспособных клеток МКБ на уровне 10^7 КОЕ/мл, предъявляемом к качеству кисломолочной продукции, в течение 30-90 суток. Гели могут быть рекомендованы для использования в промышленности.

Были продолжены исследования механизмов сохранения жизнеспособности МКБ, иммобилизованных в силанольно-гуматные гели.

Показано, что при иммобилизации культуры *E. faecium* в силанольно-гуматные гели и по-

следующем инкубировании в течение двух месяцев, наибольшее число жизнеспособных клеток сохраняется в гелях с добавлением аскорбиновой, яблочной и молочной кислоты. Их доля была в 63,3; 20,7 и 33,6 раз выше, чем в контрольном варианте соответственно. После хранения в течение пяти месяцев доля жизнеспособных клеток во всех образцах значительно снизилась. Добавление в качестве титрантов в гели лимонной и уксусной кислот способствует сохранению жизнеспособности *E. faecium* лишь на протяжении одного месяца (Рис. 4).

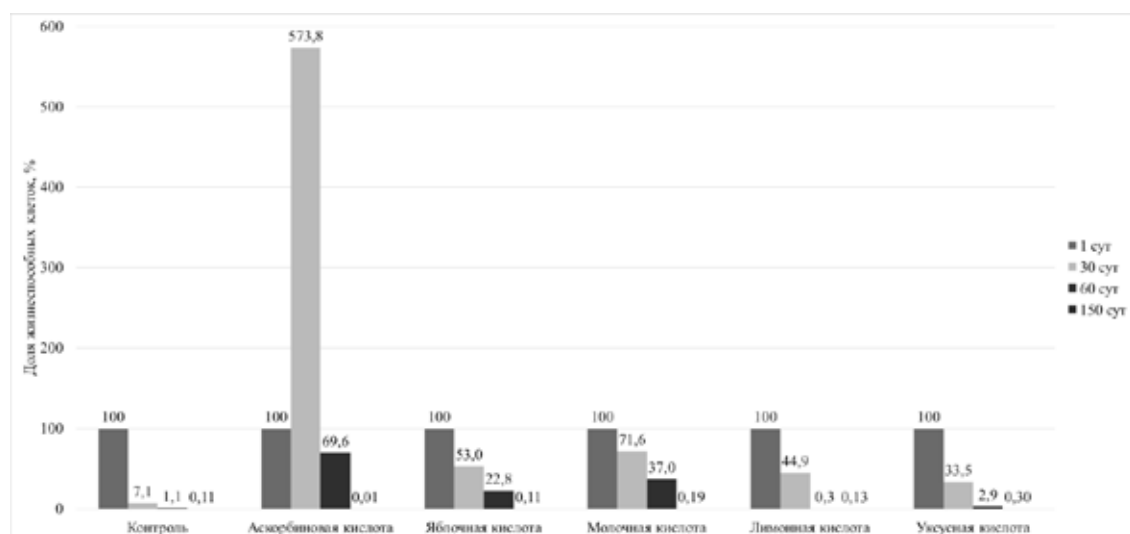


Рис. 4. Доли жизнеспособных клеток *E. faecium*, иммобилизованных в силанольно-гуматные гели с различными органическими кислотами, при хранении в течение шести месяцев, %

При иммобилизации культуры *L. paracasei* и последующем инкубировании в течение двух и шести месяцев лучшее влияние на сохранение жизнеспособности клеток оказывает присутствие яблочной и молочной кислот. Доля жизнеспособных клеток на второй месяц хранения с яблочной кислотой была в 205,4 раз выше, чем в контрольном варианте, а с молочной кислотой — в 75,7 раз. На шестой месяц — в 234,2 и 101 раз соответственно. Добавление в качестве титранта лимонной кислоты действует положительно лишь в течение одного месяца и сохраняет титр жизнеспособных клеток в 142 раза больший, чем в контроле (Рис. 5).

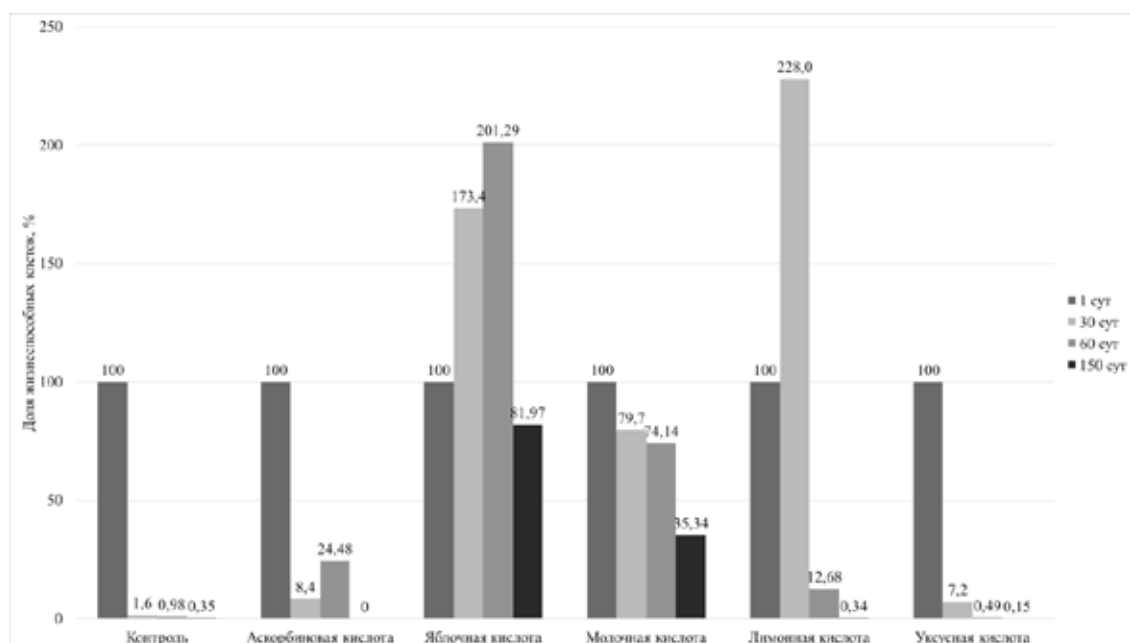


Рис. 5. Доли жизнеспособных клеток *L. paracasei*, иммобилизованных в силанольно-гуматные гели с различными органическими кислотами, при хранении в течение пяти месяцев, %

Основные выводы. Иммобилизация клеток МКБ в геллановую и гуаровую камеди позволяет повысить титр жизнеспособных клеток до 11 раз по сравнению с нестабилизированным контрольным препаратом в течение двух месяцев. Эффективность использования камедей как стабилизаторов препаратов МКБ зависит от состава камедей и используемого микроорганизма.

Иммобилизация клеток МКБ в силанольно-гуматные гели с органическими кислотами в качестве титрантов позволяет сохранить титр жизнеспособных клеток в течение длительного времени (до 5 мес) на 1-2 порядка выше, чем в контрольном образце. Эффективность поддержания высокого титра жизнеспособных клеток зависит от типа использованной кислоты, которая способна быть источником энергии для клеток.

Причинами длительного выживания МКБ в гелях могут быть: 1) нахождение в состоянии гипометаболизма с медленным потреблением источников углерода и энергии; 2) нахождение в состоянии биоплёночного фенотипа, характеризующегося повышенной устойчивостью к стрессорам.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ефременко Е.Н. Иммобилизованные клетки: биокатализаторы и процессы: монография // М.: РИОР, – 2018. – С. 523.
2. Квасников В.И. Молочнокислые бактерии и пути их использования / В. И. Квасников, О.А. Нестеренко. – Москва: Наука, – 1975. – 384 с.
3. Новые биоконструктивные материалы, включающие углеводородокисляющие микроорганизмы, и их потенциал для деградации нефтепродуктов / Ю.А. Николаев, И.А. Борзенков, Н.Г. Лойко [и др.] // Микробиология. – 2021. – Т. 90, № 6. – С. 692-705.
4. Патент № 2757600 С1 Российская Федерация, МПК C12N 1/20. Способ получения биопрепаратов живых микроорганизмов с продленным сроком сохранения высокого титра жизнеспособных клеток путём иммобилизации в гели на основе силанольных производных гуминовых веществ: № 2021101780: заявл. 27.01.2021: опубл. 19.10.2021 / Николаев Ю.А., Борзенков И.А., Демкина Е.В., Лойко Н.Г., Канапацкий Т.А., Перминова И.В., Воликов А. Б., Хрептугова А. Н., Галуза О. А. – 2 с.
5. Тюрин, М. В. Антибиотикорезистентность и антагонистическая активность лактобацилл: специальность 14.00.31 «Медицинские науки»: автореферат диссертации на соискание ученой степени кандидата медицинских наук / Тюрин Михаил Владимирович. – Москва, – 1990. – 21 с.
6. Шендеров, Б.А. Медицинская микробная экология и функциональное питание / Б. А. Шендеров. – Т. 3. – Москва: Грантъ, – 1998. – С. 287.
7. Mitropoulou G. Immobilization Technologies in Probiotic Food Production / G. Mitropoulou, V.Nedovic, A. Goyal, Y. Kourkoutas // Journal of nutrition and metabolism. – 2013. – №5. – P. 1–15.
8. Viable but non-culturable and persistence describe the same bacterial stress state / J.S. Kim, N. Chowdhury, R. Yamasaki, T.K. Wood // Environ Microbiol.. – 2018. – V. 20, № 6. – P. 2038–2048.
9. Phillips, G.O. Handbook of Hydrocolloids: Second edition / G.O. Phillips, P.A. Williams. – Oxford: Woodhead Publishing, – 2009. – P. 924.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ РАБОТЫ

Тезисы

1. Галуза О.А. Выживаемость молочнокислых бактерий в гелях органического и смешанного состава // Сборник тезисов отчетной конференции аспирантов ФИЦ Биотехнологии РАН (Москва, 23-30 июня 2022 г.) / под ред. В. О. Попова, А. Н. Федорова; сост. Е. С. Титова. – М.: ВАШ ФОРМАТ. – 2022. – С. 144-149 (тезисы и устный доклад).
2. Галуза О. А., Ковина Н. Е. Новый способ продления выживаемости молочнокислых бактерий в пищевых продуктах // Международная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов-2023», Москва, 10-21 апреля 2023 (постерный доклад).
3. Galuza O. A. Survival of lactic acid bacteria in silanol-humane gels // Seventh International

Galuza Olesya Alexandrovna

RESEARCH CENTER OF BIOTECHNOLOGY RAN
SURVIVAL OF LACTIC ACID BACTERIA IN ORGANIC AND MIXED GELS

Abstract. Research within the framework of the PhD thesis aims to find new effective ways to maintain the viability of lactic acid bacteria (LAB) used in functional nutrition products and biologics.

For the first time, prolonged storage of LAB during immobilization in a gel made of gums of plant and bacterial origin was proposed. The results of long-term storage of LAB immobilized in silanol-humane gels with various organic acids were obtained. For *Enterococcus faecium*, when stored for two months, ascorbic, malic and lactic acids had the best effect. For *Lactobacillus paracasei*, when stored for five months, malic and lactic acids had the best effect.

Keywords: lactic acid bacteria, food gels, gellan gum, guar gum, xanthan gum, silanol- humic gels, bacterial survival, long-term storage, survival.

Калинин Данил Сергеевич

аспирант ФИЦ Биотехнологии РАН 2 года обучения

профиль 1.5.3 Молекулярная биология

e-mail: 309163@gmail.com

Научные руководители

Федоров Алексей Николаевич

доктор биологических наук,

г.н.с. лаборатории молекулярной биотехнологии

Грановский Игорь Эдуардович

кандидат биологических наук,

с.н.с. лаборатории молекулярной биотехнологии



РАЗРАБОТКА МОДЕЛИ ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ СПОСОБНОСТИ КОЛИЦИНА E9 ПОДАВЛЯТЬ РЕПРОДУКЦИЮ ВИРУСА АЧС В КУЛЬТУРЕ КЛЕТОК ЖИВОТНЫХ

Аннотация. Работа направлена на исследование возможности использования неспецифической нуклеазы колицина E9 для нарушения репликации вируса африканской чумы свиней в культуре клеток млекопитающих. На основе лентивирусных векторов получены генно-инженерные конструкции, кодирующие колицин E9 с различной локализацией в клетке: заякоренный на цитоплазматической стороне ЭПР, внутри ЭПР и в цитоплазме. Также, на основе лентивирусных векторов получены генно-инженерные конструкции, кодирующие белок иммунитета Im9 дикого типа или с сайтами протеазы pS273R вируса АЧС с локализацией в ядре. Данные конструкции будут использованы для трансдукции клеток млекопитающих с целью получения стабильных клеточных линий. Разработана система ПЦР-РВ для количественной оценки репликации вируса АЧС. Для анализа экспрессии и локализации в клетках млекопитающих были получены антитела против колицина E9 и протеазы pS273R. Разработан метод для определения ДНКазной активности в режиме реального времени.

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

Главной целью работы является разработка новых молекулярных механизмов устойчивости животных к вирусным инфекциям на клеточном уровне на примере вируса африканской чумы свиней (АЧС). Будет апробирован подход, основанный на деградации вирусной ДНК неспецифической бактериальной нуклеазой колицин E9 (Col E9). Природным ингибитором активности колицина E9 является белок иммунитета Im9. Ранее в нашей лаборатории был сконструирован рекомбинантный белок иммунитета mIm9, который способен специфически расщепляться протеазой pS273R вируса АЧС. На следующем этапе гены колицина и рекомбинантного белка иммунитета планируется ввести в геном клетки свиньи. При этом, белок Col E9 будет содержать сигналы для локализации в потенциальных сайтах репликации вируса АЧС. Предполагается, что деградация ДНК вируса АЧС неспецифической нуклеазой приведет к остановке репликации вируса и/или формированию неинфекционных вирусных частиц. Белок иммунитета в разрабатываемом подходе должен являться гарантом безопасности для клетки на стадии деления, связывая колицин и, тем самым, защищая геномную ДНК от деградации. Планируется, что белок иммунитета будет содержать сигнал ядерной локализации.

В качестве подхода для получения клеточных линий, стабильно продуцирующих ДНКазу колицин E9 и белок иммунитета, была выбрана трансдукция с использованием ленти-

вирусных частиц. Вектор pTRIPZ(M)-сМус был использован для получения экспрессионных конструкций. Данный вектор содержит длинные концевые повторы (LTR) и сигнал упаковки РНК ВИЧ-1. В данном векторе экспрессия рекомбинантных генов находится под контролем *rtTA*-зависимой системы, где индуктором является доксициклин. На основе этого вектора были получены три конструкции, кодирующих колицин Е9. В двух конструкциях кодируемый колицин был слит либо с сигнальным пептидом и сигналом удержания в ЭПР для локализации белка внутри ЭПР, либо с трансмембранным доменом гемоксигеназы 1 (НО-1) для закоривания белка на цитоплазматической поверхности ЭПР. Такие варианты локализации колицина Е9 были выбраны не случайно, поскольку вирус АЧС в процессе репликации формирует в цитоплазме «вирусные фабрики», и при этом использует мембраны ЭПР в качестве предшественника собственной внутренней мембраны. Кодируемый третьей конструкцией колицин Е9 не содержит каких-либо дополнительных сигналов, что предполагает его локализацию в цитоплазме. Для визуализации белков внутри клетки во всех конструкциях кодируемый колицин был слит с сайтом протеазы pS273R вируса АЧС и с зеленым флуоресцентным белком EGFP. Предполагается, что отщепление колицина Е9 вирусной протеазой может способствовать его доступу к вирусной ДНК. С геном, кодирующим белок иммунитета Im9 или его варианта mIm9, способного расщепляться вирусной протеазой, была слита последовательность, кодирующая сигнал локализации в ядре (NLS). Кроме того, в качестве белка-партнера к белкам иммунитета был добавлен желтый флуоресцентный белок tagYFP (Рис. 1). Для получения комбинированных вариантов клеточных линий, одновременно продуцирующих колицин и белок иммунитета, в векторе pTRIPZ(M)-сМус ген устойчивости к пуромицину на был замещен на ген устойчивости к неомицину. Получение и последующую наработку генно-инженерных конструкций, кодирующих колицин Е9, ввиду токсичности последнего, проводили в клетках *E. coli*, содержащих совместимую плазмиду с геном белка иммунитета Im9 под контролем *lac*-промотора.

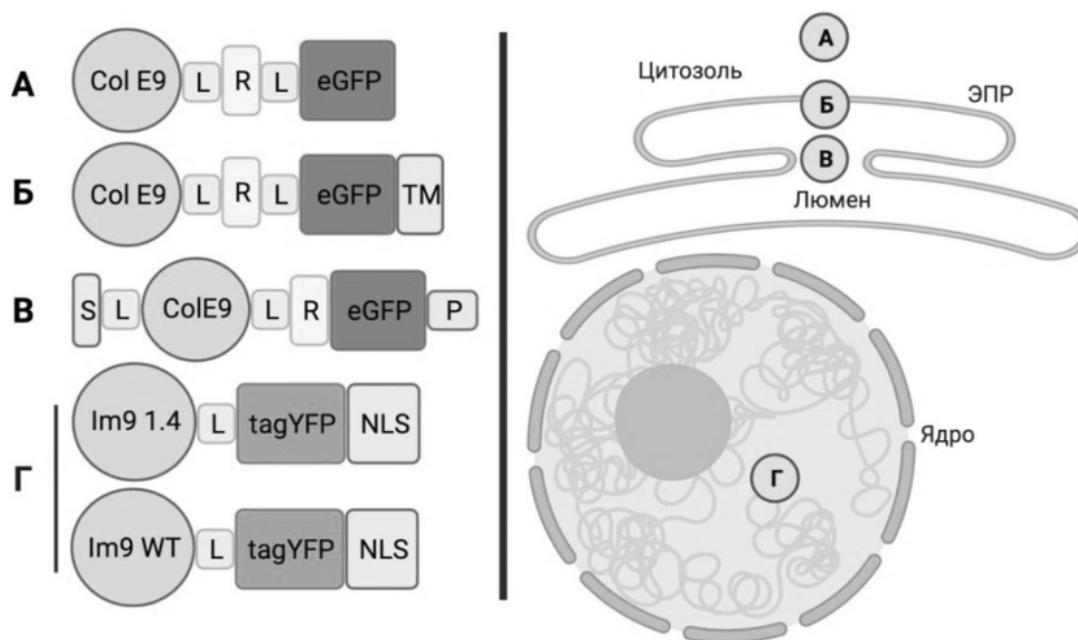


Рис. 1. Схематическое изображение рекомбинантных белков и их предполагаемая локализация в клетке: Col E9 - колицин Е9; L - линкер; R - сайт вирусной протеазы pS273R; eGFP - зеленый флуоресцентный белок; TM - трансмембранный домен гемоксигеназы 1 (НО-1); S - сигнальным пептид; P - сигнал удержания в ЭПР; Im9 WT и Im9 1.4 - белки иммунитета дикого типа и способного расщепляться протеазой pS273R АЧС, соответственно; NLS-сигнал экспорта в ядро.

Для анализа репродукции вируса АЧС была отработана система TaqMan ПЦР-РВ. Были составлены праймеры и зонды к гену p72 вируса АЧС и к гену *UvsX* фага Т4. Бактериофаг Т4 будет использован для контроля процедуры выделения вирусной ДНК. Анализ калибровочных кривых

мультиплексной ПЦР показал высокую и близкую по значению эффективность ПЦР для каждого маркера (Рис 2).

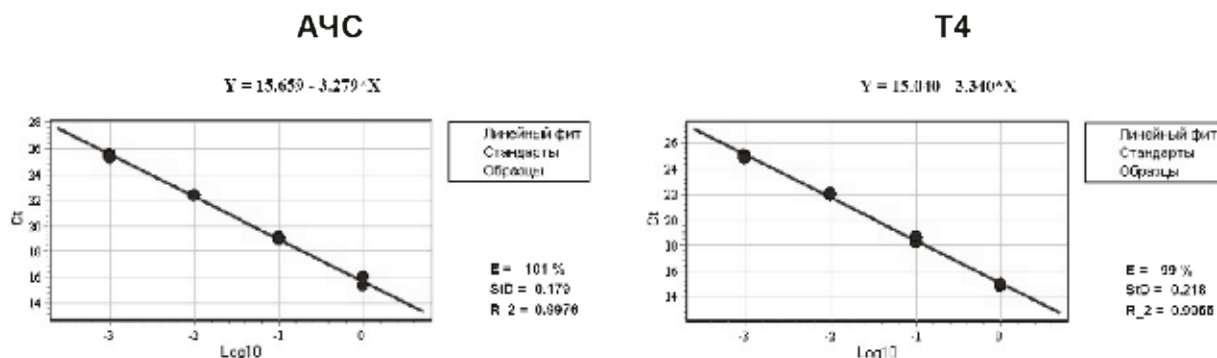


Рис. 2. Калибровочные графики ПЦР-РВ маркеров p72 вируса АЧС и *uvsX* фага Т4.

Был разработан и опробован простой, воспроизводимый метод детекции неспецифической ДНКазной активности в присутствии интеркалирующего красителя EvaGreen. Предлагаемый нами подход основывается на анализе ДНКазной активности с использованием в качестве субстрата плазмидной ДНК или двунитевого олигонуклеотида в присутствии интеркалирующего красителя, который изменяет свои флуоресцентные свойства при связывании с ДНК. Образец, содержащий интактную субстратную ДНК в комплексе с интеркалирующим красителем, флуоресцирует при облучении светом с заданной (возбуждающей) длиной волны. При деградации ДНК под действием неспецифической ДНКазы происходит высвобождение интеркалирующего красителя и, как следствие, снижение уровня флуоресценции.

Получены препараты поликлональных антител к колицину E9 и вирусной протеазе pS273R вируса АЧС (Рис. 3), для этого был наработан белок колицина E9, несущий мутацию в активном центре, и наработана и очищена вирусная протеаза pS273R.

