



ТЕЗИСЫ ДОКЛАДОВ
ежегодной научной конференции
Федерального исследовательского центра
«Фундаментальные основы биотехнологии»
Российской академии наук

15-17 марта 2021

ПРОГРЕСС В РАЗРАБОТКЕ ЛЕКАРСТВЕННОГО ПРЕПАРАТА ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ COVID-19 И РЯДА ДРУГИХ ВИРУСНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

Рябова О.Б.¹, Монахова Н.С.¹, Егорова А.П.¹, Лепешкин А.Ю.¹, Попов В.О.¹, Макаров В.А.¹, Чепур С.В.², Плужников Н.Н.², Юдин М.В.², Vogner E.³, Ekins S.⁴

¹ ИНБИ, ФИЦ Биотехнологии РАН

¹ «Государственный научно-исследовательский испытательный институт военной медицины» МО РФ, СПб

¹ Charite Hospital, Berlin, Germany

¹ CCD, Raleigh, USA

Кандидат в лекарственное средство PDSTP был создан как результат работ по мишень-направленному поиску новых лекарственных препаратов, и обладает способностью специфически блокировать гепарансульфатные протеогликаны, находящиеся на клеточной стенке хозяина и, таким образом, предотвращать специфическую адсорбцию вирусов к клеткам хозяина. Этот процесс можно описать как блокирование адгезии вируса к клетке хозяина.

Механизм действия PDSTP связан с его специфическим свойством не ковалентно связываться с гепарансульфатными протеогликанами, что приводит к драматическому уменьшению числа репликаций вируса. Связывание PDSTP с гепарансульфатными протеогликанами происходит не ковалентным образом по механизму конкурентного ингибирования, при этом PDSTP вытесняется гепарином, что обеспечивает отсутствие значимой токсичности. Взаимодействие именно с клеткой хозяина, а не с самим вирусом, дает преимущество устойчивости к возможным мутациям вируса. Разработан лабораторный регламент синтеза субстанции PDSTP. Разработан прототип лекарственной формы в виде назального спрея. В рамках доклинических исследований проведен комплекс работ по исследованию безопасности субстанции PDSTP. Разработаны аналитические методики, позволяющие оценить качество субстанции PDSTP.

Исследована в различных лабораториях активность PDSTP в отношении коронавируса SARS-Cov-2 и показана высокая специфическая активность в отношении коронавируса. Проведены исследования эффективности препарата PDSTP на модели сирийских хомячков и показано прямое лечебное действие исследуемого соединения.

На модели цитомегаловируса проведена серия исследований по детализации механизма действия субстанции PDSTP.

Работа была поддержана доп заданием МОН.

Публикация:

1. Makarov V., Riabova O., Ekins S., Pluzhnikov N., Chepur S. The Past, Present and Future of RNA Respiratory Viruses: Influenza and Coronaviruses // **Pathogens and Disease**, 2020, V. 78, ftaa046. doi:10.1093/femspd/ftaa046.
2. Макаров В.А., Монахова Н.С., Рябова О.Б., Чепур С.В., Юдин М.В. Производные ди(diazoniadispiro[5.2.5.2] гексадекан)-5-нитропиримидина и их применение для лечения коронавирусных инфекций, в частности вызванных вирусом SARS-Cov-2. **Заявка на патент** 2020140398 от 18.12.2020

АНАЛИЗ ДНК ОСТАНКОВ ЧЕЛОВЕКА ИЗ МЕГАЛИТИЧЕСКИХ ГРОБНИЦ МАЙКОПСКОЙ КУЛЬТУРЫ (ПАМЯТНИКИ НОВОСВОБОДНЕНСКОГО ТИПА)

Жур К.В.¹, Трифонов В.А.², Прохорчук Е.Б.¹

¹ ИНБ, ФИЦ Биотехнологии РАН

² Институт истории материальной культуры РАН

На территории Кавказского региона располагается большое количество археологических памятников мирового значения. Наиболее уникальными являются памятники майкопской и новосвободненской археологических культур эпохи бронзы, где обнаружен целый ряд древнейших артефактов. Несмотря на хорошую изученность памятников новосвободненской культуры, дискуссии по поводу происхождения населения этой общности не прекращаются по сей день. Одни археологи рассматривают новосвободненскую общность как этап в развитии майкопской культуры, приписывая ей передневосточное происхождение, другие выделяют в самостоятельную культуру и считают, что представители общности имеют западные корни.

До того, как стало возможным выделение древней ДНК (дДНК), для определения расового состава широко применяли краниологические исследования, т.е. предположения строились на основании характеристик строения черепа. К сожалению, таких материалов, принадлежащих древним культурам этих регионов, в том числе новосвободненской, недостаточно. Кроме того, часть из них слишком фрагментарны или имеют сильно выраженные следы посмертной деформации, что не позволяет изучить вариации формы черепов. С появлением методик, позволяющих выделять дДНК, а также с совершенствованием технологий секвенирования, стало возможным получать исчерпывающую информацию не только о расовом составе исследуемой культуры, но и о направлениях миграций ее представителей, о болезнях, которые были для них характерны, в том числе инфекционных, и даже определять фенотипические характеристики исследуемых индивидуумов.

Внедрение и оптимизация современных протоколов пробоподготовки и анализа данных позволили преодолеть множество трудностей, характерных для работы с архаичными образцами, связанных с низким качеством и количеством дДНК, а также с контаминацией генетическим материалом других организмов. Данные, полученные в результате секвенирования геномов представителей майкопской и новосвободненской археологических культур, внесут огромный вклад в исследования мирового значения и позволят пролить свет на истинные события, происходившие в Кавказском регионе, и на то, как они повлияли на процессы формирования современного генетического разнообразия населения, в том числе европейского.

Работа выполнена при финансовой поддержке Минобрнауки России, грант №13.1902.21.0023 (согл. № 075-10-2020-116)»

Публикация:

Трифонов В.А., Прохорчук Е.Б., Жур К.В. Генетическое разнообразие древних народов Кавказа и сопредельной степи в эпоху энеолита - бронзы (5 - 2 тыс. до н.э.): основные результаты и проблемы культурно-исторической интерпретации // **Краткие сообщения Института археологии**. 2020. Принята в печать 10.12.2020

**ДИССИМИЛЯЦИОННАЯ СУЛЬФАТРЕДУКЦИЯ У АРХЕИ
CANDIDATUS VULCANISAETA MOUTNOVSKIA
ПРОЛИВАЕТ СВЕТ НА ЭВОЛЮЦИЮ МЕТАБОЛИЗМА СЕРЫ**

Черных Н.А., Фролов Е.Н., Мирошниченко М.Л., Меркель А.Ю., Пименов Н.В., Сорокин Д.Ю., Лебединский А.В., Бонч-Осмоловская Е.А.

ИНМИ, ФИЦ Биотехнологии РАН,

Диссимиляционная сульфатредукция (DSR) – важная реакция в биогеохимическом цикле серы – была датирована палеоархеем (3.5 миллиарда лет назад) на основе геологических данных, но ее эволюционная история плохо изучена. Несколько ветвей бактерий осуществляют DSR, у архей только *Archaeoglobus* обладает DSR, который приобрел гены DSR от бактерий. Мы обнаружили значительные темпы сульфатредукции в кислых гипертермальных наземных источниках полуострова Камчатка и приписали DSR в этой среде представителю филы *Crenarchaeota* из рода *Vulcanisaeta*. Профилирование сообщества в сочетании с радиоизотопами экспериментами и протеомикой подтвердили, что DSR осуществляет *Candidatus Vulcanisaeta moutnovskia*, который имеет все необходимые для этого гены, причем архейного происхождения. Нами так же экспериментально показано, что другие культивируемые представители *Thermoproteaceae*, которым приписывалось DSR, этой способностью не обладали. Филогенетические исследования показывают, что DSR редко встречается у архей, и что этот процесс произошел у *Vulcanisaeta* независимо от *Archaeoglobus*, путем отдельного приобретения генов *qmoABC*, филогенетически связанных с бактериальными генами *hdrA*.

Работа выполнена при частичной поддержке РФФ (грант № 17-74-30025) и Министерства науки и высшего образования РФ.

Публикация:

Chernyh N.A., Neukirchen S., Frolov E.N., Sousa F.L., Miroshnichenko M.L., Merkel A.Y., Pimenov N.V., Sorokin D.Y., Ciordia S., Mena M.C., Ferrer M., Golyshin P.N., Lebedinsky A.V., Cardoso Pereira I.A., Bonch-Osmolovskaya E.A. Dissimilatory sulfate reduction in the archaeon ‘*Candidatus Vulcanisaeta moutnovskia*’ sheds light on the evolution of sulfur metabolism // **Nature Microbiology**. 2020. V. 5 (11). P. 1428–1438. doi: 10.1038/s41564-020-0776-z.

ТИОЦИАНАТДЕГИДРОГЕНАЗА – НОВЫЙ ФЕРМЕНТ, НОВЫЙ МЕДНЫЙ ЦЕНТР, НОВАЯ ХИМИЧЕСКАЯ РЕАКЦИЯ

Тихонова Т.В.¹, Сорокин Д.Ю.¹, Hagen W.R.², Хренова М.Г.^{1,3}, Ракитина Т.В.⁴, Шабалин И.Г.⁵, Поляков К.М.⁶, Цаллагов С.И.¹, Попов В.О.¹

¹ ФИЦ Биотехнологии РАН

² Delft University of Technology, Delft, The Netherlands

³ Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова

⁴ Институт биоорганической химии им. акад. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН

⁵ University of Virginia, Charlottesville, USA

⁶ Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгарта РАН

В области биоорганической химии меди известно лишь несколько типов каталитических медных кластеров, образующих активные центры ферментов, катализирующих широкий спектр важных биохимических реакций.

Международный коллектив ученых во главе с исследователями из ФИЦ Биотехнологии РАН обнаружил и охарактеризовал новый трехядерный медный центр, вокруг которого сформирован активный центр ранее не описанного фермента – тиоцианатдегидрогеназы, выделенной из галоалкалофильных бактерий рода *Thioalkalivibrio* - микроорганизмов, способных жить в условиях высокой солености и экстремальных значениях pH среды. Показано, что фермент катализирует новую для химии тиоцианата реакцию - окисление тиоцианата до цианата и элементарной серы.

На основе структурных данных высокого разрешения, результатов ЭПР-спектроскопии, квантовохимических расчетов, результатов сайт-направленного мутагенеза и кинетических исследований был сформулирован и обоснован молекулярный механизм действия нового фермента, которому присвоен ЕС 1.8.2.7.

Публикации

Tikhonova TV, Sorokin DY, Hagen WR, Khrenova MG, Muyzer G, Rakitina TV, Shabalin IG, Trofimov AA, Tsallagov SI, Popov VO. (2020) Trinuclear copper biocatalytic center forms an active site of thiocyanate dehydrogenase // **Proc Natl Acad Sci U S A**, 117 : 5280-5290. doi: 10.1073/pnas.1922133117.

