

ОТЧЕТ О РЕАЛИЗАЦИИ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКОЙ ПРОГРАММЫ

по итогам отчетного периода

с 28.09.2021 по 31.12.2021

1. Наименование Получателя гранта: Федеральное государственное учреждение "Федеральный исследовательский центр "Фундаментальные основы биотехнологии" Российской академии наук"

2. Соглашение о предоставлении гранта в форме субсидии: №075-15-2021-1071 от "28" сентября 2021 г.

3. Тема исследовательской программы: Развитие технологий геномного редактирования для решения инновационных задач промышленных и пищевых биотехнологий

4. Направления реализации Федеральной научно-технической программы:
Генетические технологии для промышленной микробиологии

5. Финансовое обеспечение реализации исследовательской программы

Средства федерального бюджета, тыс. руб.		Средства внебюджетных источников, тыс. руб.		Всего, тыс. руб.	
план	факт	план	факт	план	факт
75000	75000	7500	7500	82500	82500

6. Достигнутые значения показателей, необходимых для достижения результата предоставления гранта, а также значений иных показателей

№ п/п	Наименование показателя	Единица измерения	Значения на отчетный период		
			запланировано	достигнуто	
Показатели					
1	Доля исследователей в возрасте до 39 лет в общей численности исследователей исследовательской программы	Процентов	45	54	

№ п/п	Наименование показателя	Единица измерения	Значения на отчетный период	
			запланировано	достигнуто
2	Количество генетических технологий, разработанных и адаптированных для обеспечения биобезопасности и технологической независимости, а также для использования в медицине, сельском хозяйстве и промышленности	Единиц	0	0
3	Количество заявок на получение патентов на изобретения в области генетических технологий	Единиц	0	0
4	Количество научных статей в области генетических технологий, опубликованных российскими исследователями в научных журналах, индексируемых в базе данных "Сеть науки" (Web of Science Core Collection)	Единиц	0	2
5	Количество обучающихся, принявших участие в разработанных образовательных программах	Единиц	0	0
6	Количество проведенных научных конференций и школ в области генетических технологий для обучающихся и исследователей в возрасте до 39 лет	Единиц	0	0
7	Количество штаммов и (или) микробных консорциумов, являющихся продуцентами в том числе незаменимых аминокислот, ферментов и витаминов, разработанных для практического использования в различных отраслях экономики Российской Федерации	Единиц	0	0
8	Объем средств из внебюджетных источников, направленных на реализацию проекта или исследовательской программы	Тыс. руб	7500	7706.314

№ п/п	Наименование показателя	Единица измерения	Значения на отчетный период	
			запланировано	достигнуто
9	Количество созданных объектов инфраструктуры, включая лаборатории, а также созданных и поддержанных центров коллективного пользования и биоресурсных коллекций в области генетических технологий	Единиц	1	1

7. Расходы на выполнение исследовательской программы, источником финансового обеспечения которых является грант

№ п/п	Наименование расходов	Фактические расходы за отчетный период (тыс. руб.)
1	оплата труда, в том числе начисления на выплаты по оплате труда и иные выплаты персоналу организаций, реализующих проект или исследовательскую программу, включая социальные выплаты;	40078.9
2	расходы на приобретение оборудования для осуществления проекта или исследовательской программы;	1731.3
3	расходы на приобретение материалов и комплектующих для оборудования в целях осуществления проекта или исследовательской программы;	15081
4	оплата командировок членов научного коллектива, реализующего проект или исследовательскую программу;	0
5	оплата стажировок молодых исследователей до 39 лет в организациях, реализующих исследовательские программы, указанные в подпунктах «б» и «в» пункта 4 Правил, или в ведущих российских и (или) иностранных научных организациях и (или) образовательных организациях высшего образования в области генетических технологий;	0
6	оплата подготовки, профессиональной переподготовки и повышения квалификации членов научного коллектива, реализующего проект или исследовательскую программу;	0
7	оплата участия членов научного коллектива, реализующего проект или исследовательскую программу, в конференциях, научных семинарах, симпозиумах;	0
8	оплата организации ежегодной научной конференции и школ для исследователей в возрасте до 39 лет по направлению проекта или исследовательской программы;	0

9	расходы, связанные с опубликованием научных статей и изданием монографий членов научного коллектива по направлению проекта или исследовательской программы;	95.9
10	оплата договоров на выполнение сторонними организациями работ, непосредственно связанных с осуществлением проекта или исследовательской программы, включая расходы на оплату научных исследований и работ, осуществляемых соисполнителями, указанными в проекте или исследовательской программе;	13863
11	оплата текущего ремонта лабораторий, а также прочих расходов, непосредственно связанных с осуществлением проекта или исследовательской программы;	999.7
12	оплата работ, услуг, в том числе услуг связи, транспортных услуг, коммунальных и эксплуатационных услуг, арендная плата за пользование имуществом (за исключением земельных участков и других обособленных природных объектов), оплата работ и услуг по содержанию имущества предоставления гранта;	3150.2
13	приобретение нефинансовых активов, в том числе основных средств, нематериальных активов и материальных запасов.	0
Всего:		75000