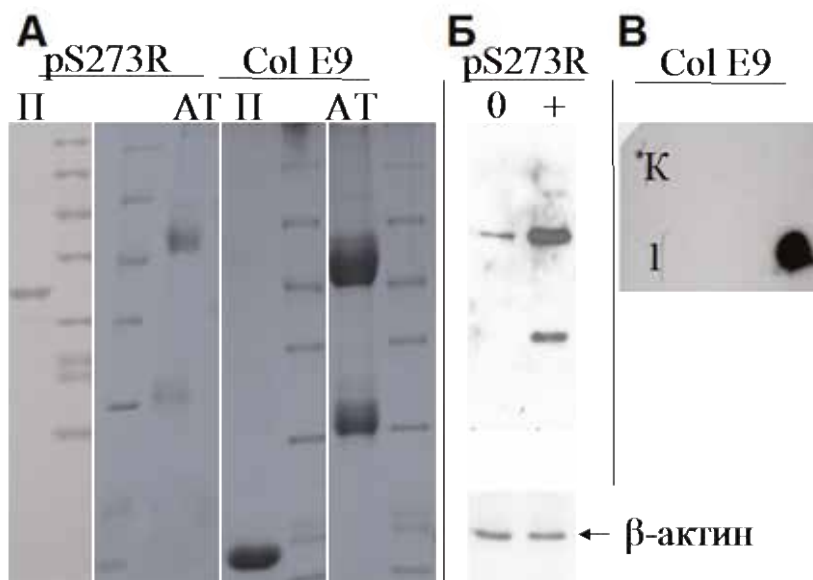


Рис. 3. А. Электрофореграммы очищенных препаратов белков каталитического мутанта колицина E9, протеазы pS273R вируса АЧС (П) и очищенных антител к ним (АТ). Б. Вестерн-блоттинг белков стабильных клеточных линий HEK293Т с геном протеазы pS273R вируса АЧС, с антителами к этому белку:

«0» - неиндуцированная культура, «+» - индуцированная культура. В. Дот-блоттинг препарата каталитического мутанта колицина E9 с антителами к этому белку: К - реакция с антителами из неиммунизированных мышей; 1 - реакция с антителами из мышей, иммунизированных препаратом каталитического мутанта колицина E9.

Основные выводы. Сконструированы и наработаны вектора для интеграции в геном клеток млекопитающих генов колицина E9 и белка иммунитета с различной локализацией в клетке. Получены препараты поликлональных антител к колицину E9 и вирусной протеазе pS273R вируса АЧС; для этого сконструирован и наработан белок колицина E9 несущий мутацию в активном центре, а также наработана и очищена вирусная протеаза pS273R вируса АЧС. Отработана система ПЦР-РВ для количественной оценки репликации вируса АЧС. Разработан метод для определения неспецифической ДНКазной активности в режиме реального времени.

ОСНОВНЫЕ ДОСТИЖЕНИЯ, ПАТЕНТЫ (ПРИ НАЛИЧИИ)

1. Патент (Способ получения каспазы-3 RU 2 792 795 C1).
2. Патент (Метод определения ДНКазной активности в режиме реального времени) № 2021138490/10(080616).

Kalinin Danil Sergeevich

RESEARCH CENTER OF BIOTECHNOLOGY RAS DEVELOPMENT OF A MODEL TO STUDY THE ABILITY OF COLICIN E9 TO INHIBIT THE REPRODUCTION OF THE HPC VIRUS IN ANIMAL CELL CULTURE

Abstract. This work is aimed to investigate the possibility of using the nonspecific nuclease colicin E9 to inhibit the replication of the African swine fever virus in mammalian cell culture. Genetically engineered constructs encoding colicin E9 with different localization in the cell were obtained on the basis of lentiviral vectors: anchored on the cytoplasmic side of the endoplasmic reticulum (ER), inside the ER and in the cytoplasm. Also, genetically engineered constructs encoding the immunity protein Im9 of wild-type or with protease sites pS273R of ASF virus with localization in the nucleus were obtained on the basis of lentiviral vectors. These constructs will be used for transduction of mammalian cells to produce stable cell lines. A PCR-RV system has been developed to quantify ASF virus replication. Antibodies against colicin E9 and the pS273R protease were obtained to analyze expression and localization in mammalian cells. A method was developed to determine DNase activity in real time.

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

Кузнецов Александр Сергеевич

аспирант ФИЦ Биотехнологии РАН 2 года обучения

специальность 1.5.11 Микробиология

e-mail: alexbluesking@gmail.com

Научный руководитель

Летаров Андрей Викторович

доктор биологических наук,

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



ПОЛУЧЕНИЕ ВЫСОКОКОНЦЕНТРИРОВАННЫХ ОЧИЩЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ STX-КОНВЕРТИРУЮЩЕГО БАКТЕРИОФАГА Ф24В И ТРЕХМЕРНАЯ РЕКОНСТРУКЦИЯ ВИРИОНОВ НА ОСНОВЕ АНАЛИЗА КРИО-ЭМ

Аннотация. *Stx-конвертирующие колифаги обуславливают токсигенность патогенных изолятов *Escherichia coli*, относящихся преимущественно к серотипу O157, однако лизогенная конверсия, приводящая к образованию шигатоксигенных форм, возможна и в случае других серотипов бактерии-хозяина. Механизмы адсорбции Stx-фагов на поверхности клеток разных O-серотипов, ведущие к образованию токсигенных лизогенов, остаются невыясненными. Одним из таких фагов является подовирус ф24В, который способен заражать широкий спектр не содержащих O-антиген штаммов *Escherichia coli*. Адсорбционный аппарат данного вируса представлен рецептор-распознающими белками (RBPs) с предсказанными функциями: *gp56* может участвовать в связывании конечного рецептора, в то время как белок хвостовых шипов *gp61*, вероятно, связывает неизвестный первичный рецептор. Кримо-ЭМ реконструкционный анализ вириона подтверждает предполагаемые положения RBPs, а именно наличие у фага осевой фибриллы и шести хвостовых шипов. Полученная впервые трехмерная структура вириона ф24В детально отражает морфологию исследуемого бактериофага.*

Ключевые слова: *Stx-фаги, крио-ЭМ, 3D-реконструкция вириона, адсорбция бактериофагов, RBPs, ЛПС, O-антиген.*

Stx-конвертирующие бактериофаги ассоциированы с большим числом опасных штаммов энтеропатогенных *Escherichia coli* (EPEC), а именно шигатоксигенных *E. coli* (STEC), в основном относящихся к серотипу O157:H7. Stx-фаги кодируют шигаподобный токсин, экспрессируемый при индукции Stx-профагов из STEC-лизогенов. Некоторые штаммы STEC являются возбудителями тяжелых токсикоинфекций у людей и источниками пищевых инфекций у животных, что часто становится причиной вынужденного забоя колонизированного этими штаммами скота, и существенных экономических потерь в сельском хозяйстве [1]. Однако умеренный Stx-конвертирующий бактериофаг ф24В способен лизогенизировать разные штаммы *E. coli*, не относящиеся к упомянутым серотипам. Известно, что конечным рецептором фага ф24В является консервативный белок внешней мембраны *BamA*. При этом остаются непонятными механизмы возможного преодоления в процессе адсорбции этого вируса неспецифического экранирования поверхности внешней мембраны, обусловленного O-антигенами различных типов.

Процесс адсорбции хвостатых бактериофагов на поверхности клетки-мишени во многом определяется структурой адсорбционного аппарата — части хвоста, несущей рецептор-распознающие белки, или фаговые адгезины (receptor binding proteins, RBPs). Для подовирусов характерно наличие короткого хвоста, присоединенного к поральной вершине капсида через «привратник» (connector) и включа-

ющего конструкцию типа «сопло» (nozzle) [2]. Эти и другие белковые комплексы используются в качестве платформы для прикрепления различных RBPs. Например, адсорбционный аппарат бактериофага T7 включает боковые фибриллы, обуславливающие его перемещение по поверхности клетки хозяина за счет обратимого связывания фагом первичного рецептора — кора ЛПС [3]. Адгезины бактериофага P22 представлены шестью образованными белком gp9 тримерными хвостовыми шипами, осуществляющими обратимое распознавание и деполимеризацию первичного рецептора (О-антигена), и осевой фибриллой (хвостовой иглой) — тримером белка gp26, ответственным за необратимую адсорбцию вируса [4].

В геноме бактериофага $\phi 24B$ аннотированы гены потенциальных RBPs: *g56* и *g61*. Мы полагаем, что белок gp61 образует хвостовые шипы, ответственные за распознавание пока не установленного первичного рецептора. Это предположение подтверждается высокой степенью гомологии С-концевых рецептор-распознающих участков gp61 и боковых фибрилл бактериофага λ_{2B8} , адсорбция которого не зависела от наличия на поверхности клеток-хозяев дикого типа белка BamA — конечного рецептора фага $\phi 24B$.

На поздних этапах адсорбции фага $\phi 24B$ белок BamA, вероятно, необратимо связывается осевой фибриллой, образованной тримером gp56. Gp56 не имеет белков-гомологов, однако поиск по структурным элементам среди белков выявил предположительное родство с белком gp12 подовируса Pam1 (Рис. 1), инфицирующего цианобактерий *Pseudoanabaena mucicola* [5].

Одним из наиболее эффективных методов определения структуры адсорбционного аппарата вируса и положения его RBPs является трехмерная реконструкция вириона или его частей на основании результатов криоэлектронной микроскопии. Для бактериофага $\phi 24B$ данный метод долгое время не мог быть использован в связи с ограничениями количества фаговых частиц в конечном препарате. Благодаря оптимизации способов получения фаговых лизатов и внедрению новых стадий в процесс их концентрирования и очистки мы преодолели технические затруднения и получили хорошие изображения фаговых частиц методами просвечивающей электронной микроскопии (ТЕМ) (Рис. 2) и крио-ЭМ. На основе результатов криоэлектронной микроскопии была построена предварительная трехмерная реконструкция вирусных частиц (Рис. 3).

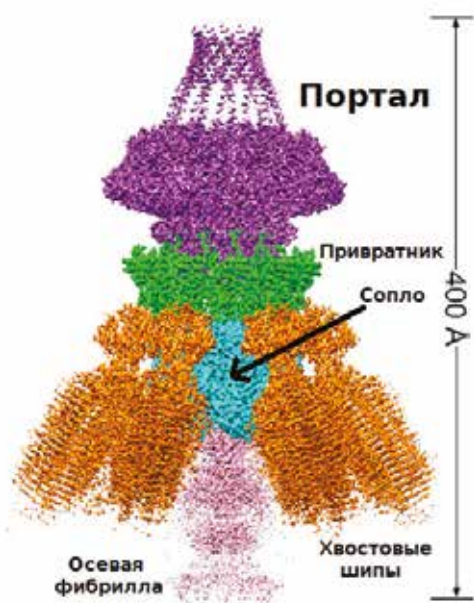


Рис. 1. Архитектура хвоста цианофага Pam1 (по Zhang *et al.*, 2022, [5])

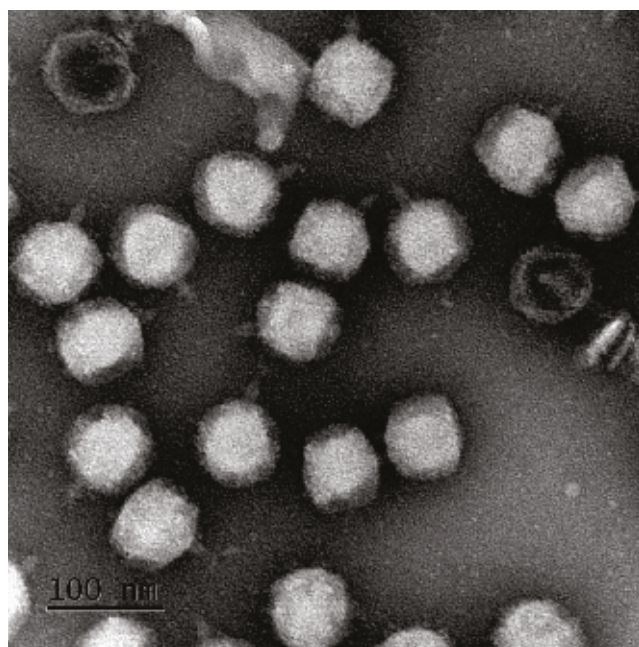


Рис. 2. Электронная микрофотография вирионов $\phi 24B$

Ранние попытки получения препарата фага $\phi 24B$ для электронной микроскопии показали, что вирусные частицы соочищаются с бактериальными жгутиками, поэтому фаговые лизаты получали индукцией профагов из лизогенов штамма 4sR:24B, лишённого жгутиков. Индукцию профагов про-

изводили с использованием митомицина С и при низкой аэрации среды. Далее фаговые лизаты осветляли путем центрифугирования при $7000\times g$ в течение 20 минут. Все последующие стадии ультрацентрифугирования проводились при $75000\times g$ в течение часа. Осветленные лизаты концентрировали ультрацентрифугированием в угловом роторе Beckman 45Ti. Далее сконцентрированные образцы подвергали ультрацентрифугированию в градиенте вязкости сахарозы в бакетном роторе Beckman SW50.2, после чего отбирали очищенный фаг на границе слоев, соответствующих 40% и 50% сахарозы. После очистки в градиенте сахарозы биологический титр фага составил 5×10^{11} БОЕ/мл. Далее препарат подвергался дополнительной стадии — концентрированием на фреоне: очищенный препарат разводили в SM-буфере и наносили на слой фреона CFC-113, после чего центрифугировали при тех же параметрах. Значения биологического титра фага в сконцентрированном таким образом препарате достигали $6,5\times 10^{12}$ БОЕ/мл.

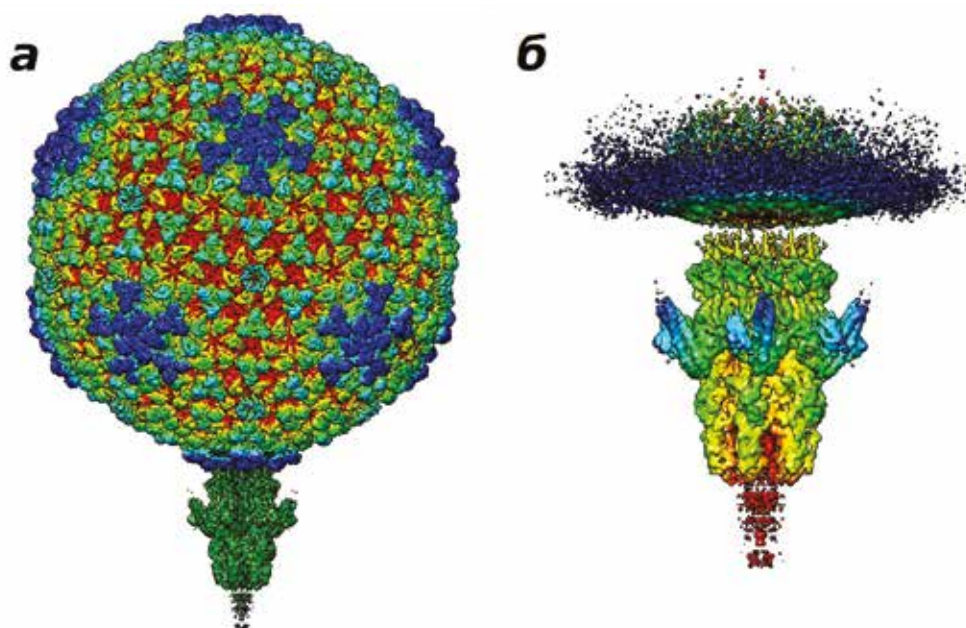


Рис. 3. Реконструкция фага $\phi 24B$ с разрешением 4,0-4,5 Å. а) вирион; б) фаговый хвост с осевой фибриллой (красный) и хвостовыми шипами (голубой)

Криоэлектронная трехмерная реконструкция вирионов $\phi 24B$ демонстрирует интересные особенности морфологии фаговых частиц в целом (рис. 3а) и его хвостовой структуры в частности (рис. 3б). Фаговый капсид обладает икосаэдрической симметрией и образован белками гексамеров (в областях граней) и белками пентамеров (в областях вершин). Также заметно наличие декорирующих белков. По распределению электронной плотности в области адсорбционного аппарата можно говорить о наличии шести хвостовых шипов и осевой фибриллы, архитектурно напоминающей осевую фибриллу цианофага Pm1 (рис. 1, рис. 4), что подтверждает предположение об участии белка gp56 в необратимой адсорбции фага $\phi 24B$.

Основные выводы. В рамках данного исследования была оптимизирована и дополнена методика выделения, концентрирования и очистки бактериофага $\phi 24B$. Концентрированные и очищенные препараты этого фага были использованы для получения изображений фаговых частиц методами ТЕМ и крио-ЭМ. На основе криоэлектронных микрофотографий построили предварительную трехмерную реконструкцию вирионов $\phi 24B$, позволяющую более точно предсказать структуру адсорбционного аппарата данного вируса: по бокам от оси хвоста располагается шесть хвостовых шипов, представленных тримерами белка gp61, в то время как на дистальном конце хвоста располагается осевая фибрилла, образованная тримером белка gp56.

ЛИТЕРАТУРА

1. Donnenberg M.S., Whittam T.S. Pathogenesis and evolution of virulence in enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli*. // The Journal of Clinical Investigation. – 2001. – Vol. 107. – № 5. – P. 539-548.

2. Cuervo A. *et al.* Structural Characterization of the Bacteriophage T7 Tail Machinery // Journal of Biological Chemistry. – 2013. – Vol. 288. – № 36. – P. 26290-26299.
3. Hu B. *et al.* The bacteriophage t7 virion undergoes extensive structural remodeling during infection // Science. – 2013. – Vol. 339. – № 6119. – P. 576-579.
4. McNulty R. *et al.* Cryo-EM elucidation of the structure of bacteriophage P22 virions after genome release // Biophysical journal. – 2018. – Vol. 114. – № 6. – P. 1295-1301.
5. Zhang J. T. *et al.* Structure and assembly pattern of a freshwater short-tailed cyanophage Pam1 // Structure. – 2022. – Vol. 30. – № 2. – P. 240-251. e4.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ РАБОТЫ

Статьи

1. Golomidova A. K., Efimov A. D., Kulikov E. E., Kuznetsov A. S., Belalov I. S., Letarov A. V. O antigen restricts lysogenization of non-O157 *Escherichia coli* strains by Stx-converting bacteriophage phi24B // Scientific reports. – 2021. – Vol. 11. – № 1. – P. 1-9.

Тезисы

1. Кузнецов А.С., Куликов Е.Е., Голомидова А.К., Летаров А.В. Потенциальная роль белка gp56 в адсорбции Stx-конвертирующего бактериофага Ф24В // Актуальные аспекты современной микробиологии: XIII молодежная школа-конференция с международным участием. Институт микробиологии им. С.Н. Виноградского, ФИЦ Биотехнологии РАН. Москва, 16-18 ноября 2022 г. – Москва. – 2022 – С. 130-132 [ISBN 978-5-00147-435-7].
2. Летаров А.В., Ефимов А.Д., Кузнецов А.С., Куликов Е.Е., Голомидова А.К., Летарова М.А., Иванов П.А. О-антигены *E. coli* и лизогенизация умеренными бактериофагами // VIII Ежегодная научная конференция Федерального исследовательского центра «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук. Тезисы докладов. Москва, 2022. – С. 14.
3. Кузнецов А.С., Ефимов А.Д., Бойко К.М., Голомидова А.К., Куликов Е.Е., Летаров А.В. Распознавание клетки-хозяина бактериофагом ф24В // 3-й Российский микробиологический конгресс [ISBN 978-5-6046553-7-5]. Псков, 2021. – С. 211-212 (постерный доклад, диплом победителя в конкурсе молодых ученых).
4. Куликов Е.Е., Голомидова А.К., Ефимов А.Д., Кузнецов А.С., Летаров А.В. Лизогенизация штаммов *Escherichia coli*, не относящихся к серотипу O157, Stx-конвертирующим бактериофагом phi24B связана с потерей О-антигена и снижением приспособленности // 3-й Российский микробиологический конгресс [ISBN 978-5-6046553-7-5]. Псков, 2021. – С. 212 (постерный доклад)
5. Кузнецов А.С., Куликов Е.Е., Летаров А.В. Особенности роста бактериофага λ_2B8 // Труды 64-й Всероссийской научной конференции МФТИ. Биологическая и медицинская физика [ISBN 978-5-7417-0789-0]. 2021. – С. 145-146 (устный доклад, диплом за лучший устный доклад в секции биотехнологии, физико-химической и молекулярной биологии).

**RESEARCH CENTER OF BIOTECHNOLOGY RAS
PREPARING HIGHLY CONCENTRATED SAMPLES OF STX-CONVERTING
BACTERIOPHAGE Φ 24B, 3D VIRION RECONSTRUCTION BASED
ON CRYO-EM ANALYSIS**

Abstract. Stx-converting coliphages determine the toxigenicity of pathogenic isolates of *Escherichia coli*, which belong mainly to the O157 serotype, but among other *E. coli* serotypes, shigatoxigenic variants are also found. However, the mechanisms of adsorption of Stx-phages on the surface of cells of different O-serotypes, leading to the formation of toxigenic lysogens, remain unclear. Stx-converting podovirus ϕ 24B is capable of infecting a wide range of O-antigen-free strains of *E. coli*. The potential RBPs of the virus have been established: gp56 may be involved in binding the final receptor, while the tail spike protein gp61 probably binds an unknown primary receptor. Cryo-EM reconstruction analysis of the virion confirms the putative positions of the RBPs, namely the presence of an axial fibril and six tail spines. The resulting 3D structure of the ϕ 24B virion details the morphology of the studied bacteriophage.

Keywords: Stx-phages, cryo-EM, full-virion 3D reconstruction, phage adsorption, RBPs, LPS, O antigen.

Кулакова Анастасия Владимировна

аспирант ФИЦ Биотехнологии РАН 2 года обучения

профиль 1.5.6 Биотехнология

e-mail: kulakova_97@mail.ru

Научный руководитель



Кочиева Елена Зауровна

доктор биологических наук, профессор,

в.н.с. лаборатории системной биологии растений

ДИНАМИКА ИЗМЕНЕНИЯ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ УГЛЕВОДНОГО ОБМЕНА У КЛУБНЕЙ КАРТОФЕЛЯ В УСЛОВИЯХ ДЛИТЕЛЬНОГО НИЗКОТЕМПЕРАТУРНОГО ХРАНЕНИЯ

Аннотация. *Хранение клубней картофеля при низких температурах приводит к холодовому осахариванию, которое сопровождается деградацией крахмала и сахарозы с образованием редуцирующих сахаров, и, как следствие, к ухудшению вкусовых качеств. Гидролитическое разрушение крахмала клубней осуществляют α - и β -амилазы, а их активность регулируется ингибитором амилаз. В данной работе был проведен биохимический анализ клубней пяти сортов картофеля в условиях длительного низкотемпературного хранения ($+3^{\circ}\text{C}$, 8 месяцев), а также проанализирована экспрессия генов углеводного обмена. Содержание крахмала клубней пяти сортов картофеля, взятых в анализ, значительно снижалось к восьмому месяцу в условиях холодового стресса, в то время как количество редуцирующих сахаров увеличивалось в период с сентября по апрель. Анализ особенностей паттернов экспрессии генов деградации крахмала и ферментов углеводного метаболизма выявил повышение активности генов *Amy23*, *GWD*, *SUS4*, и снижение уровней транскрипции *BAM1*, *BAM9*, *AI*, *Pain1* в условиях длительного холодового стресса.*

Ключевые слова: сорта картофеля, холодовый стресс, распад крахмала, α -амилаза, β -амилаза, ингибитор амилаз, экспрессия гена

Картофель *Solanum tuberosum* L. - широко культивируемая основная продовольственная культура [2]. Наличие крахмала в клубнях картофеля определяет его использование в качестве пищевой, кормовой и технической культуры. При сборе урожая клубни находятся в состоянии покоя до тех пор, пока окружающая среда не сигнализирует о прорастании. Клубни картофеля чувствительны к низким температурам и при их воздействии запускается процесс адаптации, порождающий к увеличению экспрессии генов, повышающих устойчивость к холоду [5]. Начинается процесс холодового осахаривания, сопровождаемый разрушением крахмала и сахарозы с дальнейшим накоплением редуцирующих сахаров, приводящий к ухудшению питательных и диетических качеств перерабатываемого продукта [3;4].