Tsallagov SI, Sorokin DY, Tikhonova TV, Popov VO, Muyzer G. (2019) Comparative Genomics of *Thiohalobacter thiocyanaticus* HRh1T and *Guyparkeria* sp. SCN-R1, Halophilic Chemolithoautotrophic Sulfur-Oxidizing Gammaproteobacteria Capable of Using Thiocyanate as Energy Source // **Front Microbiol.** 10:898. doi: 10.3389/fmicb.2019.00898. eCollection 2019.

МЕТАБОЛИЧЕСКОЕ РАЗНООБРАЗИЕ И ЭВОЛЮЦИОННАЯ ИСТОРИЯ НЕКУЛЬТИВИРУЕМОГО АРХЕЙНОГО ФИЛУМА CANDIDATUS MICRARCHAEOTA, ВЫЯВЛЕННЫЕ В РЕЗУЛЬТАТЕ МЕТАГЕНОМНОГО АНАЛИЗА ДОННЫХ ОСАДКОВ СУБАРКТИЧЕСКОГО ОЗЕРА СВЕТЛОЕ

Кадников В.В.¹, Саввичев А.С.², Марданов А.В.¹, Белецкий А.В.¹, Русанов И.И.², Пименов Н.В.², Равин Н.В.¹

¹ ИИБ, ФИЦ Биотехнологии РАН

² ИИМИ, ФИЦ Биотехнологии РАН

Недавно описанный суперфилум архей DPANN включает несколько кандидатных филумов «некультивируемых» архей с небольшими размерами клеток, редуцированными геномами и ограниченными возможностями метаболизма. Один из этих филумов, Ca. Micrarchaeota, был первоначально обнаружен в кислых шахтных водах и описан как Archaeal Richmond Mine Acidophilic Nanoorganisms (ARMAN). У этих архей отсутствуют ключевые метаболические пути, и они растут только в физической ассоциации с хозяевами – археями порядка Thermoplasmatales. Однако, помимо ARMAN, Ca. Micrarchaeota включает несколько филогенетических линий, встречающихся в разных не-экстремальных экосистемах, но ни одна из них не была охарактеризована на геномном уровне.

В результате секвенирования фрагментов генов 16S рРНК мы охарактеризовали состав микробных сообществ донных осадков меромиктического озера Светлое (Архангельская область). Различные «некультивируемые» линии архей составляли в них 30–50% сообщества. В результате секвенирования метагенома донных осадков собрано девять геномов представителей Ca. Micrarchaeota, включая полный кольцевой геном археи Ca. Micrarchaeota Sv326 (1.2 млн. нт), представляющей новый порядок “Ca. Fermentimicrarchaeales”, филогенетически далекий от линии ARMAN. Анализ генома показал, что в отличие от представителей группы ARMAN, архея Sv326 имеет полный путь гликолиза и может образовывать АТФ при брожении, она способна использовать некоторые сахара и аминокислоты в качестве субстратов, имеет пути биосинтеза нуклеотидов *de novo*, но у нее отсутствует аэробная дыхательная цепь. Мы предполагаем, что Sv326 – свободноживущий организм, а не облигатный паразит/симбионт как ARMAN археи. Сравнительный анализ геномов Ca. Micrarchaeota, представляющие разные кандидатные порядки, показал, что эволюция Ca. Micrarchaeota начиная от свободноживущего предка подобного Ca. Diapherotrites, включала потерю важных метаболических путей в разных линиях и приобретение специфических функций в процессе адаптации к зависимому от партнера образу жизни и особым условиям среды. Группа ARMAN представляет наиболее выраженный случай редукции генома и потери генов, в то время как линия Sv326 близка к предкам Ca. Micrarchaeota по своему метаболическому потенциалу. Полученные результаты расширяют имеющиеся представления о генетическом разнообразии и эволюции архей филума Ca. Micrarchaeota. Работа поддержана грантом РФФИ 18-34-20080 и Минобрнауки РФ.

Публикация:

Kadnikov V.V., Savvichev A.S., Mardanov A.V., Beletsky A.V., Chupakov A.V., Kokryatskaya N. M., Pimenov N.V., Ravin, N.V. (2020). Metabolic Diversity and Evolutionary History of the Archaeal Phylum “Candidatus Micrarchaeota” Uncovered from a Freshwater Lake Metagenome. // **Applied and Environmental Microbiology**, 86(23), e02199-20.

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ НУКЛЕОКАПСИДНОГО БЕЛКА КОРОНАВИРУСА SARS-COV2 С БЕЛКАМИ 14-3-3

Тугаева К.В.¹, Hawkins D.E.D.P.², Smith J.L.R.², Bayfield O.W.², Ker D.-S.², Сысоев А.А.¹, Клычников О.И.³, Antson A.A.², Случанко Н.Н.¹

¹ ИНБИ, ФИЦ Биотехнологии РАН

² Лаборатория структурной биологии, Университет г. Йорка, Великобритания

³ Кафедра биохимии, МГУ имени М.В. Ломоносова

Нуклеокапсидный белок (N) – структурный белок коронавирусов, в том числе SARS-CoV2 – возбудителя COVID-19. N регулирует транскрипцию и репликацию вирусного генома и способствует упаковке гРНК в вирусные частицы. N белок SARS-CoV2 имеет сложную доменную структуру и подвергается многоточечному фосфорилированию в инфицированной клетке. По данным, полученным ранее для гомологичного N белка из коронавируса SARS-CoV, фосфорилирование N приводит к удерживанию белка в цитоплазме за счет прямого связывания с регуляторными белками семейства 14-3-3 клетки-хозяина. Белки 14-3-3 человека представлены семью изоформами, которые обладают выраженной экспрессией в тканях, подверженных заражению SARS-CoV2. За счет взаимодействия с SARS-CoV2 N белки 14-3-3 могут играть важную роль в жизненном цикле коронавируса.

В данной работе был получен рекомбинантный SARS-CoV2 N и детально исследован молекулярный механизм его взаимодействия с белками 14-3-3 человека. Фосфорилированная форма SARS-CoV2 N (pN) была получена в специальной системе ко-экспрессии с протеинкиназой A в *E.coli*, что привело к фосфорилированию в составе N более 20 участков, многие из которых, по данным литературы, фосфорилируются при инфицировании SARS-CoV2 и являются потенциальными участками связывания 14-3-3. Мы показали, что только фосфоформа N взаимодействует с 14-3-3, причем связывание наблюдается со всеми семью изоформами 14-3-3 человека с микромолярной аффинностью, хотя прочность комплекса зависит от изоформы. Благодаря использованию нового детектора светорассеяния MALS было определено олигомерное состояние pN и его различных укороченных мутантных форм, а также была определена стехиометрия комплекса 14-3-3 (2:2), что было бы практически невозможно на другом оборудовании. С помощью набора укороченных мутантных N-белков мы показали, что ключевую роль во взаимодействии с 14-3-3 играет фосфорилирование остатка Ser197, расположенного в центральном разупорядоченном участке N белка. Примечательно, что этот 14-3-3-связывающий сайт является достаточно консервативным у различных коронавирусных N белков. Это позволяет предположить универсальность описанного нами механизма взаимодействия 14-3-3 с N белками коронавирусов и делает целесообразными структурные исследования комплекса 14-3-3:pN, который позиционируется как новая терапевтическая мишень для борьбы с коронавирусными инфекциями.

Публикации:

- Sluchanko NN, Bustos DM. Intrinsic disorder associated with 14-3-3 proteins and their partners // **Prog Mol Biol Transl Sci.** 2019;166:19-61.
- Tugaeva KV, Kalacheva DI, Cooley RB, Strelkov SV, Sluchanko NN. Concatenation of 14-3-3 with partner phosphoproteins as a tool to study their interaction // **Sci Rep.** 2019 Oct 18;9(1):15007.
- Sluchanko NN. Reading the phosphorylation code: binding of the 14-3-3 protein to multivalent client phosphoproteins. // **Biochem J.** 2020 Apr 17;477(7):1219-1225.
- Gogl G, Jane P, Caillet-Saguy C, Kostmann C, Bich G, Cousido-Siah A, Nyitray L, Vincentelli R, Wolff N, Nomine Y, Sluchanko NN, Trave G. Dual Specificity PDZ- and 14-3-3-Binding Motifs: A Structural and Interactomics Study // **Structure.** 2020 Jul 7;28(7):747-759.e3.
- Tugaeva KV, Titterington J, Sotnikov DV, Maksimov EG, Antson AA, Sluchanko NN. Molecular basis for the recognition of steroidogenic acute regulatory protein by the 14-3-3 protein family // **FEBS J.** 2020 Sep;287(18):3944-3966.
- Tugaeva KV, Remeeva A, Gushchin I, Cooley RB, Sluchanko NN. Design, expression, purification and crystallization of human 14-3-3ζ protein chimera with phosphopeptide from proapoptotic protein BAD // **Protein Expr Purif.** 2020 Nov;175:105707.

ХАРАКТЕРИСТИКА ЭКСТРЕМАЛЬНО ГАЛОАЛКАЛОФИЛЬНОЙ СО-ТРОФНОЙ АЦЕТОГЕННОЙ БАКТЕРИИ ИЗ ГИПЕРСОЛЕНОГО СОДОВОГО ОЗЕРА, ПРЕДСТАВЛЯЮЩЕЙ НОВУЮ ГЛУБОКУЮ ФИЛОГЕНЕТИЧЕСКУЮ ВЕТВЬ В КЛАССЕ “*NATRANAEROBIIA*” (ФИРМИКУТЫ)

Сорокин Д.Ю.^{1,2}, Diender M.³, Меркель А.Ю.¹, Koenen M.⁴, Bale N.J.⁴, Pabst M.², Damste J.S.S.⁴, Sousa D.Z.³

¹ ИИМИ, ФИЦ Биотехнологии РАН

² Department of Biotechnology, Delft University of Technology, Delft, Netherlands

³ Laboratory of Microbiology, Wageningen University, Wageningen, Netherlands

⁴ NIOZ Royal Netherlands Institute for Sea Research, Department of Marine Microbiology and Biogeochemistry, Utrecht University, Texel, Netherlands

Анаэробная накопительная культура с СО в качестве донора электронов и метанола в качестве акцептора, инокулированная анаэробными осадками из гиперсоленого содового озера в Кулундинской степи, отобрала бинарную культуру, состоящую из бактериального и архейного компонента в умеренно термофильных содонасыщенных условиях. Архейный компонент был представлен метил-редуцирующими метаногенами рода *Methanonatronarchaeum*, а бактериальный компонент - новой филогенетической ветвью внутри класса фирмикут «*Natranaerobii*». При удалении метанола из среды архея была элиминирована и бактерия выделена в чистую культуру с СО. Штамм ANCO1 оказался ацетогеном с очень ограниченным набором субстратов, включающих СО и пируват (для ацетогенного роста) и формиат/лактат при анаэробном дыхании. Анаэробное дыхание осуществляется в присутствии тиосульфата (все 4 донора), fumarата (с формиатом) и нитрата (с формиатом). При этом тиосульфат восстанавливался до сульфида и сульфита, а нитрат аммонифицировался.