8. Итоги реализации исследовательской программы (проекта) за отчетный период

8.1. Достигнутые результаты исследовательской программы (проекта) и оценка их востребованности

Проведена работа по изучению делеции гена Met8 в качестве ауксотрофного маркера в промышленно-значимых дрожжах *Ogatea polymorpha*. Помимо наличия ауксотрофного фенотипа, данная делеция может быть легко детектирована за счет флуоресценции накапливающегося в клетках порфирина. Полученные результаты позволяют применять делецию Met8 в качестве удобного ауксотрофного маркера в дрожжах *O. polymorpha*.

Были созданы генетические конструкции для продукции промышленно-значимых белков реннина и альбумина в дрожжах *O. polymorpha*, а также конструкции для делеции генов биосинтеза мочевины в клетках промышленных винных дрожжей. Эти результаты позволят на следующих этапах работы получить более эффективные штаммы продуценты и штаммы винных дрожжей с улучшенными свойствами.

Проведен систематический обзор воздействий, вызывающих гибель дрожжей (в том числе в условиях контакта с органическими кислотами и спиртами, что крайне важно для винодельческих штаммов дрожжей, а также, возможно, для грибов, используемых для создания ценных продуктов с добавленной стоимостью из промышленных отходов).

Проведен анализ стратегий направленного введения изменений в геном метилотрофных дрожжей, позволяющих проводить редактирования генома с целью получения максимально продуктивных штаммов, в т.ч. выбор промоторов, локусов интеграции, векторов модификации. Рассмотрены варианты использования альтернативных промоторов в метилотрофных дрожжах *Pichia pastoris* для последующего получения целевых белков.

Проведен анализ использования системы редактирования генома CRISPR/Cas9 для редактирования геномов метилотрофных дрожжей *P. pastoris*. Проведено тестирование вектора для эписомальной экспрессии CRISPR/Cas9 в *P. pastoris* на примере создания штамма-ауксотрофа Δ ADE2. Проведен поиск и созданы генетические конструкции для создания штаммов-ауксотрофов Δ ADE2, Δ LEU2, Δ MET8 в *P. pastoris*.

Разработана стратегия получения штаммов с увеличенной продукцией транскрипционных факторов Hac1 и Fhl1p. Создана генетическая конструкция с коэкспрессией транскрипционного фактора Hac1 в *P. pastoris*.

Проведена работа по получению рекомбинантных штаммов-продуцентов “бинарных” комплексов эндоглюканазы/фитазы и ксиланазы/фитазы. Разработаны плазмиды для трансформации реципиентного штамма *P. verticulosum* 537 niaD-, содержащие гены phyA фитазы *Aspergillus niger*, eg12 эндо-1,4- β -глюканазы *Penicillium verticulosum* и хуЕ ксиланазы *Penicillium canescens*. Проведена трансформация штамма-реципиента *P. verticulosum* 537, попарно составленными комбинациями плазмид для получения “бинарных” продуцентов.

Были получены сухие формы ферментных препаратов PhyXyl и PhyEg. Для серии сухих ферментных препаратов PhyEg-36 и PhyEg-76 активность по фитату натрия составляла от 24300 до 34000 ед/г, а целлюлазной активности по бета-глюкану – от 2100 до 2400 ед/г сухого препарата. Для серии ферментных препаратов PhyXyl-2 и PhyXyl-47 активность по фитату натрия лежала в диапазоне от 24300 до 24800 ед/г, а ксиланазная активности – от 20700 до 29500 ед/г сухого препарата.

Проведены работы по разработке генетических конструкций для нокаута маркерного гена niaD, кодирующего натратредуктазу в рекомбинантных штаммах *P. verticulosum* PhyXyl и PhyEg методом CRISPR/Cas9. Разработаны две плазмиды pGS и pGSA, в которых транскрипция гена нуклеазы cas9 контролируется конститутивным промотором gpdA и терминатором cbh1 *P. verticulosum*. На 5'- и 3'-концах гена cas9 расположены последовательности, кодирующие сайты внутриядерной локализации. Для транскрипции последовательности кодирующей sgRNA используется промотор 5S рРНК гриба *A. niger*. В плазмиде pGSA дополнительно введена последовательность AMA1 для поддержания автономной транзientной репликации плазмиды в грибной клетке и предотвращения её интеграции в хромосомную ДНК гриба.