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

Целью второго года было продолжение работы, а именно получение полных данных биохимической характеристики сортов картофеля (содержание крахмала и сахаров в клубнях) и определение профиля экспрессии генов углеводного обмена (*BAM1*, *BAM9*, *Amy23*, *AI*, *GWD*, *SUS4*, *Pain1*) в динамике ответа на холод для оценки чувствительности генотипов картофеля к низкотемпературному стрессу.

В данной работе был закончен биохимический анализ клубней пяти сортов картофеля (Барин, Утро, Красавчик, Надежда, Северное сияние) в динамике длительного (8 месяцев) низкотемпературного ($+3^{\circ}\text{C}$) хранения.

В результате было показано, что анализируемые образцы различаются по содержанию крахмала, сахарозы и редуцирующих сахаров (глюкоза, фруктоза) уже в момент сбора урожая (сентябрь). Далее, при длительном воздействии низких температур (период сентябрь – февраль – апрель) содержание крахмала в клубнях постепенно снижается в разной степени у всех сортов, в то время как содержание редуцирующих сахаров растет, но только в случае сортов Надежда и Утро. Для других трех сортов (Красавчик, Барин и Северное сияние) с сентября по февраль было характерно повышение содержания редуцирующих сахаров, в то время как с февраля по апрель содержание гексоз либо не менялось (Красавчик), либо снижалось (Барин, Северное сияние).

Ранее было показано, что крахмалистость клубней, а также подверженность холодовому осахариванию напрямую зависят от активности α - и β -амилаз, а также ингибиторов амилаз, которые совместно контролируют распад крахмала. Амилазы являются одними из основных ферментов деградации крахмала. Локализуясь на поверхности гранулы крахмала, StBAM9 образует белковый комплекс с StBAM1, высвобождая молекулу растворимого глюкана с поверхности гранул.

Нами была определена динамика изменения экспрессии β -амилаз *BAM1* и *BAM9* в процессе низкотемпературного хранения клубней анализируемых сортов. Для всех пяти сортов был выявлен одинаковый паттерн: экспрессия гена *BAM1* значительно снижается в апреле, по сравнению с сентябрем, при этом различия между февральским и апрельским значениями не столь существенны и уровень экспрессии гена продолжает незначительно снижаться (сорта Утро и Надежда) или не меняется (сорта Красавчик и Северное сияние).

Профиль экспрессии гена *BAM9* имеет схожую картину, но снижение (сентябрь-апрель) активности гена не столь резкое, как экспрессия *BAM1*. Исключение составляет сорт Утро, где уровень транскрипции практически не меняется.

В случае α -амилазы *Amy23* наблюдалась противоположная тенденция и транскрипция гена росла по мере продолжительности температурного хранения. При этом наблюдалась обратная корреляция с паттерном экспрессии гена ингибитора амилаз *AI*, который, как было показано ранее, посттрансляционно может связываться с α -амилазами, ингибируя их [1]. Экспрессия *AI* у всех сортов достаточно резко (в 3-22 раза) снижалась в феврале по сравнению с сентябрем. В апреле по сравнению с февралем экспрессия *AI* незначительно изменилась (сорта Барин и Утро), снизилась у сорта Красавчик и существенно увеличилась, после резкого (в 19-22 раза) снижения в феврале по сравнению с сентябрем у сортов Северное сияние и Надежда. Параллельно в период сентябрь-апрель наблюдалось повышение экспрессии гена *Amy23* (исключение составил сорт Северное сияние).

Под действием α -глюкан водной дикиназы (*GWD*) крахмал разлагается на разветвленные и линейные глюканы. Активность данного гена у исследуемых образцов усиливалась к апрелю, за исключением сорта Северное сияние, у которого наблюдалось снижение экспрессии, по сравнению с февралем.

Помимо ферментов деградации крахмала в исследование также были взяты и другие ферменты углеводного обмена.

Сахарозосинтаза (*SUS*) является ключевым ферментом углеводного метаболизма и контролирует включение сахарозы в различные клеточные процессы. Анализ экспрессии гена *SUS4* в клубнях картофеля при хранении в низких температурах показал для трех сортов (Барин, Утро, Надежда) достаточно резкое увеличение транскрипции на обоих промежутках (сентябрь-февраль, февраль-апрель), в то время как сорт Северное сияние отличается высоким уровнем экспрессии в сентябре и отсутствием изменений уровня в апреле в сравнении с февралем. У сорта Красавчик активность гена не изменялась.

Другой углеводный фермент — кислая вакуолярная инвертаза (*Pain-1*), катализируя гидролиз сахарозы, приводит к снижению редуцирующих сахаров в клубнях. Паттерн экспрессии *Pain-1* был одинаков и характеризовался высоким уровнем транскрипции в сентябре и падением в 14-60 раз в феврале. Значения в апреле практически не изменялись, по сравнению с февралем.

Основные выводы. Показано, что при длительном низкотемпературном хранении (+3°C, 8 месяцев) содержание крахмала в клубнях сортов постепенно снижается, но в разной степени и не зависит от исходного содержания крахмала в клубнях. Содержание редуцирующих сахаров в промежутке сентябрь – апрель растет у всех сортов, но при этом кривая роста различна (с тах- в феврале у сорта Барин и тах - в апреле у сорта Красавчик).

Определены особенности паттернов экспрессии генов деградации крахмала (*BAM1*, *BAM9*, *Amy23*, *AI*, *GWD*) и других генов углеводного обмена (*SUS4*, *Pain1*) в клубнях пяти сортов кар-

тофеля (Барин, Утро, Красавчик, Северное сияние, Надежда) при низкотемпературном хранении (+3 °C, 8 месяцев). Предполагается, что важным фактором для активности генов, «включающихся» в ответ на холод, и для накопления редуцирующих сахаров является также и выход клубня из состояния физиологического покоя.

ЛИТЕРАТУРА

1. McKenzie M. J. et al. Post-translational regulation of acid invertase activity by vacuolar invertase inhibitor affects resistance to cold-induced sweetening of potato tubers // *Plant, Cell & Environment*. – 2013. – Vol. 36. – № 1. – P. 176-185
2. Robertson T.R., Alzaabi A.Z., Robertson M.D., Fielding B.A. Starchy carbohydrates in a healthy diet: the role of the humble potato // *Nutrients*. – 2018. – Vol.10 (11). – P. 1764
3. Sonnewald S., Sonnewald U. Regulation of potato tuber sprouting // *Planta*. – 2014. – Vol. 239. – P. 27-38
4. Tai H. H. et al. Tuber transcriptome profiling of eight potato cultivars with different cold-induced sweetening responses to cold storage // *Plant Physiology and Biochemistry*. – 2020. – Vol. 146. – P. 163-176
5. Thomashow M. F. Molecular basis of plant cold acclimation: insights gained from studying the CBF cold response pathway // *Plant physiology*. – 2010. – Vol. 154. – № 2. – P. 571-577

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ РАБОТЫ

Статьи

1. Кулакова А.В. и др. Зависимость содержания крахмала и редуцирующих сахаров от уровня экспрессии генов β -амилаз *StBAM1* и *StBAM9* и ингибитора амилаз *StAI* при длительном низкотемпературном хранении клубней картофеля // *Вавиловский журнал генетики и селекции*. – 2022. – Т. 26. – №. 6. – С. 507-514.
2. Дьяченко Е.А., Кулакова А.В., Мелешин А.А., Щенникова А.В., Кочиева Е.З. Ингибитор амилаз *SbAI* видов картофеля: варибельность структуры и профиля экспрессии // *Генетика*. – 2021. – Т. 57. – № 1. – С. 44-55.
3. Дьяченко Е.А., Кулакова А.В., Щенникова А.В., Кочиева Е.З. Варибельность генома отечественных сортов картофеля: данные NBS маркирования // *Сельскохозяйственная биология*. – 2021. – Т. 56. – № 1. – С. 32-43.
4. Дьяченко Е.А., Кулакова А.В., Щенникова А.В., Кочиева Е.З. Варибельность генома отечественных сортов картофеля: данные AFLP анализа // *Сельскохозяйственная биология*. – 2020. – Т. 55, – № 3. – С. 499–509.

Тезисы

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

**RESEARCH CENTRE OF BIOTECHNOLOGY RAS
DYNAMICS OF CHANGES IN THE EXPRESSION OF CARBOHYDRATE
METABOLISM GENES IN POTATO TUBERS UNDER CONDITIONS OF
LONG-TERM LOW-TEMPERATURE STORAGE**

Abstract. Storage of potato tubers at low temperatures leads to cold-induced sweetening, accompanied by the degradation of starch and sucrose with the formation of reducing sugars, and, as a result, to a changing in taste. Hydrolytic destruction of tuber starch is associated with α - and β -amylases activity and activity of the amylase inhibitor. In this work, a biochemical analysis of tubers of five potatoes varieties was carried out under conditions of long-term low-temperature storage (+3 °C, 8 months) and the expression of carbohydrate metabolism genes was analyzed. The starch content of tubers of five potato varieties taken for analysis significantly decreased by the eighth month under cold stress conditions, while the amount of reducing sugars increased from September to April. An expression pattern analysis of starch degradation genes and other genes of carbohydrate metabolism revealed an increase in the activity of the Amy23, GWD, SUS4 genes, and a decrease in the levels of transcription of BAM1, BAM9, AI, Pain1 under conditions of prolonged cold stress.

Keywords: varieties of potatoes, cold stress, starch degradation, α -amylase, β - amylase, amylase inhibitor, gene expression.

Ламердонова Фатима Хасбияновна

аспирант ФИЦ Биотехнологии РАН 2 года обучения

профиль 1.5.4 Биохимия

e-mail: flamerdonova@mail.ru

Научные руководители



Колеснов Александр Юрьевич

доктор технических наук,

кандидат биологических наук,

руководитель лаборатории фундаментальных и прикладных

исследований качества и технологий пищевых продуктов

(ПНИЛ) Научно-образовательного ресурсного центра (НОРЦ) «Фармация» РУДН

Камионская Анастасия Михайловна

кандидат биологических наук,

зам. директора по научной работе,

руководитель группы биоинженерии растений

МЕТОД КОЛИЧЕСТВЕННОЙ СПЕКТРОСКОПИИ ЯДЕРНОГО МАГНИТНОГО РЕЗОНАНСА ^2H NMR ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ ВНУТРИКЛЕТОЧНОЙ ВОДЫ ВЫСШИХ РАСТЕНИЙ НА ПРИМЕРЕ ВИНОГРАДА (*VITIS VINIFERA* L.) И ПРОДУКТОВ ЕГО ПЕРЕРАБОТКИ

Аннотация. Вода является основным компонентом растительной клетки, и, как следствие, ключевым фактором в физиологии и биохимии винограда, определяющим его рост и развитие. В этой связи особое значение приобретают современные методы исследования специфичных свойств воды внутриклеточного пространства, характеризующих ее состояние в растениях, а впоследствии и качество продуктов на его основе. Нами были представлены результаты разработки и применения нового метода ЯМР-спектроскопии ядер дейтерия ($^2\text{H(D)}$ -qNMR) для их прямого количественного определения в структурных элементах воды без ее предварительного выделения из объектов исследования (напр., виноградных сушен и вин). Разработанный метод используется для решения фундаментальных задач по изучению фракционирования изотопов водорода в компонентах растений на примере винограда (*Vitis vinifera* L.), а в прикладной части позволяет решать такие задачи как оценка компонентного состава пищевых продуктов растительного происхождения, например, винодельческой продукции по ее подлинности, происхождению и применению сторонних компонентов, в т.ч. геологической воды.

Ключевые слова: изотопы водорода, дейтерий, внутриклеточная вода, виноградарство, виноделие

Вода имеет исключительное значение во всех процессах жизнедеятельности растений. Обеспечивая внутреннюю среду, в которой происходит обмен веществ, вода также является непосредственным участником всех биохимических превращений процессов фотосинтеза, дыхания и гидролиза. Вместе с тем, вода, являясь доминирующей составляющей растительной клетки, участвует в формировании качественных (потребительских) характеристик винограда и продукции на ее основе.

Целью данной работы являлась разработка нового методического подхода для исследования дейтерия, содержащегося в воде винограда, и продуктах его переработки – сусле и винах.

Исследования были проведены на 12 аутентичных образцах сусле и виноматериалов, изготов-

ленных из красных и белых сортов винограда. В результате исследований было установлено, что содержание дейтерия во внутриклеточной воде винограда, находящегося в фазе технической зрелости, лежит в интервале от 149,74 до 152,48 ppm. При изготовлении в контролируемых условиях виноматериалов вода в готовой продукции обогащается дейтерием, уровень которого повышается до значений 158,67-162,22 ppm. При этом разница между исходным и достигнутым уровнями составляет от 6,19 до 12,48 ppm. Количественный уровень дейтерия в образцах геологической воды – воды из московской городской водопроводной сети, воды поверхностных и подземных источников Крыма и Краснодарского края, не превышает значения 148 ppm.

На основе полученных данных было предложено т.н. граничное значение, характеризующее природный уровень дейтерия в аутентичных винах, $(D/H)_{гз} \geq 157,0$ ppm. Данное граничное значение имеет предварительный характер и подлежит корректировке в случае поступления новых экспериментальных данных, полученных в ходе проведения ежегодных мониторинговых исследований винограда, выращиваемого в разных природно-климатических зонах, а также исследований продуктов его переработки (напр., сусел, вина/виноматериалов), изготавливаемых в промышленных условиях и/или поставляемых на российский рынок по импорту из стран ближнего и дальнего зарубежья.

Основные выводы. На основе разработанного метода спектроскопии ядерного магнитного резонанса высокого разрешения $^2\text{H(D)}\text{-qNMR}$ был предложен новый методический подход для исследования дейтерия, содержащегося в воде винограда и продуктов его переработки – суслах и винах.

В отличие от существующих ЯМР-методов (напр., SNIF-NMR) [1-3]), в новом методическом подходе обеспечивается возможность измерения как протонного спектра ^1H , так и спектра дейтерия $^2\text{H(D)}$, а также исключается необходимость предварительного выделения искомым соединений из матрицы образца перед измерением, в сравнении с методом IRMS/SIRA масс-спектрометрии отношений стабильных изотопов легких элементов, что не только обеспечивает селективность определения, но и существенно повышает достоверность и точность его результатов.

ЛИТЕРАТУРА

1. ГОСТ Р 59570-2021 «Продукция винодельческая. Идентификация компонентов в части определения природы этанола и других соединений физико-химического состава».
2. Perini M. The effect of stopping alcoholic fermentation on the variability of H, C and O stable isotope ratios of ethanol / Perini M., Guzzon R., Simoni M., Malacarne M., Larcher R., Camin F. // Food Control, 2014.- 40.- pp. 368–373.
3. Christoph N. 25 Years authentication of wine with stable isotope analysis in the European Union – Review and outlook / Christoph N., Hermann A., Wachter H. // BIO Web of Conferences, 2015.- 5.- 02020.- 8 p.
4. Стаматиди В.Ю. Вариации водного потенциала листьев винограда различного происхождения в условиях Крыма (2014-2017 гг.) // Магарач. Виноградарство и виноделие, 2019.- т. 21.- № 2(108).- С. 133-138.
5. Колеснов А. Масс-спектрометрия стабильных изотопов кислорода $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ в винограде и винодельческой продукции Крыма / Колеснов А., Агафонова Н., Зенина М. // Аналитика, 2016.- № 3(28).- С. 72-82.
6. Gaudillere J.-P., Van Leeuwen C., Ollat N. Carbon isotope composition of sugars in grapevine, an integrated indicator of vineyard water status // Journal of Experimental Botany, 2002.- Vol. 53 (369).- pp. 757-763.
7. Van Leeuwen C., Tregoat O., Choné X., Bois B., Pernet D., Gaudillère J.-P. Vine water status is a key factor in grape ripening and vintage quality for red Bordeaux wine. How can it be assessed for vineyard management purposes? // Journal International des Sciences de la Vigne et du Vin, 2009.- Vol. 43. - No. 3- pp. 121-134.
8. Зенина М.А. Изотопный состав легких элементов в компонентах винограда и винодельческой продукции: влияние природных и техногенных факторов / Зенина М.А., Колеснов А.Ю., Цимбалаев С.Р., Терещенко Г.С. // Сб. науч. тр. «Виноградарство и виноделие» ФГБУН «Всерос-

сийский национальный научно-исследовательский институт виноградарства и виноделия «Магарах» РАН», 2020.- Т. XLIX.- С. 219-222.

9. Ramos I.C. Carbon Stable isotopes as Water Stress Proxy: Trends in Vineyards from Mendoza / Ramos I.C., Dauverne A., Nahuel G., Clavijo S., Cabeza M., Quiroga G. // Congreso Latinoamericano de Ingenieria y Ciencias Aplicadas CLICAP 2022-San Rafael, Mendoza-Argentina, 2022.- pp. 691-699.

10. Plantevin M. Using $\delta^{13}\text{C}$ and hydroscales for discriminating cultivar specific drought responses / Plantevin M., Gowdy M., Destrac-Irvine A., Marguerit E., Gambetta G.A., Van Leeuwen C. // Oeno One, 2022.- 56-2.- pp. 239-250.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ РАБОТЫ

Статьи

1. Колеснов А. Единый аналитический алгоритм идентификации компонентного состава винодельческой продукции / Колеснов А., Цимбалаев С., Ивлев В., Васильев В., Ламердонова Ф. // Вестник Алматинского технологического университета, 2021.- № 4.- С. 58-75 (DOI: 10.48184/2304-568X-2021-4-58-75).

2. Колеснов А.Ю. Применение высокоэффективной жидкостной хроматографии для исследования качества винодельческой продукции: современные методические подходы // Колеснов А.Ю., Цимбалаев С.Р., Ламердонова Ф.Х. // Аналитика, 2021.- Т. 11.- № 6.- С. 458-465 (DOI: 10.22184/2227-572X.2021.11.6.458.465).

3. Колеснов А.Ю. Метод количественной спектроскопии ядерного магнитного резонанса qNMR для исследования воды винограда и винодельческой продукции / Колеснов А.Ю., Ивлев В.А., Васильев В.Г., Цимбалаев С.Р., Ламердонова Ф.Х., Нассер Р.А.Х., Аникина Н.С., Гниломедова Н.В., Червяк С.Н. // Виноградарство и виноделие, 2022.- Т. LI.- С. 92-96 (DOI 10.35547/10.34919.2022.43.41.001).

Lamerdonova Fatima Khasbiyanovna

RESEARCH CENTER OF BIOTECHNOLOGY RAN

METHOD OF QUANTITATIVE SPECTROSCOPY OF NUCLEAR MAGNETIC RESONANCE qNMR FOR INVESTIGATION IN HIGHER PLANTS INTRACELLULAR WATER ON THE EXAMPLE OF GRAPE (VITIS VINIFERA L.) AND ITS PROCESSING PRODUCTS

Abstract. Water is the main component of the plant cell, and, as a result, a key factor in the physiology and biochemistry of grapes, which determines its growth and development. In this regard, modern methods for studying the specific properties of water in the intracellular space, which characterize its state in plants and subsequently the quality of products based on it, are particularly important. The results were presented as development and application of a new method of NMR spectroscopy of deuterium nuclei (2H(D) -qNMR) for their direct quantitative determination in the structural elements of water without its preliminary isolation from the objects of the study (for example, grape must and wines). The developed method is used to solve fundamental problems of studying hydrogen isotopes fractionation in plant components on the example of grapes (*Vitis vinifera* L.), and in the applied part it allows solving such problems as assessing the component composition of plant origin food products, for example wine products, by their authenticity, origin and use of third-party components, including geological water.

Keywords: hydrogen isotopes, deuterium, intracellular water, viticulture, winemaking.

Тимофеева Татьяна Алексеевна

аспирант ФИЦ Биотехнологии РАН 2 года обучения

профиль 1.5.6 Биотехнология

e-mail: timofeyka2033@mail.ru

Научный руководитель

Варламов Валерий Петрович

доктор химических наук, профессор,

г.н.с. лаборатории инженерии биополимеров



ВЛИЯНИЕ НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНОГО ГИДРОЛИЗАТА ХИТОЗАНА НА АКТИВНОСТЬ ФЕНИЛАЛАНИН-АММОНИЙ-ЛИАЗЫ В КОРНЯХ ТОМАТА

Аннотация. Изучение механизмов действия хитозана показало, что гидролизат хитозана действует как стимулятор роста и элиситор для растений, повышая устойчивость к биотическим и абиотическим факторам. В растениях фенилаланин-аммоний-лиаза (PAL) является важным ферментом при биосинтезе фенолов и фитоалексинов, а также гормона стресса – салициловой кислоты. В работе изучены изменения активности PAL в корнях проростков томатов сортов Черри, Лель и Титан в ответ на присутствие низкомолекулярного гидролизата хитозана. Активность PAL и содержание общих фенолов снижалось через 24 ч после внесения гидролизата хитозана. Экспрессия гена PAL5 у сорта Черри увеличивалась в 1,5 раза через 48 ч, тогда как у сорта Лель экспрессия стабильно снижалась в присутствии хитозана.

Ключевые слова: гидролизат хитозана, томат, фенолы, фенилаланин-аммоний-лиаза, PAL5

Во многих исследованиях показано положительное влияние хитозана на скорость прорастания семян и роста растений, длину корней и объем корневой системы [1-4]. Хитозан может усиливать физиологические реакции растений, действуя, как стимулятор роста и элиситор, обеспечивая устойчивость растений к различным факторам. Стимулирующие эффекты хитозана обусловлены активацией иммунной системы растений, включая биосинтез фитогормонов и защитных ферментов [4-6]. Результаты исследований говорят о том, что накопление фермента фенилаланин-аммоний-лиазы (PAL) увеличивается в присутствии хитозана [7-8]. PAL участвует в фенилаланиновом пути биосинтеза салициловой кислоты и защитных реакциях растений на стресс [9]. PAL также является важным ферментом фенилпропаноидного пути (катализирует дезаминирование фенилаланина с образованием аммиака и коричной кислоты), непосредственно участвует в синтезе фенолов [10]. Повышение активности PAL приводит к накоплению фенольных соединений в тканях, подвергшихся стрессу, выполняя защитную функцию растений от биотических и абиотических стрессовых факторов. Фенольные соединения, в том числе флавоноиды, могут удалять активные формы кислорода (АФК) и предотвращать клеточное окисление [10].

В работе использовался низкомолекулярный гидролизат хитозана (ГХ) со средней молекулярной массой 33 кДа (индекс полидисперсности = 2,1), степень деацетилирования 95%, концентрация исходного раствора 10 мг/мл, pH 5,1. ГХ был получен путем химической деполимеризации высокомолекулярного хитозана азотной кислотой [11].