Геномный анализ показал:

- 1 – наличие нескольких оперонов анаэробной CODH, в том числе в составе большого кластера, кодирующего полный набор ферментов цикла Вуда;
- 2 – несколько оперонов внутриклеточных Fe,Fe-гидрогеназ отдельно и в паре с формиатдегидрогеназой;
- 3 – оперон тиосульфатредуктазы Phs;
- 4 – аммонифицирующий оперон NrfA/Nap;
- 5 – оперон fumarатредуктазы;
- 6 – элементы первичной содовой биоэнергетики, включающие опероны Na-зависимых комплексов Rnf, F1F0-АТРазы и 2 типов декарбоксилаз.
- 7 – в качестве осмолита ANCO1 использует глицин-бетаин.

Анализ состава мембранных липидов ANCO1 показал необычное для бактерий преобладание изопреноидных эфиров, более характерных для архей и найденных только у очень небольшого количества видов термофильных бактерий. По результатам филогеномного анализа штамм ANCO1 классифицирован в качестве нового рода и вида *Natranaerofaba carboxydovora* в новом семействе *Natranaerofabaceae*.

Работа выполнена при частичной поддержке РФФИ (№ 19-04-00401 и 17-74-30025).

Публикация:

Sorokin D.Y., Diender M., Merkel A.Y., Koenen M., Bale N.J., Pabst M., Sinnighe Damste J.S., Sousa D.Z. *Natranaerofaba carboxydovora* gen. nov., sp. nov., an extremely haloalkaliphilic CO-utilizing acetogen from a hypersaline soda lake representing a novel deep phylogenetic lineage in the class “*Natranaerobii*” // **Environ. Microbiol.** doi:10.1111/1462-2920.15241 2020 Sep 21. Online ahead of print.

ПОИСК ПРОМОТОРНЫХ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ, ТАНДЕМНЫХ И ДИСПЕРСНЫХ ПОВТОРОВ В ГЕНОМЕ РИСА

Коротков Е.В., Суворова Ю.М., Костенко Д.О., Руденко В.М., Камионская А.М.

ИНБ, ФИЦ Биотехнологии РАН

Проблема множественного выравнивания аминокислотных и нуклеотидных последовательностей является одной из центральных проблем биоинформатики. Ее прямое решение методами динамического программирования возможно только для небольшого числа последовательностей (<14) в силу того, что вычислительная сложность таких задач очень быстро растет с увеличением числа последовательностей. Множественное выравнивание применяется в широком классе биологических задач, например, при поиске различных функциональных сигналов в геномных последовательностях, при предсказании третичных структур белков, при предсказании функционального значения нуклеотидных и аминокислотных последовательностей и т.д. В силу невозможности прямого решения этой задачи разработано много различных эвристических подходов для построения множественного выравнивания. Нами ранее был разработан новый математический алгоритм, позволяющий рассчитывать статистически значимое множественное выравнивание для сильно дивергировавших последовательностей оснований ДНК. Алгоритм позволяет строить множественное выравнивание от $x=0.0$ до $x=4.4$, где x есть среднее число замен оснований на нуклеотид между двумя любыми последовательностями из множественного выравнивания. Все созданные ранее эвристические решения рассчитывают множественное выравнивание до $x < 2.4$ (например, ClustalW., T-Coffee и др.). Найденное нами новое решение позволяет пересмотреть множество результатов, которые были получены биоинформатикой к настоящему моменту. В данной работе разработанный нами математический алгоритм применен для идентификации промоторных последовательностей, тандемных и дисперсных повторов в геноме риса. Всего было выявлено ~150 т. потенциальных промоторных последовательностей. Из них только около 37 тысяч не являются действующими промоторами или не принадлежат к SINE повторам или к мобильным элементам. Наличие такого числа потенциальных промоторных последовательностей может указывать на существование не выявленных ранее генов или мобильных элементов. Было обнаружено также большое количество не выявленных программой Repeat Masker дисперсных повторов (SINE) в геноме риса. Число выявленных нами тандемных повторов примерно в 5 раз превосходит количество известных в настоящее время тандемных повторов. Для пользователей создан сайт <http://victoria.biengi.ac.ru/mahds/auth>, где можно построить множественное выравнивание разработанным нами алгоритмом. Все найденные в геноме риса промоторные последовательности, дисперсные и тандемные повторы собраны в базы данных по адресам: <http://victoria.biengi.ac.ru/cgi-bin/dbPPS/index.cgi>, <http://victoria.biengi.ac.ru/cgi-bin/indelper/index.cgi>, <http://victoria.biengi.ac.ru/sinerice/>.

Публикации:

- Suvorova, Y.M., Korotkova, M.A., Skryabin, K.G., Korotkov, E.V. Search for potential reading frameshifts in cds from *Arabidopsis thaliana* and other genomes // **DNA Research**, v. 26, 157-170, 2019. DOI: 10.1093/dnares/dsy046, IF 5.4, Q1
- Suvorova, Y.M., Pugacheva, V.M., Korotkov, E.V. A Database of Potential Reading Frame Shifts in Coding Sequences from Different Eukaryotic Genomes // **Biophysics** (Russian Federation), v. 64, 339-349, 2019. DOI: 10.1134/S0006350919030217, IF 0.2
- Suvorova Yu.M. and Korotkov E.V. New Method for Potential Fusions Detection in Protein-Coding Sequences // **Journal of computational biology**. 2019. 26(11):1253-1261 DOI: 10.1089/cmb.2019.0122, Q2
- Коротков Е. В., Камионская А. М., Короткова М. А. Множественное выравнивание промоторных последовательностей генома человека // **Биотехнология**. — 2020. — Т. 36. — № 4. — С. 7—14. SCOPUS (Q4)
- Суворова Ю. М., Камионская А. М., Коротков Е. В. Поиск сильно дивергировавших SINE повторов в геноме риса // **Биотехнология**. 2020. Т. 36. № 4. С. 15—20. SCOPUS (Q4)

АНАЛИЗ ПАНГЕНОМА ДВУХ ФИЛОГЕНЕТИЧЕСКИ БЛИЗКИХ РОДОВ МЕТАНОТРОФНЫХ БАКТЕРИЙ: *METHYLOCYSTIS* И *METHYLOSINUS*

Ошкин И.Ю.¹, Мирошников К.К.¹, Груздев Д.С.², Дедыш С.Н.¹

¹ ИНМИ, ФИЦ Биотехнологии РАН,

² ИНБ, ФИЦ Биотехнологии РАН

Аэробные метанотрофные бактерии обладают уникальной способностью использовать метан в качестве источника углерода и энергии. *Methylocystis* и *Methylosinus* – два из пяти изначально описанных родов, включенных в предложенную полвека назад первую таксономическую классификацию метанотрофов. Представители этих родов широко распространены в различных местообитаниях и играют ключевую роль в регуляции потоков метана из почв и пресноводных экосистем. Первоначальное разделение этих метанотрофов на два разных рода было основано на их различиях в морфологии клеток. Дальнейшие сравнительные исследования филогении отдельных генов продемонстрировали монофилетичность каждого из этих родов. Доступ к геномным последовательностям представителей клады *Methylocystis/Methylosinus* открыл возможность глубокого анализа геномного потенциала этих метанотрофов. В настоящей работе с помощью гибридной сборки длинных и коротких прочтений была получена полная геномная последовательность метанотрофа *Methylocystis heyeri* H2^T. Представленное в докладе исследование ставило своей задачей сравнение генома *Methylocystis heyeri* H2^T с 23 доступными в настоящее время геномами видов *Methylocystis* и *Methylosinus*. Филогеномный анализ подтвердил, что представители этих родов образуют две отдельные клады. Пул из 1173 генов был обнаружен во всех проанализированных геномах, что указывает на их ключевую значимость для представителей обоих родов. Анализ совокупности других генов позволил выявить основные различия этих микроорганизмов, заключающиеся в составе арсенала ферментов окисления метана и фиксации атмосферного азота, а также распределении геномных детерминант подвижности клеток и фотосинтеза. Анализ геномных последовательностей семи таксономически описанных и 16 пока не охарактеризованных штаммов *Methylocystis* и *Methylosinus* оказался эффективным инструментом для филогенетической дифференциации этих бактерий и идентификации различных закодированных в геномах признаков, которые определяют адаптацию этих метанотрофов к широкому спектру природных сред. Открытый пангеном группы родов *Methylocystis/Methylosinus* подчеркивает необходимость дальнейших усилий по увеличению числа охарактеризованных представителей этих бактерий с определенными последовательностями генома.

Работа поддержана грантом РФФ № 18-74-00058.

Публикация:

Oshkin I.Y., Miroshnikov K.K., Grouzdev D.S., Dedysh S.N. Pan-genome-based analysis as a framework for demarcating two closely related methanotroph genera *Methylocystis* and *Methylosinus* // **Microorganisms**. 2020. V. 8. doi: 10.3390/microorganisms8050768.

МАЛАЯ РНК MTS1338 – ПОТЕНЦИАЛЬНЫЙ ФАКТОР ВИРУЛЕНТНОСТИ *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS*

Салина Е.Г.¹, Острик А.А.¹, Григоров А.С.², Майоров К.Б.³, Апт А.С.³, Ажикина Т.Л.², Капрельянц А.С.¹

¹ Институт биохимии им. А.Н. Баха, ФИЦ Биотехнологии РАН

² Институт биоорганической химии им. Шенякина и Овчинникова РАН

³ Центральный НИИ туберкулеза, Москва

Малые некодирующие РНК играют важную роль в адаптации бактерий к изменению внешних условий. Обнаружено, что малая некодирующая РНК MTS1338 *Mycobacterium tuberculosis* принимает активное участие во взаимодействии «патоген-хозяин». Так, активация иммунитета хозяина вызывала NO-индуцируемое повышение экспрессии MTS1338 в поглощенных макрофагами клетках *M. tuberculosis*. Конститутивная гиперэкспрессия MTS1338 в клетках *M. tuberculosis* улучшала их выживаемость *in vitro* в условиях стрессового воздействия. Кроме того, гетерологичекая экспрессия MTS1338 в клетках *Mycobacterium smegmatis* приводила к повышенной выживаемости бактерий в макрофагах и снижению количества зрелых фаголизосом, а также к модуляции экспрессии воспалительных цитокинов, что указывает на возможное проявление патогенных свойств у непатогенной бактерии. Изучение протеома клеток *M. smegmatis*, гиперэкспрессирующих MTS1338, выявило активацию генов, участвующих в реакции на гипоксию, синтез компонентов клеточной стенки, метаболизм железа; эти эффекты также характерны для патогенной бактерии *M. tuberculosis* при попадании ее в стрессовые условия. Таким образом, можно говорить о наличии единого механизма действия малой РНК MTS1338 на патогенные и непатогенные микобактерии и о её прямом участии во взаимодействии между *M. tuberculosis* и иммунной системой макроорганизма при инфекционном процессе.