На основании проверки способности к росту как на метане, так и на метаноле, отобраны наиболее перспективные культуры для дальнейших работ по редактированию геномов метанотрофных бактерий - новые штаммы *Methylococcus capsulatus*, MIR и KN2. В качестве основного штамма выбран штамм MIR; штамму KN2 присвоен статус резервного.

Получена полная последовательность генома штамма MIR высокого качества сборки. Анализ генома позволил составить детальную картину путей первичного и промежуточного метаболизма целевого метанотрофа, что дает основу для определения возможностей оптимизации характеристик штамма с помощью метаболической инженерии.

Экспериментальная проверка подтвердила отсутствие у *Methylococcus capsulatus* MIR природной или спонтанно возникающей устойчивости к канамицину, гентамицину и спектиномицину, что потенциально позволяет использовать гены устойчивости к данным антибиотикам при генетическом редактировании этого метанотрофа.

Показана принципиальная возможность использования IncP-основанных челночных плазмид pAWP78, pSB2 и pSB3 в качестве векторов для штамма *Methylococcus capsulatus* MIR.

8.2. Создание (развитие) конкурентоспособного на мировом уровне научного коллектива

Научный коллектив включает как специалистов высокого уровня, работы которых известны в России и зарубежом, так и молодых исследователей, аспирантов и студентов. Средний возраст членов коллектива менее 39 лет. Члены коллектива имеют публикации в ведущих научных журналах, в том числе Science, Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA, Nucleic Acid Research и ISME Journal.

Один из зарубежных партнеров, Юлия Ермакова, была зачислена в коллектив ФИЦ Биотехнологии РАН и примет участие в характеристике штаммов, которые будут созданы на следующих этапах работы. Ю. Ермакова имеет h-index = 12 и является исследователем Европейской молекулярно-биологической лаборатории в Гейдельберге, Германии. Также были проведены переговоры с рядом других перспективных молодых исследователей с целью привлечения их к участию в реализации программы исследований.

8.3. Подготовка кадров и развитие кадрового потенциала

В ходе этапа МГУ им. М.В. Ломоносова была организована и проведена научная стажировка по теме «Развитие технологий геномного редактирования для решения инновационных задач промышленных и пищевых биотехнологий», в ходе которой 10 молодых исследователей в возрасте до 39 лет из ФИЦ Биотехнологии РАН прошли стажировку на биологическом факультете МГУ имени М.В.Ломоносова, направленной на формирование, закрепление, развитие практических навыков и компетенций по направлениям исследовательской программы;

Также был организован регулярный научно-практический семинар для студентов и молодых исследователей в возрасте до 39 лет по теме «Развитие технологий геномного редактирования для решения инновационных задач промышленных и пищевых биотехнологий» и проведено заседание, в котором участвовало 26 студентов и аспирантов в возрасте до 39 лет из МГУ имени М.В.Ломоносова, ВГУИТ и ФИЦ Биотехнологии РАН.

На базе ВГУИТ был организован и проведен научно-практический семинар, посвященный перспективам применения геномного редактирования в промышленных и пищевых биотехнологиях. В общей сложности в семинаре приняли участие 61 человек, из которых 79% участников составили студенты и молодые исследователи в возрасте до 39 лет.

Описанные семинары будут продолжаться в 2022-2023 годах на регулярной основе. Таким образом запланированные работы по подготовке кадров и развитию кадрового потенциала были выполнены в полном объеме.

8.4. Создание и развитие на базе научных и образовательных организаций высшего образования лабораторий и центров, осуществляющих исследования в области генетических технологий, в частности технологий генетического редактирования, и их техническая поддержка, по направлениям реализации Федеральной программы

(указывается, если исследовательская программа (проект) предусматривает реализацию данного мероприятия)

В ходе закончившегося этапа реализации исследовательской программы было создано новое подразделение - Центр микробной ферментации, его помещения были отремонтированы и подготовлены к установке нового оборудования, спецификации на которое были составлены в ходе данного этапа работ, и которое будет закуплено на следующем этапе работ. Инфраструктура и сотрудники этого центра являются ключевым звеном в решении целого ряда задач, поставленных в рамках исследовательской программы, в частности это получение сухих форм ферментных препаратов по пп. плана графика 1.2.7, 2.2.5, 2.2.8, 3.2.8, 3.2.9 и т.д.

Приложения:

1. Информационно-аналитическая справка о реализации исследовательской программы (проекта) за отчетный период

2. Отчетные документы по Плану-графику работ, выполненных в рамках реализации исследовательской программы (проекта), за отчетный период

Руководитель организации (уполномоченное лицо)

Директор

(должность)

Федоров Алексей Николаевич

(фамилия, имя, отчество)