Предыдущие исследования показали, что присутствие ГХ в среде является стрессовым фактором для растений [5]. Длительное воздействие высоких концентраций ГХ в среде для проращивания семян угнетает рост растений [2]. Исследование этого эффекта на трехдневных проростках томата

сорта Черри показало зависимость степени воздействия от концентрации гидролизата хитозана (Рис. 1). Выдерживание проростков томата в течение 48 часов в среде с ГХ в концентрациях 2 мг/мл и 5 мг/мл статистически значимо снижало среднюю длину корней более чем в 2 раза по сравнению с контролем. Инкубация в течение 24 часов в тех же концентрациях также оказывала отрицательный эффект на скорость роста, длина корней была снижена на 21 ± 2 %. Выдерживание проростков томата в среде с ГХ различных концентраций в течение 4 ч не оказывало эффекта на дальнейшее развитие корней томата сорта Черри.

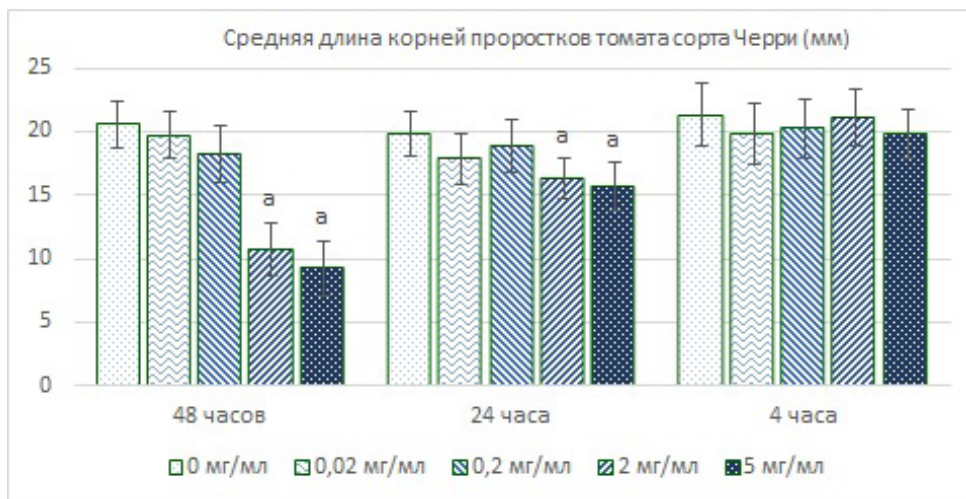


Рис.1. Изменение длины корней проростков томата сорта Черри в зависимости от длительности инкубации в растворе гидролизата хитозана различных концентраций. Условные обозначения: а – $P \leq 0,05$ по сравнению с контролем (0 мг/мл)

Для изучения свойств низкомолекулярного гидролизата хитозана, как стрессового фактора, была выбрана концентрация 2 мг/мл с экспозицией в 24 часа и 48 часов. Семидневные проростки томатов помещали на чашки Петри с фильтровальной бумагой, смоченной раствором ГХ или стерильной дистиллированной водой, и инкубировали в течение указанного времени. После этого отделяли корни, взвешивали полученную биомассу, замораживали в жидком азоте. Работа проводилась на базе экспериментальной установки искусственного климата (ЭУИК) Федерального исследовательского центра Биотехнологии РАН.

Содержание общих фенолов и активность фенилаланин-аммоний-лиазы и в корнях проростков определяли у трех сортов томата: Черри, Лель, Титан (Рис. 2а, 2б) [3]. Активность PAL значительно снижается в корнях проростков трех сортов по сравнению с контролем. Содержание общих фенолов достоверно снижается в присутствии гидролизата хитозана в корнях томата сорта Черри по сравнению с контролем. У сортов Лель и Титан достоверное снижение отмечается только при экспозиции 24 ч. Однако высокое содержание общих фенолов в контрольном варианте подтверждается высокой активностью PAL в соответствующих образцах.

Поиск генов семейства *PAL* в базе данных Sol Genomics Network [12] показал, что в геноме томата аннотировано 9 генов фенилаланин-аммоний лиазы и 7 генов фенилаланин/гистидин-аммоний лиазы. Наиболее изученными являются гены *PAL3*, *PAL4*, *PAL5*. Также эти гены имеют наиболее высокие уровни экспрессии в различных тканях томата. Анализ уровня экспрессии выявленных генов в разных тканях томата проводился с использованием платформы TomExpress [13]. В корнях томата сорта Микротом наиболее высокие уровни экспрессии наблюдались у *PAL3* и *PAL5*. Для анализа уровня экспрессии был выбран ген *PAL5*, качестве референсного гена использовался EF1β2 [14]. Для генов были подобраны праймеры и условия для проведения ПЦР в реальном времени.

В корнях сорта Черри экспрессия гена *PAL5* оставалась на уровне контроля через 24 часа после внесения в среду гидролизата хитозана, а через 48 часов увеличилась в 1,5 раза (Рис. 3). У сорта Лель, напротив, наблюдалось устойчивое и достоверное снижение экспрессии *PAL5*, и через 24 ч она была более чем в 2 раза ниже, чем в контроле, что коррелирует с полученными данными об активности PAL в корнях этого сорта.

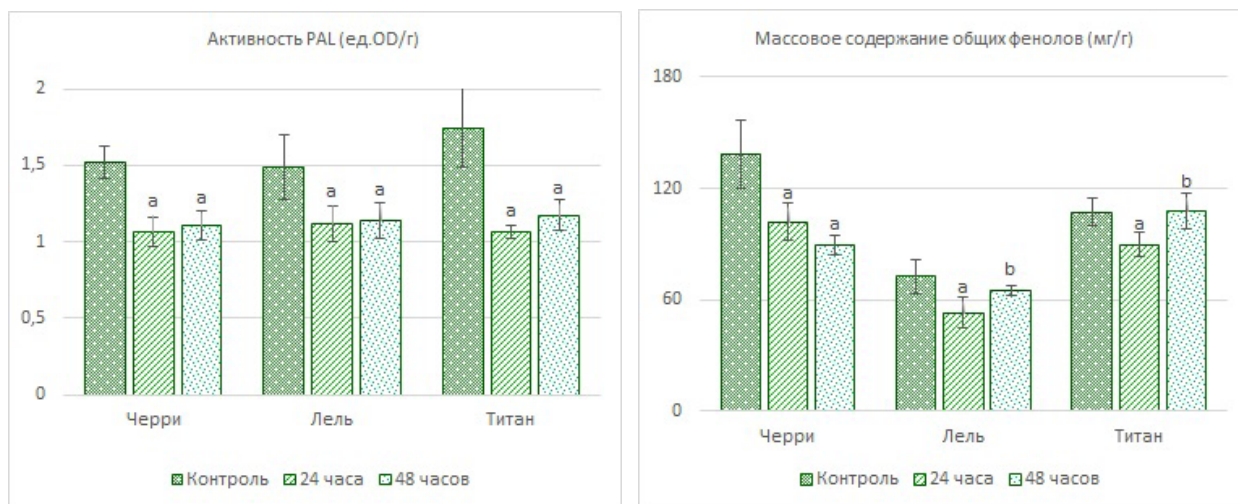


Рис. 2. а. Активность PAL в корнях томатов при экспозиции 24 ч и 48 ч по сравнению с контролем (дистиллированная вода). б. Массовое содержание общих фенолов в корнях томатов в присутствии ГХ по сравнению с контролем. Условные обозначения: **a** – $P \leq 0,05$ по сравнению с контролем. **b** – $P \leq 0,05$ для экспозиции 48 ч по сравнению с экспозицией 24 ч.

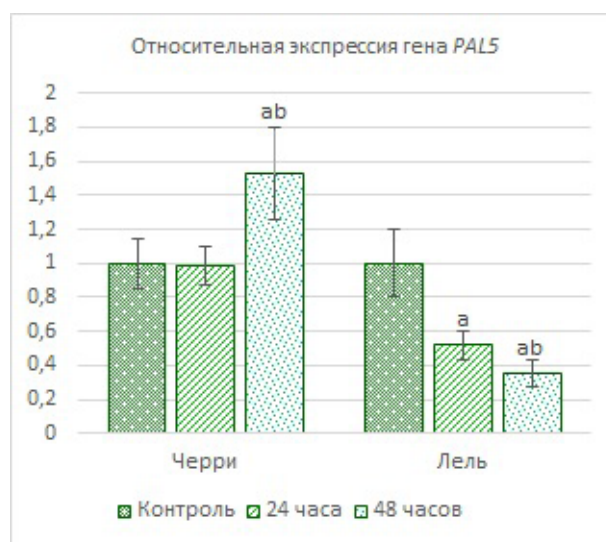


Рис. 3. Относительная экспрессия гена PAL5 в корнях томата. Результаты представлены как среднее $\pm$ стандартное отклонение из трех технических и трех биологических повторностей для каждого варианта опыта. **a** – $P \leq 0,05$ по сравнению с контролем. Условные обозначения: **b** – $P \leq 0,05$ для экспозиции 48 ч по сравнению с экспозицией 24 ч.

Основные выводы. Длительное присутствие высоких концентраций низкомолекулярного гидролизата хитозана негативно сказывается на дальнейшем развитии проростков томата. Однако этот эффект можно использовать при изучении стрессовых реакций растений томата в ответ на внесение хитозана. В работе показано, что при длительной экспозиции гидролизата хитозана в корнях томата снижается активность фенилаланин-аммоний-лиазы, что приводит к снижению содержания общих фенолов. Установлено, что активность гена *PAL5* также падает в корнях томата сорта Лель. Примечательно, что изученные показатели варьируют между сортами.

ЛИТЕРАТУРА

1. Cho M. H., No H. K., Prinyawiwatkul W. Chitosan treatments affect growth and selected quality of sunflower sprouts // Journal of food science. – 2008. – Vol. 73. – № 1. – P. S70-S77.

2. Timofeeva T. et al. The Effect of Chitosan Hydrolysate on *Solanum Lycopersicum* Plant Growth // *KnE Life Sciences*. – 2022. – P. 435–442.
3. Lyalina T. et al. Effect of Seed Priming with Chitosan Hydrolysate on Lettuce (*Lactuca sativa*) Growth Parameters // *Molecules*. – 2023. – Vol. 28. – № 4. – P. 1915.
4. Jogaiah S. et al. Exogenous priming of chitosan induces upregulation of phytohormones and resistance against cucumber powdery mildew disease is correlated with localized biosynthesis of defense enzymes // *International Journal of Biological Macromolecules*. – 2020. – Vol. 162. – P. 1825-1838.
5. Hidangmayum A. et al. Application of chitosan on plant responses with special reference to abiotic stress // *Physiology and molecular biology of plants*. – 2019. – Vol. 25. – P. 313-326.
6. Chandra S. et al. Chitosan nanoparticles: a positive modulator of innate immune responses in plants // *Scientific reports*. – 2015. – Vol. 5. – № 1. – P. 15195.
7. Attaran Dowom S. et al. Chitosan nanoparticles improve physiological and biochemical responses of *Salvia abrotanoides* (Kar.) under drought stress // *BMC Plant Biology*. – 2022. – Vol. 22. – № 1. – P. 364.
8. Pirbalouti A. G. et al. Exogenous application of chitosan on biochemical and physiological characteristics, phenolic content and antioxidant activity of two species of basil (*Ocimum ciliatum* and *Ocimum basilicum*) under reduced irrigation // *Scientia horticulturae*. – 2017. – Vol. 217. – P. 114-122.
9. Guo J., Wang M. H. Characterization of the phenylalanine ammonia-lyase gene (SLPAL5) from tomato (*Solanum lycopersicum* L.) // *Molecular biology reports*. – 2009. – Vol. 36. – P. 1579-1585.
10. Wróbel M. et al. Metabolism of phenolic compounds in *Vitis riparia* seeds during stratification and during germination under optimal and low temperature stress conditions // *Acta Physiologiae Plantarum*. – 2005. – Vol. 27. – P. 313-320.
11. Shagdarova B. T. et al. Study of the protective activity of chitosan hydrolyzate against *Septoria* leaf blotch of wheat and brown spot of tobacco // *Applied biochemistry and microbiology*. – 2018. – Vol. 54. – P. 71-75.
12. Fernandez-Pozo N. et al. The Sol Genomics Network (SGN)—from genotype to phenotype to breeding // *Nucleic acids research*. – 2015. – Vol. 43. – № 1. – P. 1036-1041.
13. Zouine M. et al. TomExpress, a unified tomato RNA-Seq platform for visualization of expression data, clustering and correlation networks // *The Plant Journal*. – 2017. – Vol. 92. – № 4. – P. 727-735.
14. Lovdal T., Lillo C. Reference gene selection for quantitative real-time PCR normalization in tomato subjected to nitrogen, cold, and light stress // *Analytical biochemistry*. – 2009. – Vol. 387. – № 2. – P. 238-242.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ РАБОТЫ

Статьи

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

Тезисы

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

RESEARCH CENTER OF BIOTECHNOLOGY RAS
EFFECT OF LOW MOLECULAR WEIGHT CHITOSAN HYDROLYZATE ON
THE PHENYLALANINE AMMONIA-LYASE ACTIVITY IN TOMATO ROOTS

Abstract. The chitosan effects researching showed that chitosan acts as a growth stimulator and elicitor for plants, includes increasing resistance to biotic and abiotic factors. In plants, phenylalanine ammonia-lyase (PAL) is an important enzyme in phenolics and phytoalexins biosynthesis, as well as the stress hormone salicylic acid. Changes in PAL activity was studied during low molecular weight chitosan hydrolysate treatment in roots of tomato cv. Cherry, Lel and Titan. The PAL activity and the total phenolics content decreased 24 hours after chitosan hydrolysate addition. The PAL5 gene expression in the cv. Cherry increased 1.5 times after 48 hours, while in the cv. Lel, expression stably decreased in the presence of chitosan.

Keywords: chitosan hydrolysate, tomato, phenolics, phenylalanine ammonia-lyase, PAL5 gene

Шабает Александр Викторович

аспирант ФИЦ Биотехнологии РАН 2 года обучения

профиль 1.5.4 Биохимия

e-mail: a.shabaeff2011@yandex.ru

Научный руководитель

Федорова Татьяна Васильевна

кандидат технических наук, в.н.с.,

зав. лаборатории молекулярных основ биотрансформаций



ИЗУЧЕНИЕ БИОДЕГРАДАЦИОННОГО ПОТЕНЦИАЛА БАЗИДИОМИЦЕТОВ БЕЛОЙ ГНИЛИ РАЗЛИЧНЫХ ЭКОЛОГИЧЕСКИХ НИШ

Аннотация. Проведено исследование биодegradационного потенциала сапротрофных грибов белой гнили *Trametes hirsuta* LE-BIN 072, *Steccherinum ochraceum* LE-BIN 3174, *Peniophora lycii* LE-BIN 2142 и *Crucibulum laeve* LE-BIN 1700 при твердофазном культивировании на опилках березы, ольхи и сосны. Идентифицированы основные белки, секретируемые грибами белки при культивировании на жидких средах содержащих различные виды древесных опилок, и проведен сравнительный анализ полученных ферментных профилей. Показаны различия в механизмах биодеструкции основных биополимеров древесины (целлюлозы, гемицеллюлозы и лигнина), используемых грибами белой гнили различных экологических ниш. Проведено исследование биодegradационного потенциала исследуемых штаммов в отношении фталатов – эфиров фталевой кислоты, токсичных ксенобиотиков, и показаны возможности для их биодеструкции грибами белой гнили различных экологических ниш.

Ключевые слова: сапротрофные базидиомицеты, грибы белой гнили древесины, биодеструкция, древесные опилки, экзопротеом (секретом), фталаты.

Растительная биомасса – самый распространенный возобновляемый источник углерода на Земле. Многие микроорганизмы играют важную роль в её деградации, обеспечивая глобальный цикл углерода. Ксилотрофные дереворазрушающие грибы белой гнили являются основными деструкторами органического вещества лесных экосистем. Благодаря наличию уникального комплекса лигноцеллюлотических ферментов они способны разрушать все компоненты клеточной стенки растений, включая трудно разрушаемый биополимер – лигнин. Большое генетическое разнообразие лигноцеллюлотических ферментов дереворазрушающих ксилотрофов делает данные грибы перспективными объектами для практического использования в различных отраслях промышленности, а также в технологиях биоремедиации загрязненных природных объектов [1, 2].

Целью данной работы являлось сравнительное изучение биодegradационного потенциала грибов белой гнили различных экологических ниш, как в отношении различных типов древесных субстратов, так и в отношении некоторых ксенобиотиков – эфиров фталевой кислоты (ЭФК, фталатов).

Проведено исследование дegradационного потенциала дереворазрушающих ксилотрофных грибов белой гнили *Trametes hirsuta* LE-BIN 072, *Steccherinum ochraceum* LE-BIN 3174, *Peniophora lycii* LE-BIN 2142 и *Crucibulum laeve* LE-BIN 1700, при твердофазном культивировании течении 100 суток на опилках трех видов древесины (берёзы, ольхи и сосны). Показано, что все изучаемые штаммы грибов наиболее эффективно разрушали древесину лиственных пород (берёза и ольха), в то время как древесина хвойных пород (сосна) подвергалась деструкции грибами в значительно меньшей степени. Причём грибы *T. hirsuta* и *P. lycii* дegradировали опилки

древесины лиственных пород (берёзы и ольхи) с одинаковой эффективностью – убыль массы опилок в конце культивирования составляла 18-23% и 21-26% для *P. lycii* и *T. hirsuta* соответственно. В то же время для грибов *S. ochraceum* и *C. laeve* продемонстрирована избирательность в отношении деструкции лиственных опилок – оба гриба наиболее эффективно деградировали древесину берёзы (убыль массы опилок 23% и 31% для *C. laeve* и *S. ochraceum* соответственно) по сравнению с ольхой (убыль массы опилок 15-16% для обоих грибов), что может быть связано как с химическим составом, так и с физическими параметрами древесины. Показано, что в процессе роста исследуемых грибов на опилках и по мере их разрушения изменялись физико-химические параметры древесины, такие как плотность и отношение C/N – наблюдалось постепенное уменьшение величины C/N, то есть возрастало содержание азота, и снижалась плотность древесины с постепенным нарастанием зольности.

Поскольку способность к колонизации определенного древесного субстрата и деградационный потенциал ксилотрофных грибов белой гнили напрямую связан с секретируемым ими комплексом лигноцеллюлолитических ферментов, то на следующем этапе работ нами был проведен сравнительный анализ экзопротеомов (секретомов) изучаемых штаммов грибов при статическом полу-жидкофазном культивировании на контрольной глюкозо-пептонной (ГП) среде и ГП среде, содержащей разные типы древесных опилок (хвойные – сосна; лиственные – берёза и ольха). Разделение секреторных белков культуральной жидкости грибов проводили методом 2D электрофореза и идентификацию белковых пятен на гелях – методом MALDI-TOF/TOF масс-спектрометрии.

Показано, что разные виды грибов белой гнили имели сильно отличный друг от друга профиль лигноцеллюлолитических ферментов, в то время как тип древесного субстрата влиял на профиль секретируемых ферментов исследуемых грибных штаммов в меньшей степени. Так в составе экзопротеомов первичного раневого сапротрофа *T. hirsuta* основными секретируемыми углеводно-активными ферментами (CAZy) являлись окислительные ферменты, такие как лакказа (AA1) и лигнолитические пероксидазы (AA2), а также вспомогательный фермент глиоксаль-оксидаза GLOX (AA5). В опилочных секретоме *T. hirsuta* были идентифицированы классические целлюлазы расщепляющие основные цепи целлюлозы – GH5, GH6 и GH7 семейств с целлюлозосвязывающим доменом CBM1; гемицеллюлазы семейства CAZy GH2, а также эндополигалактуроназа или пектиназа семейства GH28, гидролизующая основную цепь пектина. Помимо гидролитических ферментов, обнаружены ферменты, участвующие в окислительном разрушении целлюлозы и гемицеллюлозы, такие как литические полисахаридные монооксигеназы LPMO (AA9) и целлобиозодегидрогеназа CDH (CAZy семейство AA8+AA3_1).

Состав экзопротеомов вторичного сапротрофа *S. ochraceum* был наиболее схож с таковыми *T. hirsuta* – основными консервативными секретируемыми на всех средах CAZy ферментами также являлись окислительные ферменты – лакказа (AA1), лигнолитические пероксидазы (AA2) и глиоксаль-оксидаза GLOX (AA5). Однако в отличие от *T. hirsuta*, экзопротеом *S. ochraceum* характеризовался более широким спектром изоферментов лакказ и более узким спектром изоферментов пероксидаз. Данное различие в экзопротеомах этих двух грибов, по-видимому, иллюстрирует общую тенденцию – грибам, участвующим на ранних стадиях деструкции древесины (*T. hirsuta*), выгодно продуцировать больше пероксидаз (как по количеству изоферментов, так и по количеству секретируемых белков), чем лакказ, тогда как грибы, участвующие в более поздних стадиях разрушения древесины (*S. ochraceum*), показывают прямо противоположный тренд. Также для секретомов *S. ochraceum* характерно полное отсутствие CAZy ферментов деградирующих основные цепи целлюлозы и гемицеллюлозы, что не характерно для грибов осуществляющих раннюю фазу деградации древесины. Однако были идентифицированы гликозид гидролазы, отщепляющие боковые цепи таких гемицеллюлоз как гетероманнан и ксилоглюкан (соответственно GH27 и GH31 семейства), а также пектат лиаза PL3, расщепляющая полимерные цепи гомогалактуронана пектина.

Белковый профиль экзопротеомов дереворазрушающего сапротрофа *P. lycii* был наиболее схож с профилем подстилочного сапротрофа *C. laeve*. Отличительной особенностью данных грибов белой гнили являлось полное отсутствие в их секретоме лигнолитических пероксидаз, однако, в незначительном количестве были обнаружены лакказы. При этом на всех средах *P. lycii* и

C. laeve секретируют LPMO (AA9) и GMC-оксидоредуктазы, являющиеся донорами электронов для LPMO. Это свидетельствует о преимущественно окислительном пути деструкции полисахаридов, поскольку ни в одном из их секретомов не удалось обнаружить гликозид гидролазы, которые осуществляли бы разрушение основных цепей целлюлозы и гемицеллюлозы. Также в секретоме *P. lycii* и *C. laeve* наблюдалась преобладающая секреция белков GlcD суперсемейства – FAD/FMN-содержащие дегидрогеназы (AA7), которые предположительно могут являться основными ферментами лигнолитической системы данных грибов, а также выступать в качестве доноров электронов для LPMO. Также в секретоме обоих грибов обнаружены значительные количества лектинов и экспансинов. Экспансины также принимают участие в деструкции растительной биомассы, повышают эффективность гидролаз и оксидаз, способствуя образованию аморфных областей и открывая доступ к гликозидным связям внутри полисахаридов, хотя механизм действия этих белков до конца не выяснен.