Публикации:

А.А. Острик, Е.Г. Салина, Ю.В. Скворцова, А.С. Григоров, О.С. Быченко, А.С. Капрельянц, Т.Л. Ажикина. Малые РНК *Mycobacterium tuberculosis* в адаптации к стрессовым условиям, моделирующим инфекцию *in vitro*. // **Прикладная биохимия и микробиология**. 2020. том 56, № 4, с. 336–341

Salina EG, Grigorov A, Skvortsova Y, Majorov K, Bychenko O, Ostrik A, Logunova N, Ignatov D, Kaprelyants A, Apt A, Azhikina T. MTS1338, A Small *Mycobacterium tuberculosis* RNA, Regulates Transcriptional Shifts Consistent With Bacterial Adaptation for Entering Into Dormancy and Survival Within Host Macrophages // **Front Cell Infect Microbiol**. 2019, 9:405.

ЭКОГЕНОМИКА КИШЕЧНЫХ ВИРУСНЫХ СООБЩЕСТВ ДОМАШНИХ И ОДИЧАВШИХ ЛОШАДЕЙ *EQUUS CABALLUS*

Летаров А.В.¹, Куликов Е.Е.¹, Летарова М.А.¹, Белалов И.Ш.¹, Бабенко В.В.², Миллард А.³, Спасская Н.Н.⁴

¹ ИИМИ, ФИЦ Биотехнологии РАН

² ФНКЦ Физико-химической медицины ФМБА РФ

³ Департамент генетики и геномной биологии, Университет Лестера, Великобритания

⁴ Зоологический музей Биологического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова

Микробные сообщества (микробиомы) кишечника человека и млекопитающих представляют собой фактически самостоятельный «орган», оказывающий существенное и многостороннее влияние на физиологию макроорганизма. Эти симбиотические микробные системы включают в себя сообщества вирусов, ассоциированных как с макроорганизмом, так и с микроорганизмами, входящими в состав микробиома. Такие вирусные сообщества получили название виромов. Было установлено, что в кишечных виромах, как и в вирусных сообществах большинства иных природных местообитаний, количественно доминирующим компонентом являются бактериофаги. Основные свойства фаговых сообществ, такие как разнообразие, стабильность, индивидуальная вариабельность и другие были исследованы в значительной степени лишь для одного вида млекопитающих – человека.

В нашей работе мы провели детальное метагеномное исследование сообществ днднк-содержащих бактериофагов в фекалиях домашних лошадей (*Equus caballus*), сравнив две группы животных, содержащихся на конюшнях в г. Москва и в Подмосковье, а также группу одичавших лошадей, изолированных на острове в Ростовском государственном заповеднике. Для выполнения этой работы нами были разработаны оригинальные методики выделения метавирионов из фекалий, позволяющие проводить метагеномные исследования, не прибегая к *in vitro*-амплификации генетического материала, которая может исказить количественную оценку состава вирусных сообществ.

Наши результаты свидетельствуют, что для днднк-вирионов фекалий лошадей характерны более высокие уровни разнообразия и видового (генотипического) богатства, чем для вирионов фекалий человека. Мы не обнаружили отдельных сверхпредставленных вирусных генотипов, аналогичных CrAssphage-подобным вирусам, составляющим значительную долю некоторых индивидуальных вирионов людей. В то же время многие геномные кластеры фагов (примерно соответствующие таксономическому уровню рода) были обнаружены во всех трех географически изолированных популяциях.

Полученные данные также свидетельствуют, что генетическое разнообразие бактериофагов кишечных виринов лошадей крайне мало исследовано, и лишь небольшая доля метагеномных контигов кластеризовалась с известными полными геномами бактериофагов. Результаты исследования указывают на существенные отличия параметров экологии бактериофагов в кишечных экосистемах человека и лошади, что подчеркивает необходимость экспериментального исследования большего числа видов животных в отношении состава и динамики кишечных микробиомов.

Работа выполнена при частичной поддержке гранта РФФИ № 18-29-13029 и Минобрнауки РФ.

Публикации:

Babenko V.V., Millard A., Kulikov E.E., Spasskaya N.N., Letarova M.A., Konanov D.N., Belalov I.S., Letarov A.V. The ecogenomics of dsDNA bacteriophages in feces of stabled and feral horses // **Comput. Struct. Biotechnol. J.** 2020. V. 18. P. 3457–3467. doi: 10.1016/j.csbj.2020.10.036

Куликов Е.Е., Голомидова А.К., Бабенко В.В., Летаров А.В. Простой метод выделения ДНК вирома фекалий лошади, пригодной для секвенирования по технологии Oxford nanopore // **Микробиология.** 2020. Т. 89. С. 252–256.

ВЛИЯНИЕ ОПТИЧЕСКОГО ПРОСВЕТЛЕНИЯ КОЖИ НА ИЗМЕНЕНИЕ ИНТЕНСИВНОСТИ ФЛУОРЕСЦЕНЦИИ БЕЛКА-МАРКЕРА И МРТ-СИГНАЛА В ПОДКОЖНЫХ ОПУХОЛЯХ

Богданов-мл А.А.^{1,2}, Тучин В.В.^{1,3,4,5}, Меерович И.Г.¹, Казачкина Н.И.¹, Жердева В.В.¹, Сайдашева А.Н.¹, Соловьев И.Д.¹, Тучина Д.К.^{1,3,4}, Савицкий А.П.¹

¹ ИНБИ, ФИЦ Биотехнологии РАН

² Медицинский факультет Массачусетского университета, отделение радиологии, Вустер, Массачусетс, США

³ Саратовский национальный исследовательский государственный университет им. Н.Г. Чернышевского, Саратов;

⁴ Национальный исследовательский томский государственный университет, Томск

⁵ Институт проблем точной механики и управления РАН, Саратов

Целью работы было исследование возможности применения магнитно-резонансной томографии (МРТ) для оценки локальных изменений времени релаксации протонов после местного применения составов для оптического просветления (ОП) кожи *in vivo*.

В работе использовали бестимусных мышей с опухолями человека, полученными путем подкожной имплантации клеток, экспрессирующих красный флуоресцентный белок-маркер TagRFP. Изменение интенсивности флуоресценции (ИФ) в подкожных опухолевых очагах оценивали после нанесения диамагнитного ОП состава 70% глицерина, 5% ДМСО, 25% воды или парамагнитных составов для ОП, а именно: 1) 1,0 М гадобутрола - контрастного агента для МРТ (препарат «Гадовист», Bayer, ФРГ); 2) 0,7 М гадобутрола (70% гадобутрола, 5% ДМСО, 25% воды).

При изучении флуоресцентных свойств опухолей наблюдали увеличение ИФ и увеличение на 30-40% общего количества регистрируемых фотонов. Вслед за оптическими измерениями было определено изменение интенсивности сигнала МРТ в объеме тех же подкожных опухолей до и во время ОП. Измерения проводили при напряженности магнитного поля 1Т. МР-исследование выполнялось с использованием двух последовательностей импульсов: 1) T2-взвешенных (T2w) быстрого спин-эхо в случае диамагнитных ОП, и 2) T1-взвешенных (T1w) 3D градиент-эха для визуализации изменений МРТ сигнала, в случае парамагнитного гадобутрола. При анализе МР-изображений определяли интенсивности МР-сигналов в выбранных областях интереса и нормализовали их на Гауссов шум фона. Интерпретацию результатов проводили с учетом потенциального вклада временного изменения периферического опухолевого микроокружения, вызванного ОП составами.

Показано, что после использования ОП смеси на основе глицерина в коже и подкожном слое опухоли достоверно снижался нормализованный T2w сигнал (уменьшалось среднее время релаксации протонов) и увеличивался кажущийся коэффициент диффузии (ADC) (критерий Манна-Уитни, $p < 0,05$). В мышце увеличения ADC не наблюдалось. При применении гадобутрола на фоне ОП смеси наблюдалось снижение T1w сигнала в коже и подкожном слое опухоли из-за эффекта высокой магнитной восприимчивости при высокой концентрации гадобутрола. После аппликации и удаления остатков гадобутрола в подкожном слое опухоли наблюдалось кратковременное увеличение сигнала T1w из-за проникновения гадобутрола через кожу. Последнее наблюдалось только в случае 0,7 М гадобутрола, содержащего ДМСО.

Полученные результаты показывают, что МРТ позволяет исследовать эффекты ОП в коже и периферических подкожных тканях. Комбинирование оптической визуализации и МРТ для одного и того же вокселя (объема) живой ткани открывает перспективы повышения точности реконструкции флуоресцентного изображения и его совмещения с анатомической трехмерной структурой органа или ткани для целей мультимодальной визуализации.

Публикации:

Bogdanov AA Jr, Meerovich IG, Kazachkina NI, Zherdeva VV, Solovyev ID, Tuchina DK, Savitsky AP, Tuchin VV. Optical clearing effects in subcutaneous red-fluorescent tumors monitored by fluorescence and magnetic resonance imaging in vivo. // **Proc. SPIE 11363, Tissue Optics and Photonics**, 113630S (6 April 2020); doi: [10.1117/12.2560186](https://doi.org/10.1117/12.2560186)

Bogdanov AA Jr., Tuchin VV, Meerovich IG, Kazachkina NI, Zherdeva VV, Solovyev ID, Tuchina DK, Savitsky AP. Towards registration of optical and MR signal changes in subcutaneous tumor volume in vivo after optical skin clearing // **Proc. SPIE 11239, Dynamics and Fluctuations in Biomedical Photonics XVII**; 112390N (2020) <https://doi.org/10.1117/12.2545312>

Тучин В.В., Тучина Д.К., Савицкий А.П., Богданов А.А. Способ визуализации биологических тканей и/или органов. Патент на изобретение №2735463. Дата приоритета 14.06.19. Дата регистрации 02.11.20.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МР-КОНТРАСТНОГО АГЕНТА “ГАДОВИСТ” ДЛЯ ОПТИЧЕСКОГО ПРОСВЕТЛЕНИЯ ДЛЯ УЛУЧШЕНИЯ ВИЗУАЛИЗАЦИИ ФЛУОРЕСЦЕНЦИИ TAGRFP-ЭКСПРЕССИРУЮЩЕЙ ОПУХОЛИ

Меерович И.Г.¹, Тучина Д.К.^{1,2,3}, Жердева В.В.¹, Синдеева О.А.², Казачкина Н.И.¹, Соловьев И.Д.¹, Богданов А.А. мл.^{1,4}, Тучин В.В.^{1,2,3,5}, Савицкий А.П.¹

¹ ИНБИ, ФИЦ Биотехнологии РАН

² Саратовский национальный исследовательский государственный университет им. Н.Г. Чернышевского

³ Национальный исследовательский Томский государственный университет

⁴ Медицинская школа Массачусетского университета, Вустер, Массачусетс, США

⁵ Институт проблем точной механики и управления РАН, Саратов

Целью работы было исследование действия низкомолекулярного парамагнитного магнитно-резонансного (МР) контрастного агента “Гадовист” в качестве агента для оптического просветления (ОП) кожи лабораторных животных *in vivo* для улучшения визуализации флуоресценции.

Исследования проводили на бестимусных мышах Nu/Nu с флуоресцирующими опухолями HEp2-TagRFP, полученными после подкожной инокуляции суспензии флуоресцирующих опухолевых клеток. Флуоресцентные изображения ксенотрансплантатов опухолей мышцы получали с помощью микроскопа Nikon Eclipse TE 2000 U, оборудованного системой конфокального сканирования DCS-120, основанной на многомерном методе коррелированного по времени счета одиночных фотонов в режиме интенсивности. Возбуждение флуоресценции проводилось на длине волны 540 нм при помощи лазера WL-SC-480-6 Supercontinuum, снабженного акустооптическим перестраиваемым фильтром AOTF-V1-D-FDS-SM.

Флуоресцентные изображения ксенотрансплантата опухоли мышцы регистрировали до ОП, сразу после ОП и затем через 1 час. Изображения распределения интенсивности флуоресценции анализировали с помощью программы NIH ImageJ 1.48v, в частности, путем анализа изменения профилей интенсивности красной флуоресценции белка TagRFP, экспрессируемого в клетках опухоли HEp2-TagRFP.

Результаты исследования демонстрируют высокую эффективность просветляющего действия МР-контрастного агента “Гадовист” в исследованиях *in vivo*, особенно для участков опухоли с изначально более низкой интенсивностью флуоресценции. Полученные данные хорошо согласуются с результатами предварительных исследований эффективности использования “Гадовиста” *ex vivo*.

При использовании МРТ-агента “Гадовист” *in vivo* наблюдалось почти пятикратное увеличение контраста флуоресцентного изображения сосудов в области опухоли, что хорошо согласуется с улучшением контраста, полученным *ex vivo* для кожи мышцы. Повышенный контраст флуоресцентного изображения позволил реалистично оценить диаметр первоначально скрытой сосудистой структуры.

Также отмечено, что не наблюдалось никаких признаков какой-либо системной токсичности для исследуемых животных (включая изменение поведения) после местного применения “Гадовиста” в концентрации 1,0 М. Во время процедуры оптического просветления и на протяжении суток после неё не наблюдалось гиперемии тканей мышцы, окружающих опухоль, а также признаков воспаления в области опухолевой ткани, подвергнутой ОП.

Полученные результаты важны для мультимодальной визуализации опухолей, а именно при комбинации флуоресцентных и оптических методов с МРТ.

Публикация:

D.K. Tuchina, I.G. Meerovich, O.A. Sindeeva, V.V. Zherdeva, A.P. Savitsky, A.A. Bogdanov and V.V. Tuchin. Magnetic resonance contrast agents in optical clearing: Prospects for multimodal tissue imaging // **Journal of Biophotonics**. 2020. Vol. 13 (11). <https://doi.org/10.1002/jbio.201960249>

ЛИШАЙНИКОВЫЙ СИМБИОЗ КАК МОДЕЛЬ ХОЛОБИОНТА – ХОСТ-СПЕЦИФИЧНОЙ КОМПЛЕКСНОЙ БИОПЛЕНОЧНОЙ СТРУКТУРЫ

Панкратов Т.А.¹, Качалкин А.В.², Томашевская М.А.³, Груздев Д.С.⁴, Патутина Е.О.⁴, Колганова Т.В.⁴, Берестовская Ю.Ю.¹, Ашихмин А.А.⁵, Сузина Н.Е.³

1 ИИМИ, ФИЦ Биотехнологии РАН

2 МГУ им. М.В. Ломоносова

3 Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН, ПНЦ БИ РАН, Пушкино

4 ИИБ, ФИЦ Биотехнологии РАН

5 Институт фундаментальных проблем биологии РАН, ПНЦ БИ РАН, Пушкино

Лишайники – биологические объекты, к которым применимо понятие холобионта – надорганизменной структуры, в которой сила связей между компонентами системы меньше, чем в многоклеточном организме и больше, чем в ассоциации. Концепция холобионта применяется как для определения микробиома человека, так и для других симбиотических систем – микоризы, микрофлоры кишечника термитов и других. В сравнении с кишечной микрофлорой, растительно-бактериальными симбиозами лишайники являются крайне удобной моделью симбиоза для изучения выживания и персистенции бактерий, а также изучения их пленочного роста и взаимного контроля численности и разнообразия.

Микробные сообщества лишайников проявляют черты факультативной и облигатной ассоциативности с хозяйским организмом. Для большинства изученных лишайников характерно наличие специфической бактериальной и грибной микрофлоры. Функциональное и таксономическое разнообразие бактерий остается крайне слабо изученным. Доминирующими группами бактерий в лишайниках являются представители порядков *Hyphomicrobiales*, *Rhodospirillales* и *Acidobacteriales*. Различные представители этих порядков характеризуются способностью расти в кислых условиях (рН 3–5), фиксировать атмосферный азот, метан и также формировать значительное количество внеклеточных полисахаридов. В работе (2) были выделены и охарактеризованы представители нового семейства порядка *Hyphomicrobiales* – *Lichenibacteriaceae*, клоны которого ранее были найдены в лишайниках в качестве специфически ассоциированной с лишайниками группой LAR1 (Lichen Associated Rhizobiales group 1). Описаны два новых вида нового рода *Lichenibacterium* – *L. ramalinae* и *L. minor*. Анализ геномов показал наличие генов, кодирующих белки флагеллины, пилины и факторы вирулентности, отвечающие, как предполагается, за хост специфичное взаимодействие с микобиотом лишайника. В работе (3) описан новый род и вид бактерий семейства *Acetobacteraceae*, *Lichenicoccus roseus*, представители которого широко распространены в лишайниках рода *Cladonia* всех климатических зон России. Это бактерии, обладающие способностью расти на полиолах, продуцировать плотный экзополисахарид. Они имеют в геноме набор генов, отвечающих за цикл Кальвина и группу генов для синтеза бактериохлорофилла а.

Выделение этих новых таксонов из внутренних структур лишайников предполагает, что они являются эндобионтами. Присутствие этих бактерий в составе микробиомов лишайников всех климатических зон говорит об их облигатности как компонентов холобиома. Присутствие генов адгезинов, флагеллинов, факторов вирулентности позволяет предположить, что выделенные бактерии в лишайниках формируют биопленки, придающие талломам форму. Присутствие в составе микробиомов лишайников базидиомицетовых дрожжей-эндофитов пока вызывает вопросы (1).

Работа выполнена при частичной поддержке РФФИ (№ 16-04-00966а, 19-04-00297а) и МОН РФ.

Публикации:

1. Kachalkin A.V., Tomashevskaya M.A., Pankratov T.A. *Heterocephalacria septentrionalis* sp. nov. Fungal Planet description sheets: 1042–1111 // **Persoonia**. 2020. V. 44. P. 301–459.
2. Pankratov T.A., Grouzdev D.S., Patutina E.O., Kolganova T.V., Berestovskaya J.J., Ashikhmin A.A. *Lichenicoccus roseus* gen. nov., sp. nov., the first bacteriochlorophyll a-containing, psychrophilic and acidophilic Acetobacteraceae bacteriobiont of lichen *Cladonia* species // **IJSEM**. 2020. V. 70. P. 4591–4601.
3. Pankratov T.A., Grouzdev D.S., Patutina E.O., Kolganova T.V., Suzina N.E., Berestovskaya J.J. *Lichenibacterium ramalinae* gen. nov., sp. nov., *Lichenibacterium minor* sp. nov., the first endophytic, beta-carotene producing bacterial representatives from lichen thalli and the proposal of the new family *Lichenibacteriaceae* within the order Rhizobiales // **Antonie van Leeuwenhoek**. 2020. V. 113. P. 477–489.

ОКИСЛИТЕЛЬНЫЙ СТРЕСС И ЕГО РАСПРОСТРАНЕНИЕ В КЛЕТКЕ

Рогов А.Г.¹, Голева Т.Н.¹, Епремян Х.Х.¹, Мамаев Д.В.¹, Овченкова А.П.¹, Суханова Е.И.¹, Тренделева Т.А.¹, Аливердиева Д.А.², Домнина Л.В.³, Есипов Д.С.⁴, Иванова О.Ю.³, Зиневи́ч Т.В.⁴, Киреев И.И.³, Коршунова Г.А.³, Лямзаев К.Г.³, Мармий Н.В.⁴, Скулачев В.П.³, Хайлова Л.С.³, Черняк Б.В.³, Шумакович Г.П.¹, Звягильская Р.А.¹

¹ ФИЦ Биотехнологии РАН

² Прикаспийский институт биологических ресурсов РАН

³ НИИ ФХБ им. А.Н. Белозерского, МГУ им. М.В. Ломоносова

⁴ Институт митохондриологии, Биологический факультет, МГУ им. М.В. Ломоносова

Митохондрии, особенно при их дисфункции, являются основными источниками избыточных активных форм кислорода в клетке. В отличие от других органелл, они постоянно меняют свои размеры и форму, подвергаясь непрерывному процессу слияния и фрагментации. Эта динамика митохондрий играет важную роль в восстановлении функций поврежденных органелл путем их смешивания с интактными. В последнее время нейродегенеративные и другие возрастные заболевания все больше связывают с дисфункцией митохондрий, нарушением их динамики и зависимым от митохондрий окислительным стрессом. Кроме того, одним из направлений лечения раковых заболеваний является запуск окислительного стресса в митохондриях, что приводит к гибели клеток по пути апоптоза.

С целью поиска новых потенциальных противораковых агентов в рамках проекта, руководимого В.П. Скулачевым, был синтезирован новый митохондриально-направленный конъюгат нафтохинона и децилтрифенилфосфония, SkQN, с предполагаемым прооксидантным действием.

Было исследовано влияние SkQN на митохондрии печени крысы и клетки дрожжей аэробного типа обмена *Dipodascus magnusii*. Показано, что SkQN восстанавливался компонентами дыхательной цепи митохондрий, увеличивал генерацию митохондриями пероксида водорода, в низких концентрациях обладал разобщающим и деполяризующим действием, ингибировал скорость синтеза АТР, промотировал открытие неспецифической Ca^{2+}/P_{H} зависимой циклоспорин-А-чувствительной митохондриальной поры. Доказано, что все перечисленные эффекты SkQN были обусловлены его взаимодействием с жирными кислотами. В дрожжах *D. magnusii* SkQN вызывал окислительный стресс, фрагментацию митохондрий и гибель клеток.