Секретируемый сапротрофными грибами белой гнили для делигнификации древесины ферментный комплекс, может быть использован для биодеструкции различных ксенобиотиков. Одними из таких ксенобиотиков являются различные соединения ЭФК (фталаты) – широко применяемые пластификаторы, входящие в состав большого количества пластиков. Данные соединения являются токсичными для человека, и попадая в организм могут оказывать значительное негативное влияние на его здоровье [3]. В работе была проведена сравнительная оценка лигнолитических комплексов изучаемых грибов белой гнили для биодеструкции наиболее распространенных и токсичных соединений фталатов – диэтилфталата (ДЭФ), дибутилфталата (ДБФ), ди(2-этилгексил)фталата (ДЭГФ) бутилбензилфталата (ББФ) и диизобутилфталата (ДиБФ). Показано, что способность к разложению ЭФК у разных видов грибов белой гнили различалась, при этом дереворазрушающий сапротроф *T. hirsuta* являлся наиболее перспективным для деградации большинства соединений фталатов. Было установлено, в процессе биодеструкции ЭФК участвуют лакказы и различные лигнолитические пероксидазы данного гриба.

ЛИТЕРАТУРА

1. Suryadi H., Judono J.J., M.R. Putri, et al. Biodelignification of lignocellulose using ligninolytic enzymes from white-rot fungi // *Heliyon* – 2022. – Vol. 8, № 2, e08865; doi:10.1016/j.heliyon.2022.e08865
2. Shourie A., Vijayalakshmi U. Fungal diversity and its role in mycoremediation // *Geomicrobiology Journal* – 2022. – Vol. 39. – P. 426-444; doi:10.1080/01490451.2022.2032883
3. Wang Y., Qian H. Phthalates and their impacts on human health // *Healthcare* – 2021. – Vol. 9(5), 603; doi:10.3390/healthcare9050603.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ РАБОТЫ

1. Савинова О.С., Шабает А.В., Глазунова О.А. [и др.] Биодеструкция эфиров фталевой кислоты грибами белой гнили // *Прикладная биохимия и микробиология* – 2022. – Т. 58, № 5. – С. 484–499.
2. Shabaev A.V., Moiseenko K.V., Glazunova O.A. [et al.] Comparative Analysis of *Peniophora lycii* and *Trametes hirsuta* Exoproteomes Demonstrates “Shades of Gray” in the Concept of White-Rotting Fungi // *International Journal of Molecular Sciences* – 2022. – Vol. 23, № 18, e10322; doi:10.3390/ijms231810322.
3. Savinova O.S., Shabaev A.V., Glazunova O.A. [et al.] Benzyl Butyl Phthalate and Diisobutyl Phthalate Biodegradation by White-rot Fungus *Trametes hirsuta* // *Applied Biochemistry and Microbiology* – 2022. – Vol. 58. – P. S113–S125; doi:10.1134/S0003683822100118.
4. Савинова О.С., Шабает А.В., Федорова Т.В. Биодеструкция эфиров фталевой кислоты грибом белой гнили *Peniophora lycii* // *Микробиология* – 2023. – Т. 92, № 3. – С. 310–317; doi:10.31857/S0026365622600857.

**RESEARCH CENTER OF BIOTECHNOLOGY RAS
STUDY OF THE BIODEGRADATION POTENTIAL OF WHITE ROT
BASIDIOMYCETES OF VARIOUS ECOLOGICAL NICHES**

Abstract. The biodegradation potential of the white rot fungi *Trametes hirsuta* LE-BIN 072, *Steccherinum ochraceum* LE-BIN 3174, *Peniophora lycii* LE-BIN 2142 and *Crucibulum laeve* LE-BIN 1700 was studied during solid phase cultivation on sawdust of various species (birch, alder and pine). The secreted enzymes were identified and the enzyme profiles of the studied strains were compared when cultured on liquid media containing various types of sawdust. Differences in the mechanisms of biodegradation of various biopolymers of plant cell walls (cellulose, hemicellulose and lignin) are shown. The biodegradation potential of the fungal strains in relation to esters of phthalic acid (phthalates) – toxic xenobiotics, was studied, and the possibilities for their biodestruction by white rot fungi of various ecological niches were shown.

Keywords: saprotrophic basidiomycetes, white rot fungi, biodegradation, sawdust, exoproteome (secretome), phthalates.

Бруснова Наталья Андреевна

аспирант ФИЦ Биотехнологии РАН 1 года обучения

научная специальность 1.5.6. Биотехнология

e-mail: brusnova.natasha@yandex.ru

Научный руководитель

Виноградова Светлана Владимировна

кандидат биологических наук,

с.н.с. группы биоинженерии растений



ИЗУЧЕНИЕ ПАТОГЕННЫХ БАКТЕРИЙ МНОГОЛЕТНИХ РАСТЕНИЙ

Аннотация. Ежегодно сельское и лесопарковое хозяйство, лесная промышленность сталкиваются с экономическими потерями из-за инфицирования растений патогенами, что проявляется в потере урожая, убытков в программах озеленения городов и снижения качества и количества материалов, поставляемых для нужд деревообрабатывающей промышленности. Немалая доля ущерба приходится на патологии, вызываемые бактериями-фитопатогенами. В данной работе мы провели идентификацию бактерий, выделенных с деревьев видов *Acer tataricum*, *Ulmus minor* и *Fraxinus excelsior* образцов с различными симптомами. Проведен биохимический скрининг и анализ гена *16S rPHK*.

Ключевые слова: фитопатогены, *Pseudomonas*, идентификация, LOPAT

В наши дни проблема наличия совместных патогенов у культурных и диких растений не потеряла актуальности. Например, представители родов *Pseudomonas* вызывают пятнистости на томате, позднее распускание почек и раннее увядание лесного ореха, некроз флоэмы и выделение экссудата у конского каштана (Webber и др., 2008); бактерии рода *Pantoea* индуцируют гнили, переходящие в некрозы, увядание и хлороз лука (Dutta и др., 2014), пятнистости, преждевременное опадение листьев и низкорослость на эвкалиптовых деревьях (Coutinho T.A. и др., 2002). Поэтому существует вероятность миграции возбудителей инфекций с диких растений на культурные (Chakraborty, 2013). На данный момент изучение бактериальных фитопатогенов в основном сосредоточено на сельскохозяйственных культурах, в то время как сведения о заражении древесных растений в научной литературе практически не представлены (Wei и др., 2021).

Образцы были собраны в Теллермановском лесу Воронежской области и заповеднике Галичья гора Липецкой области с *Acer tataricum*, с *Ulmus minor* и *Fraxinus excelsior*.

Симптоматичные образцы поверхностно стерилизовали и высевали суспензию на питательную среду LB. В результате были обнаружены бактерии, схожие по фенотипу с бактериями рода *Pseudomonas*, с которыми проводили окрашивание по Граму и оценивали флуоресценцию в УФ-свете. Изоляты изучали по схеме LOPAT, тестируя на леван, наличие оксидазы, пектолитическую активность на картофеле, активность аргининдигидролазы и реакцию сверхчувствительности на табаке. Бактерии были высажены на питательные среды с 10 различными источниками сахаров. Для молекулярной идентификации секвенировали ген *16S rPHK*.

Основные выводы. Таким образом, на основании данного исследования, мы определили присутствие бактерий рода *Pseudomonas* на исследованных древесных культурах.

ЛИТЕРАТУРА

1. Hall S. J. et al. *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* from cool climate Australian grapevine vineyards: new phylogroup PG 02f associated with bacterial inflorescence rot // *Plant Pathology*. – 2019. – Vol. 68. – № 2. – P. 312-322.
2. Delétoile A. et al. Phylogeny and identification of *Pantoea* species and typing of *Pantoea agglomerans* strains by multilocus gene sequencing // *Journal of clinical microbiology*. – 2009. – Vol. 47. – № 2. – P. 300-310.
3. Suleimanova A. D. et al. Identification of *Pantoea* phytate-hydrolyzing rhizobacteria based on their phenotypic features and multilocus sequence analysis (MLSA) // *Microbiology*. – 2021. – Vol. 90. – P. 87-95
4. Holmes D. E., Nevin K. P., Lovley D. R. Comparison of 16S rRNA, *nifD*, *recA*, *gyrB*, *rpoB* and *fusA* genes within the family Geobacteraceae fam. nov // *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. – 2004. – Vol. 54. – № 5. – P. 1591-1599.
5. Gutiérrez-Barranquero J. A., Cazorla F. M., De Vicente A. *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* associated with mango trees, a particular pathogen within the “hodgepodge” of the *Pseudomonas syringae* complex // *Frontiers in Plant Science*. – 2019. – Vol. 10. – P. 570.
6. Chakraborty S. Migrate or evolve: options for plant pathogens under climate change // *Global change biology*. – 2013. – Vol. 19. – № 7. – P. 1985-2000.
7. Wei C. et al. Relationship of the Pine Growth Promoting *Pantoea eucalypti* FBS135 with Type Strains *P. eucalypti* LMG 24197T and *P. vagans* 24199T // *Life*. – 2021. – Vol. 11. – № 7. – P. 608.
8. Dutta B. et al. Transmission of *Pantoea ananatis* and *P. agglomerans*, causal agents of center rot of onion (*Allium cepa*), by onion thrips (*Thrips tabaci*) through feces // *Phytopathology*. – 2014. – Vol. 104. – № 8. – P. 812-819.
9. Coutinho T. A. et al. Bacterial blight and dieback of *Eucalyptus* species, hybrids, and clones in South Africa // *Plant disease*. – 2002. – Vol. 86. – № 1. – P. 20-25.

Brusnova Natalia Andreevna

RESEARCH CENTER OF BIOTECHNOLOGY RAS STUDY OF PATHOGENIC BACTERIA OF PERENNIAL PLANTS

Abstract. Each year, agriculture, forestry, and the forestry industry face economic losses due to plant infection with pathogens, which manifests itself in crop losses, losses in urban greening programs, and a decrease in the quality and quantity of materials supplied for the needs of the woodworking industry. A large proportion of the damage falls on pathologies caused by pathogenic bacteria. In this work, we have identified bacteria isolated from trees of *Acer tataricum*, *Ulmus minor*, and *Fraxinus excelsior* specimens with various symptoms. Biochemical screening and analysis of the 16S rRNA gene was carried out.

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

Гололобова Александра Вадимовна
аспирант ФИЦ Биотехнологии РАН 1 года обучения

научная специальность 1.5.11 Микробиология
e-mail sasha.golobova@yandex.ru
Научный руководитель

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



НОВЫЕ АЦЕТОГЕННЫЕ ПРОКАРИОТЫ: ТАКСОНОМИЯ, МЕТАБОЛИЗМ, ЭВОЛЮЦИЯ

Аннотация. Первые ацетогенные микроорганизмы были открыты около 100 лет назад, однако до сих пор до конца не изучены некоторые особенности их биоэнергетического метаболизма и экологии. Эти прокариоты представляют особый интерес для микробиологии и биотехнологии благодаря своей способности к автотрофному росту и использованию широкого спектра альтернативных акцепторов электронов. В данной работе изучаются новые ацетогенные микроорганизмы, особенности их экологии, филогении и метаболизма.

Ключевые слова: ацетогенез, автотрофия, путь Вуда-Льонгдаля, термофилы, чистые культуры

Ацетогенные прокариоты — это группа микроорганизмов, осуществляющих в ходе анаэробного дыхания восстановление 2 молекул углекислого газа до 1 молекулы ацетата при помощи пути Вуда-Льонгдаля [3]. На данный момент описано более 100 представителей этой физиологической группы в 28 родах, принадлежащих к разным бактериальным филумам [2]. Также на основе метагеномных данных была предположена способность к ацетогенезу у некоторых некультивируемых линий архей [1]. Ацетогены отличаются гибкостью метаболизма и способны использовать широкий спектр альтернативных акцепторов электронов, благодаря чему они распространены повсеместно и играют ключевую роль в глобальном цикле углерода, являясь связующим звеном между бродильщиками и ацетокластическими метаногенами при анаэробном разложении органических веществ. Все известные на данный момент ацетогенные микроорганизмы являются факультативными автотрофами или облигатными гетеротрофами, облигатных же автотрофов среди ацетогенов не было обнаружено.

Механизм ацетогенеза был изучен на примере 4 модельных организмов *Acetobacterium woodii*, *Moorella thermoacetica*, *Clostridium ljungdahlii* и *Thermoanaerobacter kivui*. В данном процессе принято выделять три модуля. Первый модуль — окислительный, он представлен реакциями окисления органических и/или неорганических субстратов с переносом электронов на ферредоксин и NAD^+ , при этом восстановительные эквиваленты образуются в эквимольных количествах. Восстановительный модуль представлен реакциями пути Вуда-Льонгдаля, в котором две молекулы CO_2 восстанавливаются до 1 молекулы ацетата, при этом в качестве доноров электронов выступают ферредоксин и NADH , образованные ранее в окислительном модуле ацетогенеза. В реакциях пути Вуда-Льонгдаля NADH расходуется в 2 раза больше, в результате чего возникает избыток восстановленного низкопотенциального ферредоксина, который, в свою очередь, окисляется в энергетическом модуле ацетогенеза. Энергетический модуль представляет собой простую двухкомпонентную систему, состоящую из первичного генератора потенциала, который окисляет восстановленный ферредоксин, и АТФ-синтазы, которая трансформирует энергию элек-

трохимического мембранного потенциала в энергию химических связей АТФ. В качестве первичного генератора потенциала у разных ацетогенных микроорганизмов могут использоваться мембраносвязанная ферредоксин: NAD⁺ оксидоредуктаза (Rnf-комплекс) или мембраносвязанная энергозапасующая никельсодержащая гидрогеназа (Ech-комплекс).

В рамках данного исследования из пробы осадка горячего источника Каскадный кальдеры Узон на Камчатке при 60 °C и pH 6,0 была получена чистая культура ацетогенной бактерии штамм 3443-3Ac. Клетки данного изолята были неподвижными палочками с грамположительной клеточной стенкой и способностью к спорообразованию. Штамм являлся облигатным анаэробом, умеренным термофилом, который рос в диапазоне температур 30–60 °C с оптимальным ростом при 50 °C и в диапазоне pH 4,5 – 7,3 с оптимальным ростом при pH 6,0. Штамм был способен к росту в отсутствии витаминов в среде, однако в таких условиях скорость роста и урожай клеток снижались. Данный изолят оптимально рос в хемолитоавтотрофных условиях с H₂ в качестве донора электронов и CO₂ в качестве акцептора электронов и источника углерода, причем единственным продуктом являлся ацетат. Также в качестве субстратов могли быть использованы формиат и СО (после серии адаптационных пересевов). Штамм 3443-3Ac, однако, не был способен к росту ни на каких проверенных нами органических субстратах. В качестве альтернативных акцепторов электронов штамм 3443-3Ac использовал тиосульфат и элементную серу, восстанавливая их до сульфида.

Было произведено секвенирование генома штамма 3443-3Ac. В геноме исследуемого изолята была детектирована потеря генов, кодирующих ключевые белки метаболизма углеводов и фосфотрансферазной системы, а клеточный экстракт не потреблял глюкозу и целлобиозу, что свидетельствует об облигатной автотрофии штамма 3443-3Ac. Геномный анализ штамма 3443-3Ac также показал присутствие всех основных детерминант ацетогенеза и наличие Ech-комплекса. Исследование влияния присутствия ионов натрия в среде на рост штамма 3443-3Ac показало не зависимый от Na⁺ рост, а с-субъединица АТФ-синтазы не содержала Na⁺-связывающих мотивов, но содержала H⁺-связывающий сайт, что позволило отнести штамм 3443-3Ac к группе H⁺-зависимых Ech-содержащих ацетогенов.

Филогенетический анализ, основанный как на последовательностях гена 16S рРНК, так и на последовательностях белков bac120, показал, что штамм 3443-3Ac представляет отдельную ветвь уровня рода в порядке *Thermoanaerobacterales* филума Firmicutes, в результате чего нами был предложен новый род '*Aceticella*' и его типовой вид '*Aceticella autotrophica*'.

Также из пробы Нефтяной площадки Центрального термального поля кальдеры Узон с H₂ и CO₂ в газовой фазе при 70 °C и pH 6,0 была получена чистая культура ацетогенной бактерии штамм 3819-GS1. Клетки данного изолята были подвижными грамположительными палочками, способными образовывать эндоспоры. Штамм 3819-GS1 был облигатным анаэробом, умеренным термофилом, рос в интервале температур 47–75 °C с оптимумом при 65 °C и в интервале pH 6,0–8,5 с оптимумом при pH 7,0. Штамм был способен к росту в отсутствии витаминов в среде, причем скорость роста и урожай клеток оставались неизменными. Новый изолят оптимально рос в хемолитоавтотрофных условиях с H₂ в качестве донора электронов и CO₂ в качестве акцептора электронов и источника углерода, причем единственным продуктом роста являлся ацетат. Однако штамм не был способен утилизировать никакие проверенные нами органические субстраты.

Было произведено секвенирование генома штамма 3819-GS1. В результате анализа не было обнаружено генов, кодирующих ключевые ферменты пути Вуда-Льюнгдала, а также не было обнаружено ни Ech-, ни Rnf-комплексов.

Филогенетический анализ, основанный как на последовательностях гена 16S рРНК, так и на последовательностях белков bac120, показал, что штамм представляет отдельную ветвь уровня рода в семействе *Thermoanaerobacteraceae*, на основе чего нами был предложен новый род '*Acetitalea*' и его типовой вид '*Acetitalea autotrophica*'.

Основные выводы. Получена и описана чистая культура первой облигатно автотрофной ацетогенной бактерии штамм 3443-3Ac и предложены новый род и новый вид '*Aceticella autotrophica*'.

Получена и описана чистая культура новой автотрофной ацетогенной бактерии штамм 3819-GS1 и предложены новый род и новый вид '*Acetitalea autotrophica*'.

ЛИТЕРАТУРА

1. He Y., Li M., Perumal V., Feng X., Xie J., Sievert S., Wang F. Genomic and enzymatic evidence for acetogenesis among multiple lineages of the archaeal phylum Bathyarchaeota widespread in marine sediments // *Nature Microbiology*. – 2016. – Vol. 1. - № 6: 16035.
2. Ragsdale S. W., Pierce E. Acetogenesis and the Wood-Ljungdahl Pathway of CO₂ fixation // *Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics*. – 2008. – Vol. 1784. - №12. – P. 1873-1898.
3. Schuchmann K., Müller V. Autotrophy at the thermodynamic limit of life: a model for energy conservation in acetogenic bacteria // *Nature Reviews Microbiology*. – 2014. – Vol. 12. – P. 809–821.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ РАБОТЫ

Статьи

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

Тезисы

1. Гололобова А.В., Лебединский А.В., Ельченинов А.Г., Кубланов И.В., Фролов Е.Н. Первая облигатно автотрофная ацетогенная бактерия *Aceticella autotrophica* // 3-й Российский микробиологический конгресс (Псков, 26 сентября – 1 октября 2021 г.): материалы конгресса. – Псков: ООО «Конкорд». – 2021. – С. 164.
2. Фролов Е.Н., Мальцева А.И., Гололобова А.В., Лебединский А.В., Кубланов И.В. Сульфатредуцирующие прокариоты термальных источников Курило-Камчатского региона // 2-я Всероссийская научная конференция с международным участием Механизмы адаптации микроорганизмов к различным условиям среды обитания (Иркутск, 28 февраля – 6 марта 2022 г.). – Иркутск: Издательство ИГУ. – 2022. – С. 98.
3. Гололобова А.В., Ельченинов А.Г., Кубланов И.В., Фролов Е.Н. Новая термофильная облигатная автотрофная ацетогенная бактерия *Acetitalea autotrophica* // XIII молодежная школа-конференция с международным участием Актуальные аспекты современной микробиологии (Москва, 16-18 ноября 2022 г.): - Москва: ВАШ ФОРМАТ. - 2022. – С. 50. (стендовый доклад).

Gololobova Alexandra Vadimovna

RESEARCH CENTRE OF BIOTECHNOLOGY RAS NEW ACETOGENIC PROKARYOTES: TAXONOMY, METABOLISM, EVOLUTION

Abstract. First acetogenic microorganisms were discovered almost 100 years ago but some features of their bioenergetics metabolism and ecology to this day remain unexplained. These prokaryotes are of great interest to both microbiology and biotechnology because of their ability to grow autotrophically and utilize a wide range of alternative electron acceptors. This research is focused on new acetogenic microorganisms, on their ecological, phylogenetic, and metabolic features.

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

Работа выполнена при поддержке гранта РНФ 21-14-00242 «Исследование механизмов запасаения энергии у прокариот, живущих в условиях, близких к термодинамическим пределам жизни».

Колосов Александр Владимирович

аспирант ФИЦ Биотехнологии РАН 1 года обучения

научная специальность 1.5.6. Биотехнология

e-mail: Alexander_TheChemist_Kolosoff@mail.ru

Научный руководитель

Булаев Александр Генрихович

кандидат биологических наук,

зав. лаборатории хемолитоавтотрофных микроорганизмов



ПЕРЕРАБОТКА ЭЛЕКТРОННОГО ЛОМА (ПЕЧАТНЫХ ПЛАТ) БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИМИ МЕТОДАМИ

Аннотация. *Электронные отходы являются перспективным источником цветных и благородных металлов, в первую очередь – переработка печатных плат и микросхем электронных устройств. Конвенциональные технологии переработки электронных отходов основаны на пирометаллургических и физических подходах, что сопряжено с высокими затратами на энергию и высоким риском загрязнения окружающей среды. Биотехнологические методы более экологичны и требуют меньших операционных расходов, однако, в промышленном масштабе они не распространены по ряду причин: нестабильность биологических объектов при высоких концентрациях металлов, низкая скорость процесса, токсическое воздействие сопутствующих органических компонентов электронных отходов на микроорганизмы. В докладе рассмотрены основные стратегии и направления исследований биотехнологической переработки электронных отходов.*

Ключевые слова: *электронные отходы, биогидрометаллургия, биосорбция, биовыщелачивание, ацидофильные микроорганизмы*

Рынок электроники растет колоссальными темпами, в связи с чем количество электронных отходов, которые необходимо утилизировать, также возрастает. Электронные платы являются необходимым компонентом большинства приборов: компьютеров, телевизоров, смартфонов, бытовой техники. В связи с данной тенденцией утилизация старой техники представляется перспективным направлением для получения ресурсов, особенно различных ценных металлов [1].

Основными подходами для извлечения металлов из печатных плат являются гидрометаллургические технологии (выщелачивание серной кислотой, растворами хлоридов, тиомочевины, царской водкой, ионными жидкостями), а также широко распространены технологии непрерывного пиролиза. Данные подходы обладают рядом недостатков: высокая стоимость выщелачивающих агентов, высокий риск загрязнения окружающей среды, высокие затраты электроэнергии, низкая технологичность процессов [2]. Несовершенство имеющихся технологий является причиной для проведения исследований как для оптимизации существующих процессов, так и для поиска рациональных альтернатив, одной из которых являются биотехнологии.