На дрожжах *D. magnusii* было смоделировано и прослежено распространение окислительного стресса в дрожжевой клетке. Окислительный стресс индуцировали прооксидантом терт-бутилгидропероксидом и детектировали методами флуоресцентной Time-lapse микроскопии и проточной цитометрии. Показано, что воздействие прооксиданта приводило сначала к появлению активных форм кислорода в митохондриях, а затем, спустя определенный лаг-период, к генерализации окислительного стресса. Предварительная инкубация клеток дрожжей с митохондриально-направленным антиоксидантом SkQ1 уменьшала степень развития окислительного стресса, но не отдала время начала его развития и генерализации. Фрагментация митохондрий дрожжей была связана с внутримитохондриальными активными формами кислорода и всегда предшествовала генерализации окислительного стресса в клетках.

Гранты. РФФИ-комфи № 17-00-00124 «Влияние белка НВх на окислительный стресс и митохондрии в НВх-трансфицированных дрожжевых клетках». РФФИ-а № 19-04-00784 «Митофагия в клетках дрожжей». РФФИ-аспиранты № 19-34-90165 «Роль митохондрий в развитии социально-значимых заболеваний, связанных с окислительным стрессом». МОН- МК-1260.2020.4 «Роль дисфункции митохондрий в хронических системных социально-значимых патологиях».

Публикации:

Goleva T. N., Lyamzaev K.G., Rogov A.G., Khailova L.S., Epremyan K.K., Shumakovich G.P., Domnina L.V., Ivanova O.Y., Marmiy N.V., Zinevich T.V., Esipov D.S., Zvyagilskaya R.A., Skulachev V.P., Chernyak B.V. *Mitochondria-targeted 1,4-naphthoquinone (SkQN) is a powerful prooxidant and cytotoxic agent // Biochimica et biophysica acta. Bioenergetics* 2020; 1861(8): 148210., doi:10.1016/j.bbabi.2020.148210.

Rogov A.G., Goleva T.N., Sukhanova E.I., Epremyan K.K., Trendeleva T.A., Ovchenkova A.P., Aliverdieva D.A., Zvyagilskaya R.A. Mitochondrial Dysfunctions May Be One of the Major Causative Factors Underlying Detrimental Effects of Benzalkonium Chloride // *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2020; 2020: 8956504. Doi:10.1155/2020/8956504.

Goleva T.N., Rogov A.G., Korshunova G.A., Trendeleva T.A.,

Mamaev D.V., Aliverdieva D.A., Zvyagilskaya R.A. SkQThy, a novel and promising mitochondria-targeted antioxidant // *Mitochondrion* 2019; 49: 206–216. <https://doi.org/10.1016/j.mito.2019.09.001>

ПОЛУЧЕНИЕ ДГЭА И ЕГО ПРОИЗВОДНЫХ ИЗ СТЕРИНОВ РАСТИТЕЛЬНОГО И ЖИВОТНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ

Ядерев В.В., Карпова Н.В., Джавахия В.В.

ИНБ, ФИЦ Биотехнологии РАН

Дегидроэпиандростерон (ДГЭА) – это эндогенный стероидный гормон, являющийся основным предшественником андрогенов и эстрогенов в организме человека и обладающий широким спектром биологической активности. Препараты на основе ДГЭА применяются для лечения ожирения, широкого спектра онкологических заболеваний, диабета, заболеваний сердечно-сосудистой системы, депрессии, болезни Альцгеймера и других патологий, ассоциированных с возрастом. Кроме того, ДГЭА может выступать ценным интермедиатом в синтезе ряда противораковых (например, Абиратерон) соединений. Не менее привлекательной является возможность получения ДГЭА в форме его 3 β -алкиловых (метилового, этилового или изопропилового и других) эфиров, для которых выявлена антипролиферативная активность, а также ингибирующее действие в отношении фермента 5 α -редуктазы. Учитывая вышесказанное, препараты, изготовленные на основе этого гормона, имеют обширную область применения, благодаря чему вопрос синтеза ДГЭА и его производных является чрезвычайно актуальным.

Учитывая существующие способы получения ДГЭА, была получена серия простых и сложных эфиров β -ситостерина и холестерина, рассматриваемые нами в качестве исходных соединений в синтезе ДГЭА. В результате проведенных исследований из коллекции лаборатории биотехнологии физиологически активных соединений был выбран штамм микобактерий *Mycobacterium sp. R-77*, обладающий наибольшей способностью трансформировать боковую цепь стериннов с сохранением двойной связи при С5-углеродном атоме стероидного ядра. Химическими и микробиологическими способами был получен ряд производных ДГЭА, обладающих, по литературным данным, широким спектром фармакологической активности.

Публикации:

Андрюшина В.А., Стыценко Т.С., Карпова Н.В., Ядерев В.В., Джавахия В.В. Получение эфиров стериннов растительного и животного происхождения как ключевых производных для синтеза дегидроэпиандростерона // **Химико-фармацевтический журнал**. 2019, т. 53, № 11, с. 20-23.

Андрюшина В.А., Т.С. Стыценко, Н.В. Карпова, В.В. Ядерев, Зварзин И.В., Курилов Д.В.. Синтез 3 β -метилового эфира дегидроэпиандростерона методом биотрансформации 3 β -метилового эфира холестерина клетками микобактерий *Mycobacterium sp.* // **Известия Академии наук. Серия химическая**. 2019, т. 12, с. 2355-2358.

СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ РЕАКЦИОННОЙ СПОСОБНОСТИ СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫХ ОТХОДОВ И ДРУГИХ ЦЕЛЛЮЛОЗОСОДЕРЖАЩИХ МАТЕРИАЛОВ ПРИ ГИДРОЛИЗЕ КОМПЛЕКСОМ ЦЕЛЛЮЛАЗ *PENICILLIUM VERRUCULOSUM*

Осипов Д.О.¹, Семенова М.В.¹, Кондратьева Е.Г.¹, Зоров И.Н.^{1,2}, Рожкова А.М.¹, Синицын А.П.^{1,2}

¹ ИНБИ, ФИЦ Биотехнологии РАН

² МГУ им. М.В. Ломоносова

Непищевая целлюлозосодержащая биомасса – многообещающее и широко распространенное сырье для получения простых сахаров. В этом исследовании приведены результаты экспериментов по ферментативному гидролизу различных целлюлозосодержащих материалов (ЦСМ) ферментными препаратами (ФП) *P. verruculosum* в лабораторных условиях. Ферментные комплексы представлены мутантным препаратом В151 (целлюлазы и ксиланазы) и рекомбинантным препаратом F10, содержащим β-глюкозидазу *A. niger*. Дозировка составляла 10 мг ФП В151 и 40 ед. целлюлазной активности ФП F10/1 г сухого субстрата.

Среди непродобработанных ЦСМ только некоторые обладали относительно высокой реакционной способностью – соевая шелуха (31%) и жом сахарной свеклы (20%), в то время как пшеничная солома, овсяная шелуха, лузга подсолнечника, кукурузные стебли, багасса сахарного тростника и плодовые оболочки масличной пальмы имели низкую реакционную способность (от 3 до 19%). Это указывает на то, что большинство ЦСМ нуждается в предобработке.

Предобработанные паровым взрывом кукурузные стебли (55%) и (с Ca(OH)₂) оболочки сои и овса (76% и 58% соответственно), предобработанная азотной кислотой (78%) и размолотая на шаровой мельнице (62%) осиновая древесина обладали высокой реакционной способностью. Багасса сахарного тростника успешно гидролизовалась после предобработки разбавленным раствором щелочи (83%). Предобработка разбавленными растворами щелочи и кислоты приводила к одинаковому увеличению реакционной способности плодовых оболочек масличной пальмы (34-38%). Древесная биомасса, предобработанная на целлюлозно-бумажном заводе, также обладала высокой реакционной способностью (56-78%), например, влажная сульфатная хвойная и лиственная целлюлоза.

Эти результаты демонстрируют возможность эффективной трансформации ЦСМ в простые сахара. Простые сахара, полученные с помощью гидролиза из ЦСМ под действием ФП *P. verruculosum*, представляют собой потенциальное сырье для микробиологического производства биотоплив, аминокислот и органических кислот (например, молочной кислоты для получения биоразлагаемых пластиков на основе полимолочной кислоты).

Публикации:

Osipov, D.O., Dotsenko, G.S., Sinitsyna, O.A., Kondratieva, E.G., Zorov, I.N., Shashkov, I.A., Satrutdinov, A.D., Sinitsyn, A.P. Comparative Study of the Convertibility of Agricultural Residues and Other Cellulose-Containing Materials in Hydrolysis with *Penicillium verruculosum* Cellulase Complex // **Agronomy**. 2020. Т. 10. № 11. С. 1712.

Karp, S.G., Osipov, D.O., Semenova, M. V., Rozhkova, A.M., Zorov, I.N., Sinitsyna, O.A., Soccol, C.R., Sinitsyn, A.P. Effect of Novel *Penicillium verruculosum* Enzyme Preparations on the Saccharification of Acid- and Alkali-Pretreated Agro-Industrial Residues // **Agronomy**. 2020. Т. 10. № 9. С. 1348.

ЭФФЕКТЫ ОРГАНИЧЕСКИХ РАСТВОРИТЕЛЕЙ В РЕАКЦИЯХ, КАТАЛИЗИРУЕМЫХ ТРАНСАМИНАЗАМИ.

АКТИВАЦИЯ ФЕРМЕНТОВ ТРАНСАМИНАЗ ОРГАНИЧЕСКИМИ РАСТВОРИТЕЛЯМИ

Безсуднова Е.Ю.¹, Николаева А.Ю.², Клейменов С.Ю.^{1,3}, Петрова Т.Е.⁴, Завьялова С.А.¹, Тугаева К.В.¹, Стеханова Т.Н.¹, Ружицкий А.О.¹, Случанко Н.Н.¹, Попов В.О.^{1,2}

1 ИНБИ, ФИЦ Биотехнологии РАН

2 Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт»

3 Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова Российской Академии Наук

4 Институт математических проблем биологии Российской Академии Наук, Пуцзино

Пиридоксаль-5'-фосфат - зависимые ферменты трансаминазы катализируют стереоселективный перенос аминогруппы с аминокислот и аминов на кетокислоты и кетоны с образованием новых хиральных аминов и аминокислот. Эффективное внедрение ферментативного аминирования в производство среди прочего диктует необходимость в увеличении концентраций реагентов, что сопровождается необходимостью повышения растворимости субстратов, и отведения продуктов ферментативной реакции. Для решения таких задач в биотехнологических схемах повышают температуру реакции и вводят в систему органические растворители. Такие подходы, естественно, упираются в проблему стабильности и активности ферментов в средах, концентрация органической фазы в которых достигает 50%, а температура приближается к точке кипения воды. Если вопрос повышения температуры ферментативной реакции решается поиском и применением термостабильных ферментов, то мест обитания с высоким содержанием органических растворителей в природе скорее нет. Поэтому естественный отбор для такого типа устойчивости ферментов на молекулярном уровне не действует. Тем не менее среди ферментов есть устойчивые к денатурации органическими растворителями и даже наблюдаются эффекты роста активности в присутствии органических растворителей. Об эффектах органических растворителей на ферментативную реакцию и на ферменты мы поговорим на примере стабильности и активности трансаминаз из *Thermobaculum terrenum* и *Psychrobacter cryohalolentis*.