Биотехнологические подходы заключаются в применении ацидофильных и цианогенных бактерий, микроскопических грибов, а также высших растений в сочетании с гидрометаллургическими методами. Наиболее часто описываются методы, основанные на использовании ацидофильных бактерий, которые позволяет перевести металлы в ионную форму посредством механизмов прямого и косвенного выщелачивания [3]. Исследуется бактериальная сорбция ионов и наночастиц драгоценных металлов [4]. Низшие грибы также представляют интерес для исследователей, так как способны накапливать металлы в мицелии в виде наночастиц, а также способны образовывать комплексы

за счет образования внешних метаболитов низкомолекулярной и полимерной структуры [5].

Предметом исследований часто выступают модификации среды, способы предобработки сырья, методики выделения продуктов из биомассы, внесение дополнительных субстратов при проведении процесса выщелачивания, динамика процесса, а также поиск микроорганизмов и изучение их смешанных культур, применимых для эффективной переработки печатных плат [6, 7, 8]. Современные исследования биотехнологических подходов в переработке электронных отходов сосредоточены на анализе извлечения цветных металлов посредством одностадийного процесса выщелачивания, что не совсем уместно в случае комплексного полиметаллического сырья. Тем не менее, в некоторых работах [8,9], описывающих применение сообщества ацидофильных микроорганизмов, достигается относительно высокие показатели выщелачивания – более 90% по меди из измельченных печатных плат, но попутного извлечения благородных металлов не происходит. Применение двухстадийного выщелачивания с последующей обработкой биокека практически не описываются в случае выщелачивания электронного лома сообществом микроорганизмов. Также применение дополнительных источников железа и серы описываются на уровне исследования питательных сред, что экономически менее выгодно, чем применение отходов других металлургических производств, что создает дополнительные возможности для исследования.

Основные выводы. Биовыщелачивание электронного лома затруднено наличием токсичных органических соединений и высоких концентраций тяжелых металлов, поэтому более эффективно перерабатывать данное сырье возможно методом двухстадийного выщелачивания ацидофильными микроорганизмами с рециклом выщелачивающего раствора.

ЛИТЕРАТУРА

1. Shittu, Olanrewaju S., Ian D. Williams, and Peter J. Shaw. Global E-waste management: Can WEEE make a difference? A review of e-waste trends, legislation, contemporary issues and future challenges // *Waste Management*. – 2021. – Vol. 120 – P. 549-563.
2. Islam A. et al. Advances in sustainable approaches to recover metals from e-waste-A review // *Journal of Cleaner Production*. – 2020. – Vol. 244. – P. 118815.
3. Díaz-Martínez M. E. et al. Microbial bioleaching of Ag, Au and Cu from printed circuit boards of mobile phones // *Current microbiology*. – 2019. – Vol. 76. – № 5. – P. 536-544.
4. Kwok R. Inner Workings: How bacteria could help recycle electronic waste // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2019. – Vol. 116. – № 3. – P. 711-713.
5. Xia M. et al. Extraction and characterization of extracellular polymeric substances from a mixed fungal culture during the adaptation process with waste printed circuit boards // *Environmental Science and Pollution Research*. – 2019. – Vol. 26. – № 22. – P. 22137-22146.
6. Natarajan, Gayathri, and Yen-Peng Ting. Gold biorecovery from e-waste: an improved strategy through spent medium leaching with pH modification // *Chemosphere*. - 2015 – Vol. 136. – P. 232-238.
7. Karwowska, Ewa, et al. Bioleaching of metals from printed circuit boards supported with surfactant-producing bacteria // *Journal of Hazardous Materials*. – 2014. - Vol. 264 – P. 203-210.
8. Bryan, C. G., et al. The use of pyrite as a source of lixiviant in the bioleaching of electronic waste // *Hydrometallurgy* – 2015. – Vol. 152 – P. 33-43.
9. Işildar, Arda, et al. Two-step bioleaching of copper and gold from discarded printed circuit boards (PCB) // *Waste Management* – 2016 – Vol. 57 – P. 149-157.

**RESEARCH CENTER OF BIOTECHNOLOGY RAS
PROCESSING OF ELECTRONIC SCRAP (PRINTED BOARDS)
BY BIOTECHNOLOGICAL METHODS**

Abstract. Electronic waste is a promising source of non-ferrous and precious metals, primarily the processing of printed circuit boards and microcircuits of electronic devices. Conventional e-waste recycling technologies are based on pyrometallurgical and physical approaches, which are associated with high energy costs and a high risk of environmental pollution. Biotechnological methods are more environmentally friendly and require lower operating costs, however, they are not widespread on an industrial scale for a number of reasons: the instability of biological objects at high concentrations of metals, the low speed of the process, the toxic effect of the accompanying organic components of electronic waste on microorganisms. The report discusses the main strategies and research directions of biotechnological processing of electronic waste.

Keywords: electronic waste, biohydrometallurgy, biosorption, bioleaching, acidophilic microorganisms.

Лобанова Ярослава Владимировна

аспирант ФИЦ Биотехнологии РАН 1 года обучения

научная специальность 1.5.3 Молекулярная биология

e-mail: yaraloban@yandex.ru

Научный руководитель

Женило Светлана Валерьевна

кандидат физико-математических наук,

с.н.с. лаборатории геномики и эпигеномики позвоночных



ВЗАИМНАЯ РЕГУЛЯЦИЯ СУМОИЛИРОВАНИЯ МЕТИЛ-ДНК СВЯЗЫВАЮЩЕГО БЕЛКА KAISO И ТРАНСКРИПЦИОННОГО КОРЕПРЕССОРА TRIM28

Аннотация. Посттрансляционные модификации могут значительно изменять активность транскрипционных факторов, влияя на их конформацию, клеточную локализацию, взаимодействие с кофакторами и ДНК. Одной из таких модификаций является сумоилирование белков. Kaiso является метил-ДНК связывающим фактором, играющим важную роль в ряде нормальных и патологических процессов. Ранее было показано, что сумоилирование Kaiso может переключать его транскрипционную активность, однако факторы, вовлеченные в этот процесс, до сих пор не были определены. В данной работе мы показали, что E3 SUMO и убиквитин лигаза TRIM28 напрямую взаимодействует с Kaiso, и значительно усиливает его сумоилирование, тем самым снижая активность Kaiso в качестве метил-зависимого транскрипционного репрессора.

Ключевые слова: метилирование ДНК, эпигенетика, транскрипционный фактор, метил-ДНК связывающий белок, сумоилирование

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

Kaiso является метил-ДНК связывающим фактором, играющим важную роль в ряде нормальных и патологических процессов: от регуляции клеточного цикла до развития злокачественных новообразований [Lopes *et al.*, 2008; Jones *et al.*, 2012; Koh *et al.*, 2014]. Ранее было показано, что сумоилирование Kaiso может переключать его транскрипционную активность, однако факторы, вовлеченные в этот процесс, до сих пор не были определены [Zhenilo *et al.*, 2018]. В данной работе мы показали, что E3 SUMO и убиквитин лигаза TRIM28 напрямую взаимодействует с Kaiso, и значительно усиливает его сумоилирование, тем самым снижая активность Kaiso в качестве метил-зависимого транскрипционного репрессора (Рис. 1). Также было продемонстрировано, что сумоилирование TRIM28 в свою очередь существенно усиливается в присутствии Kaiso (Рис. 2), чего нельзя было сказать о влиянии на модификацию TRIM28 ближайшего гомолога Kaiso ZBTB4.

TRIM28 является не только E3 лигазой [Ivanov *et al.*, 2007], но и выступает в качестве структурного белка, который формирует корепрессионный комплекс с ДНК метилтрансферазами, гистондеацетилазами [Quenneville *et al.*, 2011]. Такой комплекс связывается с ДНК за счет взаимодействия с метил-ДНК связывающими белками семейства KRAB в импринтированных участках и на участках ДНК, содержащих транспозоны. Мы предположили, что Kaiso может играть роль в привлечении

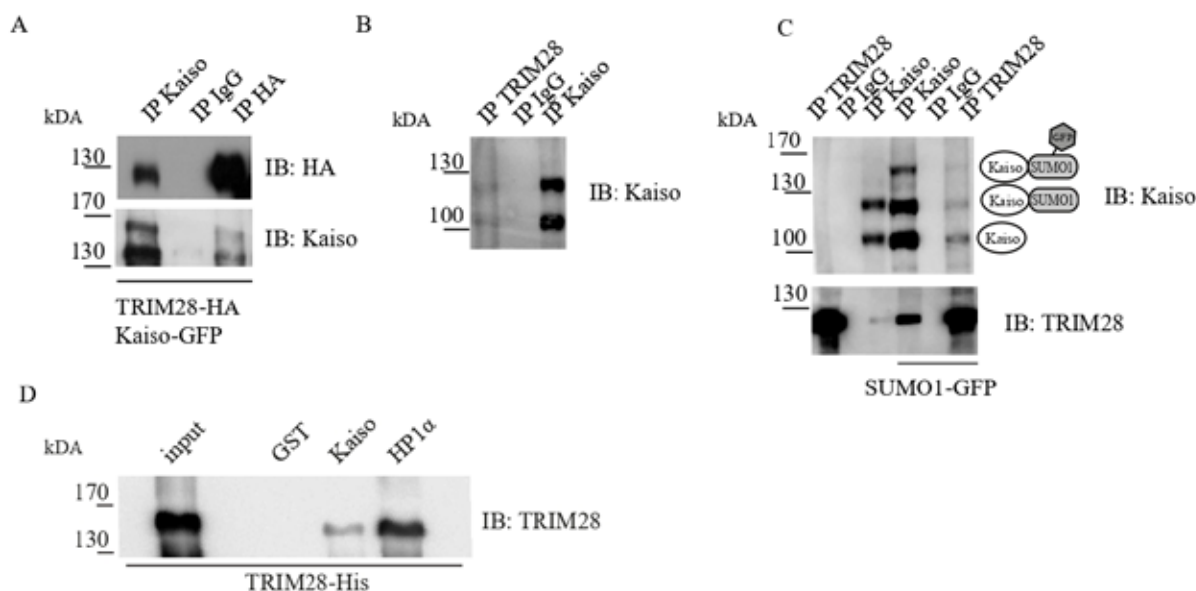


Рис. 1. Взаимодействие Kaïso и TRIM28. Коиммунопреципитация экзогенного (А), эндогенного (В) Kaïso и TRIM28 в присутствии и в отсутствии SUMO1 (С). (D) GST-копреципитация бактериально экспрессированного TRIM28-His с Kaïso-GST и HP1α-GST.

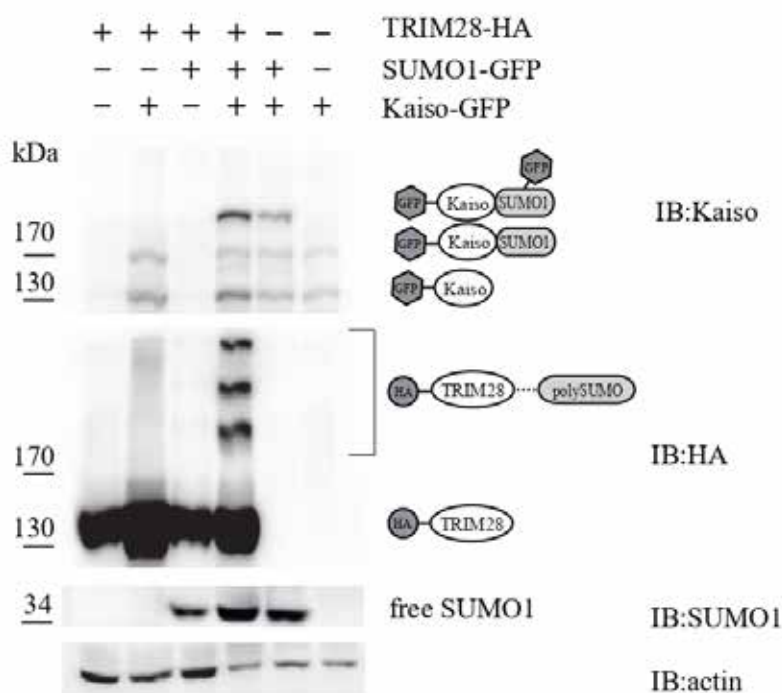


Рис. 2 TRIM28 и Kaïso усиливают сумоилирование друг друга. Клетки HEK293 трансфицировали Kaïso-GFP, SUMO1-GFP и TRIM28-HA, количество белка оценивали с помощью вестерн-блоттинга.

TRIM28 к ДНК. При удалении Kaïso в клетках светлоклеточного рака человека Saki1 количество белка TRIM28, связанного с хроматином, снижалось.

Таким образом, мы показали, что в регуляцию сумоилирования Kaïso вовлечена E3 SUMO лигаза TRIM28. Причем коэкспрессия Kaïso и TRIM28 приводит к гиперсумоилированию TRIM28, что позволяет рассматривать Kaïso в качестве потенциальной E3 SUMO лигазы. Исходя из наших данных,

взаимодействие TRIM28 и Kaiso может иметь значение не только для их посттрансляционных модификаций, но и для регуляции привлечения TRIM28 на хроматин.

Основные выводы. В регуляцию сумоилирования Kaiso вовлечена E3 SUMO лигаза TRIM28, коэкспрессия Kaiso и TRIM28 приводит к гиперсумоилированию TRIM28, что позволяет рассматривать Kaiso в качестве потенциальной E3 SUMO лигазы.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ivanov, A.V. et al. (2007) 'PHD domain-mediated E3 ligase activity directs intramolecular sumoylation of an adjacent bromodomain required for gene silencing', *Molecular cell*, 28(5), pp. 823–837.
2. Jones, J. et al. (2012) 'Nuclear Kaiso Indicates Aggressive Prostate Cancers and Promotes Migration and Invasiveness of Prostate Cancer Cells', *The American Journal of Pathology*, pp. 1836–1846. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2012.08.008>.
3. Koh, D.-I. et al. (2014) 'KAISO, a critical regulator of p53-mediated transcription of CDKN1A and apoptotic genes', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(42), pp. 15078–15083.
4. Lopes, E.C. et al. (2008) 'Kaiso Contributes to DNA Methylation-Dependent Silencing of Tumor Suppressor Genes in Colon Cancer Cell Lines', *Cancer Research*, pp. 7258–7263. Available at: <https://doi.org/10.1158/0008-5472.can-08-0344>.
5. Perry, J.J.P., Tainer, J.A. and Boddy, M.N. (2008) 'A SIM-ultaneous role for SUMO and ubiquitin', *Trends in biochemical sciences*, 33(5), pp. 201–208.
6. Quenneville, S. et al. (2011) 'In embryonic stem cells, ZFP57/KAP1 recognize a methylated hexanucleotide to affect chromatin and DNA methylation of imprinting control regions', *Molecular cell*, 44(3), pp. 361–372.
7. Zhenilo, S. et al. (2018) 'DeSUMOylation switches Kaiso from activator to repressor upon hyperosmotic stress', *Cell death and differentiation*, 25(11), pp. 1938–1951.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ РАБОТЫ

Статьи

1. Lobanova, Y., Filonova, G., Kaplun, D., Zhigalova, N., Prokhortchouk, E., & Zhenilo, S. (2023). TRIM28 regulates transcriptional activity of methyl-DNA binding protein Kaiso by SUMOylation. *Biochimie* (Vol. 206, pp. 73–80).

Тезисы

1. Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии. Сборник тезисов. XXXIII ЗИМНЯЯ МЕЖДУНАРОДНАЯ МОЛОДЁЖНАЯ НАУЧНАЯ ШКОЛА. Москва, 2021. Издательство: Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН. Лобанова Я.В., Женило С.В., Картирование доменов, вовлеченных во взаимодействие белков TRIM28 и KAISO, eLIBRARY ID: 45751894 (устный доклад, диплом второй степени в конкурсе молодых ученых).
2. Сборник тезисов 26-ой Пущинской школы-конференции молодых ученых с международным участием «БИОЛОГИЯ – НАУКА XXI ВЕКА». Пущино: ФИЦ ПНЦБИ РАН, 2023. – 358 с. Лобанова Я.В., Женило С.В., Взаимная регуляция сумоилирования метил-ДНК связывающего белка Kaiso и транскрипционного корепрессора TRIM28 (постерный доклад).

RESEARCH CENTER OF BIOTECHNOLOGY RAS
MUTUAL REGULATION OF SUMOYLATION OF METHYL-DNA BINDING
PROTEIN KAISO AND TRANSCRIPTIONAL COREPRESSOR TRIM28

Abstract. Posttranslational modifications can significantly alter the activity of transcription factors, affecting their conformation, cellular localization, and interaction with cofactors and DNA. One such modification is the SUMOylation of proteins. Kaiso is a methyl-DNA binding factor that plays an important role in a number of normal and pathological processes. It has previously been shown that SUMOylation of Kaiso can switch its transcriptional activity, but the factors involved in this process have not yet been identified. In this work, we have shown that TRIM28 E3-SUMO and ubiquitin ligase interacts directly with Kaiso and significantly enhances its sumoylation, thereby reducing Kaiso's activity as a methyl-dependent transcriptional repressor.

Keywords: DNA methylation, epigenetics, transcriptional factor, methyl-DNA binding protein, SUMOylation.

Пахомова Мария Дмитриевна

аспирант ФИЦ Биотехнологии РАН 1 года обучения
научная специальность 1.5.3 Молекулярная биология
e-mail: mari.pakhomova.99@mail.ru
Научный руководитель

Агафонов Михаил Олегович

доктор биологических наук,
руководитель группы геномного редактирования
промышленных микроорганизмов



ИНАКТИВАЦИЯ ГЕНОВ, ОТВЕТСТВЕННЫХ ЗА РАЗНЫЕ ТИПЫ ГЛИКОЗИЛИРОВАНИЯ, В ШТАММЕ *OGATAEA PARAPOLYMORPHA*, ПРОДУЦИРУЮЩЕМ ГЕНЕТИЧЕСКИ КОДИРУЕМЫЙ ИНДИКАТОР КАЛЬЦИЯ GEM-GECO

Аннотация. Одним из препятствий для использования дрожжей в качестве продуцентов секретируемых рекомбинантных белков является нежелательное гликозилирование целевого продукта. Решением этой проблемы может быть инактивация генов штамма-реципиента, ответственных за определенные стадии разных типов гликозилирования. Однако подобные мутации, как правило, приводят к изменениям физиологии дрожжевых клеток, механизмы которых в существенной степени не изучены. Одним из нарушений, возникающих при инактивации генов гликозилирования, является повышение чувствительности к детергентам. Подобный эффект наблюдается также и при нарушении контроля концентрации кальция в цитозоле. Поэтому можно было предполагать, что существует связь между проявлениями нарушений гликозилирования и гомеостазом кальция в цитозоле. Чтобы это проверить, нужно было иметь возможность наблюдать за изменением концентрации кальция в цитозоле у мутантов с нарушением гликозилирования. С этой целью на данном этапе работы нами были получены штаммы, продуцирующие индикатор кальция GEM-GECO, в которых были инактивированы гены *PMT1*, *PMT2*, *PMT4*, кодирующих протеин-О-маннозилтрансферазы эндоплазматического ретикула, а также *MNN2*, кодирующий α -1,2-маннозилтрансферазу аппарата Гольджи.

Ключевые слова: протеин-О-маннозилтрансферазы, α -1,2-маннозилтрансфераза, GEM-GECO, *Ogataea parapolymorpha*, гликозилирование, гомеостаз кальция

В настоящее время невозможно представить фармацевтическую и биотехнологическую промышленности без использования белков - ферментов, гормонов, антител и т.д. Однако получение необходимых белковых продуктов из тканей животных часто осложнено их невысокой концентрацией в природных источниках, сложностью очистки, а также риском контаминации вирусными частицами или прионами. По этой причине особую значимость приобрела технология рекомбинантных ДНК, позволяющая получать штаммы микроорганизмов, синтезирующие гетерологичные белки. В качестве организмов-хозяев экспрессии чужеродных белков часто используют дрожжи, поскольку они сочетают в себе преимущества одноклеточных организмов (простоту генетических манипуляций и культивирования клеток, скорость роста и ферментации) со способностью обеспечивать правильную укладку и посттрансляционный процессинг белков высших эукариот [1]. Однако несмотря на наличие некоторой схожести секреторные аппараты дрожжей и высших эукариот различны, что накладывает ограничение на использование дрожжей в качестве экспрессионной системы [2]. Одной из подобных преград является отличие в гликозилировании. Решением данной проблемы может быть нарушение генов штамма-продуцента, ответственных за

определенные стадии разных типов гликозилирования. Однако известно, что многие нелетальные мутации гликозилирования белков приводят к изменению физиологии дрожжевых клеток, например, к повышению чувствительности к детергентам [3]. В нашей лаборатории было установлено, что у дрожжей *Ogataea parapolymorpha* при добавлении в среду додецилсульфата натрия (SDS) резко повышается концентрация кальция в цитозоле (неопубликованные данные), а инактивация гена вакуолярной Ca^{2+} -АТФазы *Pmc1*, участвующей в поддержании концентрации цитозольного катиона Ca^{2+} , ведет к увеличению чувствительности к SDS [4]. Целью данной работы являлось определение возможной взаимосвязи механизмов нарушения гомеостаза кальция и нарушения гликозилирования.

Ранее в нашей лаборатории был получен штамм *O. parapolymorpha*, несущий рекомбинантный ген, который кодирует флуоресцентный кальциевый индикатор GEM-GECO [5]. Этот индикатор позволяет отслеживать изменения концентрации Ca^{2+} в цитозоле клеток дрожжей [6]. В этом штамме ген GEM-GECO находится под контролем сильного промотора *MAL1*, который индуцируется в присутствии сахарозы. Штамм, продуцирующий GEM-GECO, был трансформирован кассетами для инактивации генов, ответственных за определенные стадии О- и N-гликозилирования: протеин-О-маннозилтрансфераз *PMT1*, *PMT2*, *PMT4* и α -1,2-маннозилтрансферазы *MNN2*. В результате гомологичной рекомбинации кассет с геномным локусом происходило замещение части генов на плазмидные последовательности, включающие селективный маркер ген *LEU2*. Поскольку у дрожжей *O. parapolymorpha* фрагменты ДНК, используемые для трансформации, часто интегрируют в случайные локусы генома, был проведен первичный скрининг трансформантов на увеличение чувствительности к SDS и повышенной температуре инкубации. Для того чтобы определить, произошла ли инактивация целевого гена в результате интеграции соответствующей кассеты, отобранные клоны были проверены методом ПЦР. Таким образом, были отобраны клоны *pmt1-Δ*, *pmt2-Δ*, *pmt4-Δ* и *mnn2-Δ*, продуцирующие индикатор кальция GEM-GECO в присутствии сахарозы. Полученные штаммы планируется использовать для изучения связи между нарушениями гомеостаза кальция и гликозилирования на следующих этапах работы.

Основные выводы. Нами были получены штаммы, продуцирующие индикатор кальция GEM-GECO, в которых были инактивированы гены *PMT1*, *PMT2*, *PMT4*, кодирующих протеин-О-маннозилтрансферазы эндоплазматического ретикула, а также *MNN2*, кодирующий α -1,2-маннозилтрансферазу аппарата Гольджи.

ЛИТЕРАТУРА

1. Idiris A., Tohda H., Kumagai H. et al. Engineering of protein secretion in yeast: strategies and impact on protein production // Appl. Microbiol. Biotechnol. – 2010. – Vol. 86. – P. 403–417.
2. Delic M., Göngrich R., Mattanovich D., Gasser B. Engineering of Protein Folding and Secretion—Strategies to Overcome Bottlenecks for Efficient Production of Recombinant Proteins // Antioxid. Redox Signal. – 2014. – Vol. 21. – P. 414–437.
3. Kanik-Ennulat C., Montalvo E., Neff N. Sodium orthovanadate-resistant mutants of *Saccharomyces cerevisiae* show defects in Golgi-mediated protein glycosylation, sporulation and detergent resistance // Genetics. – 1995. – Vol. 140. – P. 933–943.
4. Fokina A., Socolov S., Hyun Ah Kang, Ter-Avanesyan M., Agaphonov M. Inactivation of *Pmc1* vacuolar Ca^{2+} ATPase causes G_2 cell cycle delay in *Hansenula polymorpha* // Cell Cycle. – 2012. – Vol. 11 (4). – P. 778 – 784.
5. Kulakova M.V., Karginov, A.V., Alexandrov A.I., Agaphonov M.O. The GEM-GECO Calcium Indicator Is Useable in *Ogataea parapolymorpha* Yeast, but Aggravates Effects of Increased Cytosolic Calcium Levels // Int. J. Mol. Sci. – 2022. – Vol. 23. – P. 10004.
6. Koldenkova V., Nagai T. Genetically encoded Ca^{2+} indicators: Properties and evaluation // Biochim. Biophys. Acta. – 2013. – Vol. 1833 (7). – P. 1787–1797.

**RESEARCH CENTER OF BIOTECHNOLOGY RAS
INACTIVATION OF GENES RESPONSIBLE FOR DIFFERENT TYPES
OF GLYCOSYLATION IN THE *OGATAEA PARAPOLYMORPHA* STRAIN
PRODUCING THE GENETICALLY ENCODED CALCIUM
INDICATOR GEM-GECO**

Abstract. One of the difficulties of using yeast as producer of secreted recombinant proteins is the undesirable glycosylation of the target product. The solution of this problem may be inactivation of the recipient strain genes responsible for certain stages of glycosylation different types. However, such mutations usually result in alterations of the yeast cells physiology, the mechanisms of which have not been studied to a significant extent. One of the disruptions occurring with the glycosylation genes inactivation is increasing sensitivity to detergents. A similar effect is also observed with disruptions of the cytosol calcium concentration control. Therefore, it could be assumed that there is a connection between the manifestations of glycosylation disorders and calcium homeostasis in the cytosol. To verify this we need to be able to observe changes in the cytosol calcium concentration in mutants with disturbed glycosylation. For this purpose, at this stage of our work we obtained strains producing the GEM-GECO calcium indicator in which the PMT1, PMT2, PMT4 genes encoding protein-O-mannosyltransferase of the endoplasmic reticulum were inactivated, as well as MNN2 encoding α -1,2-mannosyltransferase of the Golgi apparatus.

Keywords: protein-O-mannosyltransferases, α -1,2-mannosyltransferase, GEM-GECO, *Ogataea parapolymorpha*, glycosylation, calcium homeostasis.

Салтыкова Виктория Алексеевна

аспирант ФИЦ Биотехнологии РАН 1 года обучения

научная специальность 1.5.11 Микробиология

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

Научный руководитель

Дедыш Светлана Николаевна

доктор биологических наук,

зав. лабораторией молекулярной экологии

и филогеномики бактерий



КОНСТРУИРОВАНИЕ МИКРОБНЫХ МЕТАНОТРОФНЫХ АССОЦИАЦИЙ ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ БЕЛКА ОДНОКЛЕТОЧНЫХ НА МЕТАНЕ

Аннотация. Разработка современных технологий производства кормов, сбалансированных по содержанию белка и аминокислотному составу, представляет одно из приоритетных направлений программы продовольственной безопасности РФ. Метанотрофные бактерии, способные использовать метан в качестве единственного источника углерода и энергии, являются перспективными продуцентами биопротеина. Исследования в рамках кандидатской диссертации ставят целью направленное формирование состава микробной ассоциации для штамма-продуцента белка *Methylococcus capsulatus*, которая будет обеспечивать стабильность процесса ферментации, высокие продукционные характеристики и биобезопасность получаемого продукта. Работа первого года была направлена на мониторинг ранее сформированной метанотрофной ассоциации, а также на поиск и выделение новых бактерий-спутников, способных к эффективной утилизации метаболитов, образующихся в процессе непрерывного культивирования.

Ключевые слова: метанотрофная ассоциация, бактерии-спутники, рост на метане, незащищенное культивирование, непрерывное культивирование, белок одноклеточных

Одним из приоритетных направлений программы продовольственной безопасности РФ является разработка современных технологий производства кормов, сбалансированных по содержанию белка и аминокислотному составу. Перспективной технологией получения таких кормов является использование одноклеточных микроорганизмов как продуцентов кормового белка (биопротеина). Среди потенциальных продуцентов биопротеина особое место занимают метанотрофные бактерии – метаболически уникальная группа прокариот, способных использовать метан в качестве единственного источника углерода и энергии. Высокий биотехнологический интерес к этой группе микроорганизмов связан с низкой стоимостью и большими объемами добываемого в России природного газа.

При непрерывном культивировании метанотрофных бактерий на природном газе в условиях незащищенной ферментации спонтанно формируются микробные ассоциации, состоящие из метанотрофа-продуцента и гетеротрофных бактерий-спутников, которые утилизируют продукты метаболизма и лизиса клеток метанотрофа [2; 4; 5]. Метаболическая сбалансированность состава метанотрофной ассоциации во многом определяет стабильность процесса ферментации и качество получаемого продукта. Данные о составе ассоциации важны не только для определения спектра спутников-гетеротрофов, стимулирующих рост продуцента, но и для обеспечения биобезопасности производства, так как в ходе незащищенной ферментации нельзя исключить

спонтанное развитие микроорганизмов с условно патогенным потенциалом. Работа в рамках диссертации ставит своей целью направленное формирование состава метанотрофной ассоциации, обеспечивающей стабильность процесса ферментации, высокое качество получаемого продукта и его биобезопасность.

Исследования первого года были направлены на решение следующих задач: 1) проведение молекулярного анализа ассоциации, формирующейся при непрерывном культивировании нового потенциального штамма-продуцента - *Methylococcus capsulatus* KN2 - при различных температурах; 2) поиск и выделение новых бактерий-спутников для производственной ассоциации, способных ассимилировать метанол или ацетат.

Объект исследования - *Mc. capsulatus* KN2- был получен ранее сотрудниками лаборатории [3]. Данный штамм имеет повышенный температурный оптимум, что может позволить избежать появления в составе ассоциации факультативных патогенов, обеспечивая биобезопасность конечного продукта. Ранее выполненный подбор потенциальных спутников штамма-продуцента позволил рекомендовать к включению в состав производственной ассоциации *Brevibacillus* sp. S6 и *Hydrotalea* sp. S21, которые показали стабильный рост в ассоциации с метанотрофами рода *Methylococcus*.

Культивирование проводили в ферментёрах с рабочим объёмом 1 л при геометрическом объеме 1.5 л, при средней скорости потока не менее 0.25 ч⁻¹ при трёх температурах: 42, 45 и 48 °C. Для молекулярного анализа состава метанотрофной ассоциации из каждого ферментёра на третьей и четвёртой неделе культивирования были отобраны аликвоты клеточных суспензий, ДНК из которых выделяли с использованием набора DNeasy Power Soil Kit (Qiagen). Исследование состава метанооксиляющей ассоциации осуществляли путем секвенирования ПЦР-амплифицированных фрагментов варибельного региона V3–V4 гена 16S рРНК с помощью технологии MiSeq (Illumina).

Анализ состава гетеротрофного компонента исследуемых сообществ показал присутствие широкого спектра бактерий, среди которых доминировали представители родов *Brevibacillus*, *Hydrotalea*, *Anoxybacillus* и *Paenibacillus*. Степень представленности той или иной группы бактерий варьировала в зависимости от температуры культивирования (42, 45 и 48 °C). Исходно внесенные в ассоциацию спутники *Brevibacillus* sp. S6 и *Hydrotalea* sp. S21 сохранялись в составе метанооксиляющей культуры при 42°C и 45°C. При 45°C доля клеток *Brevibacillus* и *Hydrotalea* была стабильной на протяжении всего эксперимента. Повышение температуры культивирования до 48°C приводило к элиминированию клеток *Hydrotalea* sp. S21 и уменьшению количества клеток *Brevibacillus* sp. S6, с одновременным увеличением доли клеток рода *Anoxybacillus*. Представители этого рода имеют крупные (до 5-7 мкм в длину и 1-3 мкм в ширину) клетки, возрастание доли которых в сообществе приводит к снижению содержания белка в конечном продукте. Следовательно, культивирование метанооксиляющего сообщества при повышенной температуре (48°C) является нецелесообразным.

Помимо мониторинга ранее подобранных бактерий-спутников стояла задача поиска дополнительных ассоциантов, способных утилизировать метанол или ацетат. Для этого производили высеив культуральной жидкости из ферментёров на чашки с агаризованной средой R2A с метанолом (0.5%) или ацетатом (500 мг/л). Культивирование проводили при 42°C с последующим скринингом посевов и идентификацией колоний с помощью анализа последовательности генов 16S рРНК. Попытки выделить спутников-метилотрофов результатов не дали, однако был получен изолят бактерий рода *Allomeiothermus* (ранее известного как *Meiothermus*), идентифицированный как *Allomeiothermus silvanus*. Виды этого рода утилизируют органические кислоты, в том числе ацетат [1]. Изучение физиологических особенностей полученного штамма и его потенциала как компонента производственной ассоциации является предметом дальнейших работ.

Основные выводы. Молекулярный анализ состава метанотрофного сообщества, формирующегося при незащищённом непрерывном культивировании *Methylococcus capsulatus* KN2, показал стабильное присутствие в ассоциации ранее отобранных бактерий-спутников *Hydrotalea* sp. S21 и *Brevibacillus* sp. S6 при температурах культивирования 42 и 45°C, но выявил их замещение бактериями рода *Anoxybacillus* при 48°C.

Культивирование метанооксиляющего сообщества при температуре 48°C нецелесообразно

ввиду снижения содержания белка в конечном продукте за счет увеличения вклада в бактериальную биомассу клеток рода *Anoxybacillus*.

Из метанотрофной ассоциации получен изолят стабильно присутствующих в ней бактерий вида *Allomeiothermus silvanus*, предположительно ответственных за утилизацию органических кислот, в том числе ацетата.

ЛИТЕРАТУРА

1. Albuquerque L., Rainey F.A., da Costa M.S. *Meiothermus*. / L. Albuquerque, F.A. Rainey, M.S. da Costa // *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria* / M.E. Trujillo, S. Dedysh, P. DeVos, B. Hedlund, P. Kämpfer, F.A. Rainey, W.B. Whitman). – 2018. – <https://doi.org/10.1002/9781118960608.gbm00476.pub2>
2. Bothe H., Møller Jensen K., Mergel A., Larsen J., Jørgensen C., et al. Heterotrophic bacteria growing in association with *Methylococcus capsulatus* (Bath) in a single cell protein production process // *Applied Microbiology and Biotechnology*. – 2002. – Vol. 59. – P. 33–39.
3. Oshkin I. Y., Danilova O. V., But S. Y., Miroshnikov K. K., Suleimanov R. Z., Belova S. E., Tikhonova E. N., Kuznetsov N. N., Khmelenina V. N., Pimenov N. V., Dedysh S. N. Expanding characterized diversity and the pool of complete genome sequences of *Methylococcus* species, the bacteria of high environmental and biotechnological relevance // *Frontiers in Microbiology*. – 2021. – art. 12.
4. Stock M., Hoefman S., Kerckhof F.M., Boon N., De Vos P., De Baets B., et al. Exploration and prediction of interactions between methanotrophs and heterotrophs // *Res. Microbiol.* – 2013. – Vol. 164. – P. 1045–1054.
5. Ошкин И.Ю., Белова С.Э., Хохлачев Н.С., Семенова В.А., Червякова О.П., Чернушкин Д.В., Тихонова Е.Н., Марданов А.В., Равин Н.В., Попов В.О., Пименов Н.В., Дедыш С.Н. Молекулярный анализ состава микробного сообщества, формирующегося при непрерывном культивировании *Methylococcus* sp. Концепт-8 на природном газе // *Микробиология*. – 2020 – Т. 89. – №5. – С. 556-565.

Saltykova Viktoria Alekseevna

FEDERAL RESEARCH CENTRE OF BIOTECHNOLOGY CONSTRUCTION OF MICROBIAL METHANOTROPHIC CONSORTIA FOR PRODUCING SINGLE-CELL PROTEIN FROM METHANE

Abstract. The development of modern technologies for the production of feed, balanced in protein content and amino acid composition, is one of the priority trends of the food security program of the Russian Federation. Methanotrophic bacteria that use methane as the sole source of carbon and energy are promising bioprotein producers. The purpose of this PhD work is the targeted construction of the microbial consortium of *Methylococcus capsulatus* and satellite bacteria, which will provide the stability of the fermentation process, high production characteristics and biosafety of the resulting product. The work of the first year was aimed at monitoring the previously selected satellites of methanotrophs and isolating new bacterial strains that could effectively utilize metabolites produced by methanotrophs during continuous cultivation.

Keywords: methanotrophic consortia, satellite bacteria, growth on methane, unprotected cultivation, continuous cultivation, single-cell protein.

Степанова Наталия Вячеславовна

аспирант ФИЦ Биотехнологии РАН 1 года обучения

научная специальность 1.5.6 Биотехнология

e-mail: stepanovanatalia.v@yandex.ru

Научный руководитель:

Смоликова Галина Николаевна

кандидат биологических наук, доцент

кафедры физиологии и биохимии растений

Санкт-Петербургского государственного

университета, доцент НОЦ ФИЦ Биотехнологии РАН



ДИНАМИКА ЭКСПРЕССИИ ФОТОСИНТЕТИЧЕСКИХ ГЕНОВ В ПРОЦЕССЕ ЭМБРИОГЕНЕЗА *PISUM SATIVUM* L.

Аннотация. Научная проблема, решению которой посвящена наша работа, связана с изучением влияния спектрального состава света на фотохимическую активность и эффективность протекания фото-зависимых синтетических процессов, связанных с накоплением запасных питательных веществ в зародышах формирующихся семян. Объектом исследования является горох посевной (*Pisum sativum* L.). В отчетный период проведен сравнительный анализ фотохимической активности листьев, перикарпа, кожуры и семядолей гороха при созревании семян и изучена зависимость их фотохимической активности от спектрального состава света. Показано, что фотохимически активная радиация, проходящая сквозь перикарп и кожуру, характеризуется высокой долей зеленого и дальнего красного света; при этом синий свет отсутствует, а количество красного света составляет примерно 2% от солнечной радиации. Однако этого количества света достаточно для протекания фотохимических реакций, которые мы оценивали методом РАМ-флуориметрии.

Ключевые слова: *Pisum sativum* L., семена, формирование семян, фотосинтез, РАМ-флуориметрия, хлорофиллы, каротиноиды

В последнее десятилетие стало активно развиваться направление, связанное с изучением т.н. «нелистового» фотосинтеза (non-foliar photosynthesis), который позволяет растениям более эффективно ассимилировать CO_2 и тем самым улучшать синтез органических веществ (Simkin et al., 2019). К «нелистовому» типу фотосинтеза также относят процессы, происходящие в формирующихся семенах многих видов растений (Shackira et al., 2022; Smolikova et al., 2018; Смоликова и др., 2016). Предполагают, что главная функция эмбриональных хлоропластов заключается в генерации НАД(Ф)Н и АТФ, которые далее расходуются на образование запасных питательных веществ (Allen et al., 2009; Schwender et al., 2004). Показано, что в этом процессе участвует рибулозобисфосфаткарбоксилаза (РубисКО) (Allen et al., 2009; Schwender et al., 2004). При этом механизмы протекания остальных этапов цикла Кальвина остаются невыясненными. Считают, что основным источником CO_2 является сахароза, поступающая из материнского растения, а также CO_2 , выделяющийся митохондриями (Allen et al., 2009; Schwender et al., 2004). Однако, механизмы фотохимических и связанных с ними фото-зависимых синтетических процессов в формирующихся семенах изучены недостаточно.

Целью работы являлся сравнительный анализ фотохимических реакций, протекающих в зеленых листьях и зародышах формирующихся семян гороха сорта Глория. Растения выращивали в сосудах объемом 2 л, в универсальном грунте с внесением питательного раствора Jensen/UA-CEA (16 ч день / 8 ч ночь, влажность воздуха 75 %, температура 22-23°C) в двух модулях, различающихся по спектральному составу света – 1-й модуль освещался синими (400–500 нм) и красными

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

Семена изучали в процессе формирования – на ранней и средней стадиях созревания. Ранняя стадия характеризуется окончанием эмбриогенеза и началом накопления запасных питательных веществ в семядолях формирующихся семян. На средней стадии активно синтезируются запасные питательные вещества и семядоли занимают весь внутренний объем семени. Ранняя и средняя стадии созревания характеризуются присутствием хлорофиллов в тканях плодов и активными фотохимическими процессами в хлоропластах зародышей (Smolikova et al., 2018a, 2018b; Smolikova et al., 2020).

Спектральный состав света оценивали при помощи спектрорадиометра UPRtek PG100N (Тайвань). PPFD (photosynthetic photon flux density) синего, зеленого и красного света в среднем составляло 43, 32 и 170 мкмоль фотонов/ (м² с), соответственно. Содержание хлорофиллов измеряли неинвазивно при помощи портативного измерителя AtLeaf (США). Также был освоен спектрофотометрический метод выделения хлорофиллов и каротиноидов. Оценку фотохимической активности проводили методом РАМ-флуориметрии с использованием PAR-FluorPen FP 110 (Photon Systems Instruments, Чехия), согласно протоколу производителя. Оценивали максимально эффективный фотохимический квантовый выход фотосистем, измеряемый после темновой адаптации тканей (Fv/Fm) и реальный фотохимический квантовый выход фотосистем, измеряемый после световой адаптации тканей (Y(II)). Fv/Fm показывает потенциальную эффективность фотосистем в зависимости от того при каких условиях был сформирован фотосинтетический аппарат. Y(II) характеризует фотохимическое использование энергии возбуждения хлорофилла на свету.

Основные выводы. Показано, что фотохимически активная радиация, проходящая сквозь перикарп и кожуру, характеризуется высокой долей зеленого и дальнего красного света; при этом синий свет отсутствует, а количество красного света составляет примерно 2%. Несмотря на низкую энергетическую освещенность, фотохимические процессы протекали даже в центре семядолей, хотя их эффективность была невысока. На ранней и средней стадии созревания семян максимально эффективный квантовый выход (Fv/Fm) был равен в среднем 0.5 на периферии семядолей и 0.3 в центре семядолей. На периферии семядолей, сформированных при освещении растений синим, зеленым и красным светом, показатель Y(II) был выше, чем при освещении только синим и красным светом. Таким образом, фотохимическая активность семядолей регистрируется при практически полном отсутствии синего света, низком уровне красного света и сравнительно высоком уровне зеленого света.

Далее на основании биоинформатического анализа будут отобраны целевые гены световых и темновых реакций фотосинтеза в листьях растений и изучена их дифференциальная экспрессия в тканях формирующихся семядолей. Полученные результаты позволят установить степень их вовлеченности в синтез запасных питательных веществ в формирующихся зародышах и предложить научно обоснованный подход для получения семян высокого качества с использованием методов генетического редактирования.

ЛИТЕРАТУРА

1. Смоликова Г.Н., Медведев С.С. Фотосинтез в семенах хлороэмбриофитов // Физиология растений. 2016. - Т. 63. - С. 3–16. doi:10.7868/S0015330315060160.
2. Allen D.K., Ohlrogge J.B., Shachar-Hill Y. The role of light in soybean seed filling metabolism // The Plant Journal. - 2009. - Vol. 58. - P. 220–234. doi:10.1111/j.1365-313X.2008.03771.x.
3. Schwender J., Goffman F., Ohlrogge J.B., Shachar-Hill Y. Rubisco without the Calvin cycle improves the carbon efficiency of developing green seeds // Nature. 2004. V. 432. P. 779–782. doi:10.1038/nature03145.
4. Shackira A.M., Sarath N.G., Aswathi K.P.R., Pardha-Saradhi P., Puthur J.T. Green seed photosynthesis: What is it? What do we know about it? Where to go? // Plant Physiology Rep. 2022. - Vol. 27. - P. 573–579. doi:10.1007/s40502-022-00695-4.
5. Simkin A.J., Faralli M., Ramamoorthy S., Lawson T. Photosynthesis in non-foliar tissues: implications for yield // The Plant Journal. - 2019. - P. 1001-1015. doi:10.1111/tpj.14633.

6. Smolikova G., Dolgikh E., Vikhnina M., Frolov A., Medvedev S. Genetic and hormonal regulation of chlorophyll degradation during maturation of seeds with green embryos // International Journal of Molecular Sciences. – 2018a. - Vol. 18/ - P. 1993. doi:10.3390/ijms18091993.

7. Smolikova G., Kreslavski V., Shiroglazova O., Bilova T., Sharova E., Frolov A., Medvedev S. Photochemical activity changes accompanying the embryogenesis of pea (*Pisum sativum*) with yellow and green cotyledons // Functional Plant Biology. - 2018b. - Vol. 45. - P. 228-235. doi:10.1071/FP16379.

8. Smolikova G., Shiroglazova O., Vinogradova G., Leppyanen I., Dinastiya E., Yakovleva O., Dolgikh E., Titova G., Frolov A., Medvedev S. Comparative analysis of the plastid conversion, photochemical activity and chlorophyll degradation in developing embryos of green-seeded and yellow-seeded pea (*Pisum sativum*) cultivars // Functional Plant Biology. - 2020. - Vol. 47. - № 5. - P. 409. doi:10.1071/FP19270.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ:

Тезисы

1. Степанова Н.В., Камионская А.М., Медведев С.С., Смоликова Г.Н. Сравнительный анализ фотосинтетических реакций в листьях и формирующихся зародышах *Pisum sativum* L. // Тезисы докладов научной конференции «В генетику – через разные отрасли науки и практики» Научного центра генетики и наук о жизни, Научно-технологический университет «Сириус». Сочи, 11–13 апреля 2023 г.