Публикации:

Bezsudnova E.Yu., Popov V.O., Boyko K.M. Structural insight into the substrate specificity of PLP fold type IV transaminases // **Applied Microbiology and Biotechnology** (2020) 104: 2343–2357.

Bezsudnova E. Yu., Nikolaeva A. Yu., Kleymenov S. Y., Petrova T. E., Zavialova S. A., Tugaeva K. V., Sluchanko N. N., Popov V. O. Counterbalance of stability and activity observed for thermostable transaminase from *Thermobaculum terrenum* in the presence of organic solvents // **Catalysts** (2020), v.10, 1024.

Bezsudnova E. Yu., Stekhanova T. N., Ruzhitskiy A. O., Popov V. O. Effects of pH and temperature on (S)-amine activity of transaminase from the cold-adapted bacterium *Psychrobacter cryohalolentis* // **Extremophiles** (2020), v. 24, 537-549.

ДИНАМИКА БИОЛОГИЧЕСКИХ ПРОЦЕССОВ ПРИ КОМПОСТИРОВАНИИ АНАЭРОБНО ОБРАБОТАННОГО ОСАДКА СТОЧНЫХ ВОД

Миронов В.В., Бочкова Е.А., Ганнесен А.В., Вантеева А.В., Русскова Ю.И., Ножевникова А.Н.

ИНМИ, ФИЦ Биотехнологии РАН

Проведено исследование микробиологических процессов при контролируемом термофильном компостировании обезвоженных анаэробно обработанных в метантенке осадков сточных вод (АнОСВ) Люберецких очистных сооружений Москвы. Прослежена динамика изменения химических форм азота под воздействием микроорганизмов цикла азота (аммонификаторов, нитрификаторов, денитрификаторов, азотфиксаторов) при смене температурных режимов на последовательных стадиях компостирования, которое длилось 98 сут. В активный период компостирования на 6–10-е сут наблюдали значительную эмиссию аммиака ($553\text{--}861\text{ мг м}^{-3}$) и оксида азота ($67\text{--}86\text{ мг м}^{-3}$), многократно превышавшую нормативные показатели для выбросов в атмосферу. Микробиологическими методами было определено общее микробное число аэробных гетеротрофных микроорганизмов в компостируемой массе, а также количество КОЕ азотфиксаторов, присутствие и активность культивируемых нитрификаторов и денитрификаторов. На основе данных ПЦР в реальном времени и NGS профилирования по 16S рРНК изучено таксономическое разнообразие микроорганизмов, участвующих в компостировании (бактерий, грибов, архей), и выявлены закономерности сукцессии сообщества микроорганизмов в ходе процесса. Лабораторные эксперименты показали имеющийся потенциал к дальнейшему разложению органических веществ сброженного осадка, возможно, недоступных микроорганизмам в анаэробных условиях, но поддающихся деградации аэробной микробиотой с получением продукта, стимулирующего рост растений и содержащего азот в формах общего 2.3%, аммонийного 890 мг кг^{-1} и нитратного 3750 мг кг^{-1} .

Работа выполнена за счет средств проекта РФФИ мк-18-29-25035 и частично за счет средств Министерства науки и высшего образования Российской Федерации.

Публикация:

Миронов В.В., Бочкова Е.А., Ганнесен А.В., Вантеева А.В., Русскова Ю.И., Ножевникова А.Н. Динамика биологических процессов при компостировании анаэробно обработанного осадка сточных вод // **Микробиология**. 2020. Т. 89. № 4. С. 474-487. doi: 10.31857/S0026365620040096

ПРОБИОТИЧЕСКИЙ ПОТЕНЦИАЛ И ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ СВОЙСТВА ШТАММОВ *LACTOBACILLUS HELVETICUS*, *LACTOBACILLUS RHAMNOSUS* И *LACTOBACILLUS REUTERI*

Глазунова О.А.¹, Моисеенко К.В.¹, Савинова О.С.¹, Бегунова А.В.², Рожкова И.В.², Агаркова Е.Ю.², Кручинин А.Г.², Федорова Т.В.¹

¹ ИНБИ, ФИЦ «Биотехнологии» РАН

² Всероссийский научно-исследовательский институт молочной промышленности

Современная наука определяет микробиоценоз как единую систему организма человека и его микробиома. При этом микробиом представляет собой разнообразные ассоциации микроорганизмов и продукты их метаболизма, обитающие в определенном биотопе. Появляется все больше доказательств того, что различные диеты и факторы окружающей среды оказывают значительное влияние на метаболизм, иммунный ответ и восприимчивость человека к болезни в результате изменения видового состава микробных ассоциаций в его желудочно-кишечном тракте.

С 2001 г. термин “пробиотики” означает живые микроорганизмы, прием которых в адекватных количествах оказывает благоприятное воздействие на организм хозяина. Поэтому очень важно понимать механизм воздействия пробиотического микроорганизма на макроорганизм, что постоянно исследуется в экспериментах *in vitro* и *in vivo*.

Полезные для здоровья человека свойства молочнокислых бактерий (МКБ) интенсивно изучаются. В настоящее время проводятся исследования и накапливаются данные о более широкой пробиотической активности микроорганизмов, которые способны нормализовать функции микрофлоры желудочно-кишечного тракта (ЖКТ), усиливать иммунитет, снижать проявления пищевой аллергии, облегчать симптомы непереносимости лактозы, оказывать гипохолестеринемическое, антиканцерогенное и антимуtagenное действие.

В нижних отделах кишечника пробиотические микроорганизмы способны продуцировать антиоксиданты, гормоноподобные вещества и ферменты, которые участвуют в метаболических процессах макроорганизма.

Применение пробиотических, в том числе молочнокислых микроорганизмов при производстве кисломолочных продуктов направленного действия позволит добавить продукту ряд функциональных свойств. Доказано, что введение в организм пробиотических штаммов в составе кисломолочных продуктов более эффективно по сравнению с приемом пробиотических штаммов в виде лекарственных форм.

В настоящее время представители рода *Lactobacillus* spp. являются наиболее широко изученными пробиотическими микроорганизмами в группе молочнокислых бактерий. Известно, что род *Lactobacillus* включает виды с различным спектром физиологических и биохимических свойств. В связи с тем, что пробиотические свойства лактобактерий являются штамм-специфичными, исследование свойств конкретного штамма с целью его дальнейшего применения в качестве заквасочной или пробиотической заквасочной культуры является актуальным.

В работе представлены результаты исследований пробиотического потенциала трех штаммов лактобацилл *Lactobacillus helveticus* NK1, *Lactobacillus rhamnosus* F и *Lactobacillus reuteri* LR1, а также создания на их основе комбинированных заквасок и изучения, полученных с их использованием, функциональных свойств продуктов в моделях *in vitro* и *in vivo*.

Публикации:

- Agarkova E. Yu., Kruchinin A. G., Glazunova O. A., Fedorova T. V. Whey Protein Hydrolysate and Pumpkin Pectin as Nutraceutical and Prebiotic Components in a Functional Mousse with Antihypertensive and Bifidogenic Properties // **Nutrients** (2019), 11, 2930; doi:10.3390/nu11122930 (Q1, IF 4.546)
- Begunova A. V., Rozhkova I. V., Zvereva E. A., Glazunova O. A., Fedorova T. V. Lactic and Propionic Acid Bacteria: the Formation of a Community for the Production of Functional Products with Bifidogenic and Hypotensive Properties // **Applied Biochemistry and Microbiology** (2019), Vol. 55, No. 6, pp. 660–669. (Q3, IF 1.022)
- Begunova A. V., Savinova O. S., Glazunova O. A., Moiseenko K. V., Rozhkova I. V., Fedorova T. V. Development of Antioxidant and Antihypertensive Properties during Growth of *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus rhamnosus* and *Lactobacillus reuteri* on Cow's Milk: Fermentation and Peptidomics Study // **Foods** (2020), 10, 17, 1-11; doi:10.3390/foods10010017 (Q1, IF 4.092)
- Begunova A. V., Rozhkova I. V., Shirshova T. I., Glazunova O. A., Fedorova T. V. Optimization of Cultivation Conditions for the *Lactobacillus reuteri* LR1 Strain to Improve the Biosynthesis of Bacteriocin-Like Substances // **Applied Biochemistry and Microbiology** (2020), Vol. 56, No. 9, pp. 920–929. (Q3, IF 1.022)
- Begunova A. V., Savinova O. S., Rozhkova I. V., Krysanova Yu. I., Fedorova T. V. In Vitro Assessment of Probiotic Potential and Functional Properties of *Lactobacillus reuteri* LR1 // **Applied Biochemistry and Microbiology** (2020), Vol. 56, No. 5, pp. 544–552. (Q3, IF 1.022)

ИЗУЧЕНИЕ БИОХИМИЧЕСКИХ И ФУНГИЦИДНЫХ СВОЙСТВ ХИТИНАЗ 19 СЕМЕЙСТВА ИЗ *D. CAPENSIS*

Синельников И.Г.¹, Зоров И.Н.^{1,2}, Сеницын А.П.^{1,2}, Рожкова А.М.¹

¹ ИНБИ, ФИЦ «Биотехнологии» РАН

² Химический факультет МГУ им. М.В. Ломоносова

Хитиназы широко распространены в природе и играют важную роль в деградации хитина - структурного полимера, состоящего из остатков N-ацетилглюкозамина, связанных между собой β -(1 \rightarrow 4)-гликозидными связями. Хитиназы присутствующего в различных организмах. Физиологические функции хитиназ зависят от их происхождения. Считается, что у растений, хитиназы являются частью системы защиты от грибковых патогенов. Хитиназы грибов, по-видимому, играют физиологическую роль в делении и дифференцировке клеток, а также участвуют в системе питания, где играют важную роль утилизации хитина.