2. Смоликова Г.Н., Закурин А.О., Степанова Н.В., Камионская А.М., Медведев С.С. Функциональная роль покровов семени в обеспечении фотохимической активности формирующихся зародышей *Pisum sativum* L. // Тезисы докладов всероссийской научной конференции с международным участием «Физиология растений и феномика как основа современных фитобиотехнологий». Нижний Новгород, 27–30 сентября 2022 г. - С. 211.

Stepanova Nataliia Vyacheslavovna

RESEARCH CENTER OF BIOTECHNOLOGY RAS DYNAMICS OF EXPRESSION OF PHOTOSYNTHETIC GENES DURING *PISUM SATIVUM* L. EMBRYOGENESIS

Abstract. We studied the effect of the light spectral composition on the photochemical activity and efficiency of photo-dependent synthetic processes associated with the accumulation of reserve nutrients in the embryos of developing pea seeds. The object of the study was the common pea (*Pisum sativum* L.). We analyzed the photochemical activity in pea leaves, pericarps, coats, and cotyledons during seed maturation and showed the dependence of their photochemical activity on the light spectral composition. Photochemically active radiation transmitted through the pericarp and coat reached a high proportion of green and far-red light; however, there was no blue light, and the red light was approximately 2% of solar radiation. Nevertheless, this light is sufficient for photochemical reactions, which we evaluate by PAM fluorometry.

Keywords: *Pisum sativum* L., seeds, seed maturation, photosynthesis, PAM fluorometry, chlorophylls, carotenoids.

Работа выполняется при поддержке РНФ за счет гранта № 22–26–00273 (<https://rscf.ru/project/22-26-00273>) на базе экспериментальной установки искусственного климата (ЭУИК).

Федорук Диана Вадимовна

аспирант ФИЦ Биотехнологии РАН 1 года обучения

научная специальность 1.5.11. Микробиология

e-mail: dianafedoruk@mail.ru

Научный руководитель

Ошкин Игорь Юрьевич

кандидат биологических наук,

с.н.с. лаборатории молекулярной экологии

и филогеномики бактерий

Бахарев Владимир Валентинович

доктор химических наук,

зав. кафедрой «Технология пищевых производств и биотехнология», декан факультета пищевых производств Самарского государственного технического университета



НОВЫЕ РЕШЕНИЯ В БИОТЕХНОЛОГИИ ПРОИЗВОДСТВА КОРМОВОГО БЕЛКА НА ОСНОВЕ МЕТАНОТРОФНЫХ БАКТЕРИЙ

Аннотация. Мировой дефицит белка различных кормов к началу XXI века по некоторым данным оценивался в 30-35 млн. тонн в год. Восполнение этого дефицита возможно за счет производства биомассы на основе микробиологического синтеза. Применение метанотрофных бактерий в качестве продуцентов биомассы лежит в основе перспективной технологии получения кормового белка из природного газа. Масштабное промышленное производство кормового белка (Гаприна) из природного газа с использованием термотолерантного метанотрофа *Methylococcus capsulatus* ВСБ-874 было реализовано в СССР в середине 1980-х годов. В настоящее время идет разработка технологии второго поколения на основе существенно расширенных знаний о физиологических, метаболических и генетических особенностях метанотрофных бактерий.

Ключевые слова: метанотрофные бактерии, кормовой белок, оптимизация минеральной среды, редкоземельные металлы, продукционные характеристики

Биотехнология производства протеина направлена на создание биологически полноценных кормовых и пищевых продуктов микробиологического синтеза – естественных концентратов белка и витаминов. Широкое использование микроорганизмов как продуцентов белка обусловлено значительной скоростью роста, высоким содержанием белка, относительной простотой культивирования [2].

Перспективной технологией создания сбалансированных кормов является использование одноклеточных микроорганизмов для получения биомассы, богатой микробным белком (биопротеина). В качестве продуцентов кормового белка рассматриваются как микроводоросли (*Arthrospira*, *Chlorella*), так и грибы (*Saccharomyces*, *Fusarium*). Однако особое внимание исследователей по всему миру приковано к представителям бактерий – метанотрофам.

Метанотрофные бактерии являются уникальной группой микроорганизмов, специализированных на использовании метана в качестве единственного источника углерода и энергии [6, 9]. Первичное окисление метана до метанола у этих бактерий катализируется метанмонооксигеназами, которые представлены растворимой и мембранной формами. Метанотрофы распространены в различных природных местообитаниях и способны потреблять до 80 % биогенного метана, снижая эмиссию этого ключевого парникового газа в атмосферу [1, 3, 6].

Одним из важных аспектов исследований в области получения кормового белка с использованием метанотрофов является оптимизация минеральной среды, а также подбор новых минеральных компонентов с целью оценки их влияния на продукционные характеристики процесса ферментации, а именно содержание белка и генерирование биомассы в единицу времени (продуктивность). Потенциально

перспективными компонентами минеральной среды являются лантаноиды из группы редкоземельных элементов. Лантаноиды входят в активный центр альтернативной формы метанолдегидрогеназы (XoxF) [7]. В одной из работ было установлено, что в присутствии лантаноидов в среде XoxF является основным ферментов окисления метанола – второго по счету соединения в цепочке C1-превращений в метанотрофах [5]. Также было показано, что *Methylobacterium alcaliphilum* 20Z демонстрировал более высокую скорость роста на среде с лантаноидами по сравнению с аналогичным показателем на стандартной среде [4].

Объектом исследования являлся *Mc. capsulatus* KN2, полученный из образцов активного ила сотрудниками лаборатории [8]. Большинство известных представителей таксона *Mc. capsulatus* являются термотолерантами с оптимумом роста при 42 °С. Температурный оптимум штамма KN2 смещен в сторону более высоких температур (45-50 °С). Это свойство позволяет предотвратить появлению факультативных патогенов и обеспечить биобезопасность конечного продукта.

Исследования первого года были направлены на решение следующих задач: 1) установление влияния лантаноидов на продукционные характеристики *Mc. capsulatus* KN2; 2) установление продукционных характеристик штамма KN2 при температурах 42, 45, 48 °С с целью выбора оптимального температурного режима при культивировании на природном газе.

Эксперименты проводили с использованием среды следующего состава (г л⁻¹): KCl, 0,125; MgSO₄·7H₂O, 0,125; (NH₄)₂SO₄, 0,35; H₃PO₄ (75 %), 0,25 мл/л и 1 мл раствора микроэлементов следующего состава (мг/л): ZnSO₄·7H₂O, 0,6; MnSO₄·4H₂O, 1,2; CuSO₄·5H₂O, 4,4; FeSO₄·7H₂O, 4,2; CoSO₄·6H₂O, 0,576; Na₂MoO₄, 0,69; NiCl₂·6H₂O, 0,52. При исследовании влияния лантаноидов на продукционные характеристики штамма KN2 в опытный ферментер дополнительно вносили 10 мкмоль La(NO₃)₃·6H₂O. Культивирование проводили на природном газе при постоянной температуре 45 °С, pH 6,2 и перемешивании 1000 об/мин. Для поддержания pH титрование осуществляли 0,5 % раствором NH₄OH. Природный газ и воздух подавали со скоростью 100 и 300 мл/мин, соответственно. Во время ферментации определяли продуктивность и содержание белка в сухой биомассе. Продуктивность процесса ферментации оценивали по весу абсолютно сухого вещества (АСВ). Для определения АСВ из ферментера отбирали аликвоту 40 мл суспензии, центрифугировали в фальконах объемом 50 мл при 10000 об/мин в течение 20 минут. Супернатант сливали, а осажденную биомассу высушивали в течение 2 ч при температуре +105 °С. Вес абсолютно сухого вещества измеряли на аналитических весах и пересчитывали на 1 л клеточной суспензии. Для измерения белка накопленную биомассу сразу после сепарации помещали на хранение при -40 °С. Замороженную биомассу в количестве 150 г лиофильно высушивали в течение 3 суток. Полученную сухую биомассу измельчали в порошок. Долю белка в сухой биомассе определяли методом Кьельдаля.

В результате проведенных экспериментов было установлено, что продуктивности процессов ферментации в опытном и контрольном ферментерах оказались близки и составили 0,22±0,23 и 0,23±0,12 г л⁻¹ч⁻¹. Содержание белка в сухой биомассе, полученной при ферментации с добавлением лантана и на стандартной среде составило 71,6±0,1 и 71,2±0,1 %, соответственно.

Другое направление работ включало установление продукционных характеристик штамма KN2 при температурах 42, 45, 48 °С. Параллельное культивирование проводили в 3-х ферментерах при pH 5,9 и перемешивании 1000 об/мин с варьированием температурного режима. Для поддержания pH титрование осуществляли 0,5 % раствором NH₄OH. Природный газ и воздух подавали со скоростью 100 и 300 мл/мин, соответственно.

Из трех тестируемых температур наиболее стабильный рост штамма KN2 наблюдался при 45 °С (25 суток). Средняя скорость разбавления в проточном режиме в каждом из ферментеров превышала 0,25 ч⁻¹. Продуктивность во всех трех экспериментальных ферментерах варьировала в диапазоне 0,42-0,49 г л⁻¹ч⁻¹. Наибольшая продуктивность (0,49±0,06 г л⁻¹ч⁻¹) была получена при 48 °С. Однако при 48 °С содержание белка снижалось до 66-68 %, что может быть связано с увеличением доли крупных клеток спутников-бацилл в составе ассоциации. Доли белка в сухой биомассе при 45 и 42 °С оказались близки и составили около 70 %.

Основные выводы. Установлено, что внесение лантана в минеральную среду не привело к статистически значимому увеличению продуктивности и содержания белка в сухой биомассе по сравнению с ферментацией на стандартной среде.

В условиях подтвержденного отсутствия снижения продукционных характеристик возможным

преимуществом использования лантаноидов может служить способность XoxF окислять формальдегид, т.к. накопление формальдегида в культуральной жидкости может отрицательно влиять на стабильность и длительность процесса ферментации. Для подтверждения этой гипотезы требуются дальнейшие исследования.

Культивирование штамма при 45 °С наиболее оптимально, т.к. обеспечивает высокие показатели продуктивности и содержания белка в биомассе. Культивирование штамма при 48 °С не рекомендуется, т.к. приводит к низкому содержанию белка в биомассе, что не соответствует стандартам получения микробного белка на природном газе.

ЛИТЕРАТУРА

1. Гальченко В.Ф. Метанотрофные бактерии // Москва: ГЕО. – 2001. – 500 с.
2. Миронов П.В. Биотехнология пищевых и кормовых продуктов // Красноярск: СибГУ. – 2017. – 94 с.
3. Троценко Ю.А., Хмеленина В.Н. Экстремофильные метанотрофы // под ред. Гальченко В.Ф. Пушино: ОНТИ ПНЦ РАН. – 2008. – С. 206.
4. Akberdin I. R., Thompson M., Hamilton R., Desai N., Alexander D., Henard C.A., Guarnieri M.T., Kalyuzhnaya M.G. Methane utilization in *Methylobacterium alcaliphilum* 20ZR: A systems approach // Sci. Rep. - 2018. - Vol. 8. - № 1. - P. 1–13.
5. Chu F., Lidstrom M. E. XoxF acts as the predominant methanol dehydrogenase in the type I methanotroph *Methylobacterium buryatense* // J. Bacteriol. - 2016. - Vol. 198. - № 8. - P. 1317–1325.
6. Hanson R., Hanson T. Methanotrophic bacteria // Microbiol. Rev. - 1996. - Vol. 60. - № 2. - P. 439–471.
7. Hibi Y., Asai K., Arafuka H., Hamajima M., Iwama T., Kawai K. Molecular structure of La³⁺-induced methanol dehydrogenase-like protein in *Methylobacterium radiotolerans* // J. Biosci. Bioeng. - 2011. - Vol. 111. - № 5. - P. 547–549.
8. Oshkin I. Y., Danilova O. V., But S. Y., Miroshnikov K. K., Suleimanov R. Z., Belova S. E., Tikhonova E. N., Kuznetsov N. N., Khmelenina V. N., Pimenov N. V., Dedysh S. N. Expanding Characterized Diversity and the Pool of Complete Genome Sequences of Methylococcus Species, the Bacteria of High Environmental and Biotechnological Relevance // Front. Microbiol. - 2021. - Vol. 12.
9. Trotsenko Y. A., Murrell J. C. Metabolic Aspects of Aerobic Obligate Methanotrophy // Adv Appl Microbiol. - 2008. Vol. 63. - P. 183-229.

Fedoruk Diana Vadimovna

FEDERAL RESEARCH CENTRE OF BIOTECHNOLOGY NEW SOLUTIONS IN BIOTECHNOLOGY OF SINGLE-CELL PROTEIN PRODUCTION BASED ON METHANOTROPHIC BACTERIA

Abstract. By the beginning of the 21st century, the need for global feed industry was estimated at 30-35 million tons per year. Production of single-cell protein based on microbiological synthesis has the potential to fill this gap. Methanotrophic bacteria are considered as promising producers of single-cell protein from natural gas. Large-scale industrial production of single-cell protein (Gaprin) on natural gas using the thermotolerant methanotroph *Methylococcus capsulatus* VSB-874 was realized in the USSR in the mid-1980s. To date, this technology has the potential to be improved on the basis of significantly expanded knowledge of the physiological, metabolic, and genetic characteristics of methanotrophic bacteria.

Keywords: methanotrophic bacteria, feed protein, optimization of the mineral environment, rare earth metals, production characteristics.

Шевцов Андрей Вадимович

аспирант ФИЦ Биотехнологии РАН 1 года обучения

научная специальность

1.5.8 Математическая биология, биоинформатика

e-mail: andreader@yandex.ru

Научный руководитель

**Медведева Юлия Анатольевна**

кандидат биологических наук,

руководитель группы регуляторной транскриптомики

и эпигеномики

ОПРЕДЕЛЕНИЕ СИГНАТУР И СОСТОЯНИЙ РАЗЛИЧНЫХ ТИПОВ КЛЕТОК НА ОСНОВЕ ДАННЫХ СЕКВЕНИРОВАНИЯ ЕДИНИЧНЫХ КЛЕТОК

Аннотация. Сравнительный анализ профилей экспрессии клеток в различных состояниях открывает большие возможности для поиска предполагаемых мишеней воздействия на состояния клеток. В своем исследовании мы хотели найти ключевые регуляторы и пути, которые отличают клетки пациентов с рассеянным склерозом (РС) и здоровые клетки иммунной системы, а также определить потенциальные лекарства, воздействующие на эти клетки. Для этого мы изучили транскриптомные и эпигеномные различия в состояниях единичных клеток и возможные пути перехода из одного состояния в другое. На основании найденных изменений мы предсказали молекулы, потенциально иницирующие изменение транскрипционной подписи в сторону здоровых клеток. Данный подход может служить первым этапом в репозиционировании лекарств, в частности для РС.

Ключевые слова: секвенирование, транскриптомика, транскрипционные факторы, рассеянный склероз

Каждый клеточный тип уникален, обладает отчетливыми фенотипическими свойствами, характерным транскрипционным паттерном и эпигенетическим профилем. Учитывая транскрипционные отличия даже внутри определенного типа клеток, для изучения клеточных механизмов, необходимо уметь определять транскриптом для единичных клеток. Такой метод называется секвенированием единичных клеток и позволяет определить типы клетки в образце ткани и находить отличия между этими типами.

Рассеянный склероз (РС) - широко распространенное аутоиммунно-опосредованное нейродегенеративное заболевание центральной нервной системы (ЦНС). Характерной особенностью этого заболевания является воспалительная демиелинизация нейронов с пересечением аксонов. Поскольку рассеянный склероз вызывается аутоиммунным процессом в ЦНС, основным фокусом исследования становятся мононуклеарные клетки либо периферической крови (МПК), либо спинномозговой жидкости (СМЖ). Воспалительные инфильтраты содержат Т-лимфоциты, в которых преобладают CD8⁺ клетки; также присутствуют В-клетки и плазматические клетки, хотя и в гораздо меньшем количестве [1].

Разнообразие типов клеток, участвующих в возникновении и прогрессировании рассеянного склероза, делает секвенирование одноклеточной РНК (scRNA-seq) одним из наиболее перспективных методов исследования путей, пораженных при рассеянном склерозе. scRNA-seq позволяет обнаруживать изменения в определенных типах клеток при рассеянном склерозе, контролирующее действие клетки пропорции меняются. Кроме того, наличие четких сигнатур транскрипции определенного типа клеток при РС, отличающих его от того же типа клеток у здорового донора,

предоставляет возможность подбора и кандидатных лекарств. Одним из подходов к репозиционированию лекарств с использованием транскрипционных сигнатур является метод *connectivity mapping* (СМар). СМар - это метод поиска лекарственного средства с заданным транскрипционным эффектом. СМар основан на предположении, что набор регулируемых генов (сигнатуры транскрипции), должен быть сходным для аналогичных препаратов или состояний. Когда мы знаем сигнатуру экспрессии, определяющую разницу в фенотипах сравниваемых когорт, мы можем сравнить ее с сигнатурами экспрессии различных химических агентов. Сходство вычисляется на основе значения входной метрики, которая учитывает близость списков регулируемых генов и направление регуляции. Таким образом, из базы данных можно составить список химических соединений, которые потенциально могут “обращать” профиль экспрессии клетки (переход из одного состояния в другое) [2]. LINCS L1000 [3] в настоящее время является самой популярной базой данных, содержащей транскрипционные сигнатуры различных лекарств.

В этом исследовании мы изучили публичные данные о МКПК и СМЖ пациентов с рассеянным склерозом и идиопатической внутричерепной гипертензией [4]. Для анализа дифференциальной экспрессии, кластеризации клеток мы использовали пакет методов для языка R - Seurat, а для анализа открытости хроматина - производное этого пакета – Signac [3,5] Анализ активированных биологических путей осуществляли с помощью пакета *oncoBoxlib* [3,5,6]. Для поиска транскрипционных факторов использовали пакет *shinyGO* [3,5–7]. Сравнение списков полученных в результате малых молекул производили при помощи стандартной python библиотеки для работы с таблицами *pandas*. Мы показали, что при РС нарушаются пути передачи сигналов инфламмосомы AIM2 (в плазматических дендритных клетках и миелоидных дендритных клетках), SMAD2/3 (в Т-клетках, гранулоцитах и миелоидных дендритных клетках) и активации комплемента (классические и альтернативные). Используя гены из наиболее активированных путей в качестве транскрипционных сигнатур для подхода Смар, мы обнаружили несколько потенциально эффективных малых молекул, которые могли бы компенсировать транскрипционные изменения в клетках пациентов с рассеянным склерозом, включая 16-гидрокситриптолид, AG14361, FGIN-1-27, CA-074, ARP 101, гелданамицин, флунизолид, PX12 и JAK3. Ингибитор VI для гранулоцитов. Некоторые из этих молекул уже были протестированы на мышиных моделях рассеянного склероза (ЕАЕ), например, FGIN-1-27, CA-074, ингибиторы mTOR. Среди этих молекул мы также обнаружили одобренный FDA препарат от рассеянного склероза Митоксантрон, подтверждающий наш подход.

Основные выводы. Основываясь на полученных результатах и дополнительном поиске в литературе, мы выбрали наиболее перспективные молекулы, которые мы можем предложить для дальнейших исследований: AG14361, FGIN-1-27, CA-074, ARP 101, PX12 для гранулоцитов и NK-клеток, а также Флунизолид и ингибитор JAK3 VI для гранулоцитов. Кроме того, мы считаем, что ингибиторы mTOR также должны быть дополнительно изучены. Наше исследование показывает, что ингибиторы mTOR эффективны для всех наблюдаемых типов клеток, но, возможно, следует проверить mTOR в различных комбинациях иммунных клеток, чтобы найти варианты с наименьшими побочными эффектами.

ЛИТЕРАТУРА

1. Dobson R, Giovannoni G. Multiple sclerosis – a review. *Eur J Neurol.* 2019;26: 27–40.
2. Lamb J, Crawford ED, Peck D, Modell JW, Blat IC, Wrobel MJ, et al. The Connectivity Map: using gene-expression signatures to connect small molecules, genes, and disease. *Science.* 2006;313: 1929–1935.
3. Subramanian A, Narayan R, Corsello SM, Peck DD, Natoli TE, Lu X, et al. A Next Generation Connectivity Map: L1000 Platform and the First 1,000,000 Profiles. *Cell.* 2017;171: 1437–1452.e17.
4. Schafflick D, Xu CA, Hartlehnert M, Cole M, Schulte-Mecklenbeck A, Lautwein T, et al. Integrated single cell analysis of blood and cerebrospinal fluid leukocytes in multiple sclerosis. *Nat Commun.* 2020;11: 1–14.
5. Hao Y, Hao S, Andersen-Nissen E, Mauck WM 3rd, Zheng S, Butler A, et al. Integrated analysis of multimodal single-cell data. *Cell.* 2021;184: 3573–3587.e29.

6. Sorokin M, Borisov N, Kuzmin D, Gudkov A, Zolotovskaia M, Garazha A, et al. Algorithmic Annotation of Functional Roles for Components of 3,044 Human Molecular Pathways. *Front Genet.* 2021;12. doi:10.3389/fgene.2021.617059
7. Ge SX, Jung D, Yao R. ShinyGO: a graphical gene-set enrichment tool for animals and plants. *Bioinformatics.* 2020;36: 2628–2629.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ РАБОТЫ

1. Shevtsov A, Raevskiy M, Stupnikov A, Medvedeva Y. In Silico Drug Repurposing in Multiple Sclerosis Using scRNA-Seq Data. *Int J Mol Sci.* 2023;24. doi:10.3390/ijms24020985

Shevtsov Andrey Vadimovich

RESEARCH CENTER OF BIOTECHNOLOGY RAS DETERMINATION AND EXPLORATION OF CELL STATES AND SIGNATURES, BASED ON SINGLE CELL SEQUENCING DATA

Abstract. Comparative analysis of the expression profiles of cells in various states opens up great opportunities for searching for prospective targets of influence on cell states. In our study, we aimed to find key regulators and pathways that distinguish the cells of patients with multiple sclerosis (MS) and healthy cells of the immune system, as well as identify potential drugs that affect these cells. To do this, we studied transcriptomic and epigenomic differences in the states of individual cells and possible ways of transition from one state to another. Based on the changes found, we predicted molecules that potentially initiate a change in the transcription signature towards healthy cells. This approach can serve as the first step in the repositioning of drugs, in particular for MS

Keywords: Sequencing, transcriptomics, transcription factors, multiple sclerosis.

СБОРНИК ТЕЗИСОВ

отчетной конференции аспирантов

Федерального государственного учреждения
«Федеральный исследовательский центр
«Фундаментальные основы биотехнологии»
Российской академии наук»
19 – 21 июня 2023 г.

Тираж 300 экз.

Отпечатано в типографии «ВАШ ФОРМАТ»
г. Москва, ул. Донская, 32.
(495)749-45-84
www.kniga-premium.ru