Клонирован новый *chi19* ген, кодирующий хитиназу хищного растения *Drosera capensis*, принадлежащую к 19-ому семейства гликозилгидролаз. Проведена экспрессия *chi19* гена в системе бактерий *E.coli* в двух формах: с хитинсвязывающим доменом и без него. Для обеих вариаций фермента осуществлен рефолдинг и получены гомогенные растворимые формы. Хитиназы обладали выраженной субстратной специфичностью по кристаллическому хитину, рН-оптимум ферментов находился в диапазоне от 5.0 до 5.5, Т-оптимумы обеих форм ферментов составляли 52-55°C. Каталитическая активность полноразмерной формы хитиназы составляла 360 ед/г по коллоидному хитину. Удаление хитин-связывающего домена приводило к уменьшению каталитической активности на 64% по коллоидному хитину

Для сравнения биохимических свойств была выбрана хитиназа из *Myceliophthora thermophila* относящаяся к 18 семейству гликозилгидролаз.

Грибная хитиназа обладает каталитической активностью к коллоидному хитину в 8 раз выше, чем растительная хитиназа (2,5 ед / мг и 0,3 ед / мг соответственно). Однако фунгицидный эффект в отношении патогенных грибов *Phaeosphaeria nodorum* и *Alternaria longipes* отсутствует. Несмотря на то, что ферментный препарат грибной хитиназы способен подавлять рост грибковых патогенов, его гомогенная форма не обладает такими свойствами. Хитиназа растений, несмотря на значительно более низкий уровень каталитической активности по коллоидному хитину, оказывает ингибирующее действие на *P. nodorum*. Проращивание спор после обработки раствором хитиназы уменьшилось на 90%. Также после обработки хитиназой *D. Capensis*, количество некрозов листьев табака вызываемого *Amanita longipes* уменьшалось в три раза.

Таким образом, показано, что фунгицидная активность хитиназы не имеет прямой связи с каталитической активностью и обусловлена иным механизмом, чем прямая деградация клеточной стенки патогена.

Публикации:

- 1) Синельников И.Г., Зоров И.Н., Болотова К.С., Сеницын А.П., Рожкова А.М. Клонирование и экспрессия новой хитиназы из хищных растений *Drosera Capensis* // **Вестник Московского университета. Серия 2 Химия**. 2020. Том. 61, № 5. С. 361–368.
- 2) Сеницына О.А., Рубцова Е.А., Синельников И.Г., Осипов Д.О., Рожкова А.М., Матыс В.Ю., Бубнова Т.В., Немашкалов В.А., Середина А.С., Щербакова Л.А., Сеницын А.П. Создание продуцента хитиназы и использование её препарата для разрушения клеточной стенки микроскопических грибов // **Биохимия**. 2020. Том. 85, № 6. Р. 840–848.
- 3) Синельников И.Г., Зоров И.Н., Сеницына О.А., Сеницын А.П., Рожкова А.М. Интеграционный вектор для многокопийной интеграции генов в 18spРНК дрожжей *Pichia pastoris*. Заявка на патент РФ № 2020129013/28, 02.09.2020.

СИНТЕЗ НАНОЧАСТИЦ СЕРЕБРА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ПРОИЗВОДНЫХ ХИТОЗАНА И ИССЛЕДОВАНИЕ ИХ БИОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ

Луньков А.П.¹, Шагдарова Б.Ц.¹, Коновалова М.В.², Жуйкова Ю.В.¹, Дрозд Н.Н.³, Ильина А.В.¹, Варламов В.П.¹

¹ ФИЦ Биотехнологии РАН, ИНБ, лаборатория инженерии биополимеров

² ИБХ РАН, лаборатория клеточных взаимодействий

³ НМИЦ гематологии МЗ РФ, лаборатория патологии и фармакологии гемостаза

В представленном исследовании были синтезированы различные производные на основе низкомолекулярного хитозана (ММ 28 кДа, СД 93%), содержащие ковалентно связанную галловую кислоту: хитозан с галловой кислотой (ХитГ), кватернизованный хитозан с галловой кислотой (КХитГ) и сукцинизированный хитозан с галловой кислотой (СХитГ). Производные хитозана использовали в качестве стабилизирующего и восстанавливающего агента при синтезе наночастиц серебра (НЧА_g). Восстановительная активность галловой кислоты обеспечивает формирование НЧА_g в среде производных хитозана, а наличие заряженных функциональных групп в цепи полимера - стабилизацию НЧ в среде модифицированного биополимера. Полученные НЧА_g на основе ХитГ, КХитГ, СХитГ были исследованы методами трансмиссионной электронной микроскопии, динамического светорассеивания и атомно-силовой микроскопии. Наличие Ag в сформированных НЧ было доказано методом энергодисперсионной рентгеновской спектроскопии. Была изучена антибактериальная активность (*E. coli*, *S. epidermidis*), цитотоксичность (HaCaT, Colo 357) и гемосовместимость полученных НЧ. Среди всех образцов КХитГ-НЧА_g показали наиболее низкую цитотоксичность в концентрациях до 100 мкг/мл, наличие антибактериальной активности и высокую стабильность в течение 4 месяцев (по данным УФ-спектроскопии). Совокупность физико-химических и биологических свойств КХитГ-НЧА_g свидетельствуют о наличии перспектив для дальнейшего исследования представленного в работе подхода синтеза НЧ.

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке РФФИ (грант № 19-33-90011 «Аспиранты»)

Выражаем благодарность ЦКП «КОЛЛЕКЦИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ (UNIQEM)» ФИЦ Биотехнологии РАН за анализ образцов НЧ с использованием электронного трансмиссионного микроскоп JEM 1400, оснащенного системой рентгеновского микроанализа INCA Energy TEM 350

Публикации:

- Lunkov A.P., Shagdarova B.Ts., Konovalova M.V., Zhuikova Y.V., Drozd N.N., Il'ina A.V., Varlamov V.P. Synthesis of silver nanoparticles using gallic acid-conjugated chitosan derivatives // **Carbohydrate Polymers**. 2020. 115916. DOI: 10.1016/j.carbpol.2020.115916
- Varlamov V.P., Il'ina A.V., Shagdarova B.T., Lunkov A.P., Mysyakina I.S. Chitin/Chitosan and Its Derivatives: Fundamental Problems and Practical Approaches // **Biochemistry (Moscow)**. 2020. V. 85. P. 154–176. DOI: 10.1134/S0006297920140084
- Дрозд Н.Н., Луньков А.П., Ильина А.В., Варламов В.П. Гемосовместимость в опытах in vitro наночастиц серебра на основе конъюгата кватернизованного хитозана с галловой кислотой. // **Бюллетень экспериментальной биологии и медицины**. 2019. Т. 168. № 10 С. 496-500.
- Shagdarova B.Ts., Lunkov A.P., Il'ina A.V., Varlamov V.P. Investigation of the properties of N-[(2-hydroxy-3-trimethylammonium) propyl] chloride chitosan derivatives // **International Journal of Biological Macromolecules**. 2019. (124). P. 994–1001. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2018.11.209
- Луньков А.П., Ильина А.В., Шагдарова Б.Ц., Варламов В.П. Способ получения наночастиц серебра с помощью модифицированного хитозана // **Патент** № 2701914, 02.10.19

ИССЛЕДОВАНИЕ ОСОБЕННОСТЕЙ ОКИСЛЕНИЯ СУЛЬФИДНЫХ МИНЕРАЛОВ

Булаев А.Г.¹, Елкина Ю.А.^{1,2}, Мельникова Е.А.¹, Меламуд В.С.¹

¹ ИНМИ, ФИЦ Биотехнологии РАН

² МГУ им. М.В. Ломоносова

Механизмы биоокисления сульфидных минералов ацидофильными железо- и сероокисляющими микроорганизмами активно изучаются из-за практической значимости этого процесса для гидрометаллургии. Большое значение для развития биогидрометаллургических технологий имеет понимание влияния различных факторов (температуры, pH, активности микроорганизмов, особенностей строения кристаллической решетки минералов) на скорость биоокисления минералов сульфидных концентратов. Несмотря на большое количество исследований в данной области непонятным остается вопрос о роли различных групп микроорганизмов в процессе биоокисления конкретных сульфидных минералов, входящих в состав сульфидных концентратов. Целью работы являлось исследование роли представителей разных групп микроорганизмов, доминирующих в сообществах, осуществляющих промышленные процессы биовыщелачивания (*Acidithiobacillus caldus*, *Sulfobacillus thermosulfidooxidans*, *Acidiplasma* sp.), в окислении распространённых сульфидных минералов (пирит, пирротин, халькопирит, теннантит, энаргит).

Было показано, что скорость процесса биоокисления сульфидных минералов определяется исследуемыми факторами (состав микробной культуры, температура, присутствие органических субстратов) в разной степени. Окисление пирита в значительной степени зависело от присутствия в смешанной культуре штамма *S. thermosulfidooxidans* и органического источника углерода, который необходим для роста данной бактерии. При этом скорость выщелачивания пирротина определялась, главным образом, окислением элементарной серы и зависела от присутствия в культуре активного сероокисляющего штамма (*A. caldus*). Сравнительное исследование процесса биовыщелачивания минералов меди (халькопирита, теннантита, энаргита) и медно-цинкового сульфидного концентрата показало, что биовыщелачивание меди из халькопирита и энаргита в большей степени зависело от температуры и практически не зависело от состава культуры микроорганизмов, тогда как биовыщелачивание теннантита ингибировалось при повышении температуры и зависело от состава микробной культуры.

Проведенные исследования показали, что процессы биоокисления технологически значимых сульфидных минералов имеют свои особенности, которые позволяют предложить способы интенсификации технологических процессов биовыщелачивания.

Работа выполнена при поддержке Министерства науки и высшего образования РФ и гранта Президента Российской Федерации для государственной поддержки молодых российских ученых – кандидатов наук № МК-6639.2018.8.

Публикации:

Булаев А.Г. Влияние органического источника углерода на биоокисление пирита умеренно-термофильными ацидофильными микроорганизмами // **Микробиология**. 2020. Т. 89. № 3. С. 315–323.

Елкина Ю.А., Мельникова Е.А., Меламуд В.С., Булаев А.Г. Биовыщелачивание теннантита и энаргита умеренно-термофильными ацидофильными микроорганизмами // **Микробиология**. 2020. Т. 89. № 4. С. 419–431.

Булаев А.Г. Биоокисление пирротина умеренно-термофильными ацидофильными микроорганизмами // **Микробиология**. 2020. Т. 89. № 5. С. 511–521.

Елкина Ю.А., Меламуд В.С., Булаев А.Г. Биовыщелачивание медно-цинкового концентрата с высоким содержанием мышьяка // **Микробиология**. 2021. Т. 90. № 1. С. 90–99.

ФОТОКОНВЕРСИЯ GFP ИЗ ЗЕЛЕННОЙ В КРАСНУЮ ФОРМУ ПРИ СТАНДАРТНЫХ УСЛОВИЯХ МИКРОСКОПИИ – РОЛЬ ИСТОЧНИКА УГЛЕРОДА И НАЛИЧИЯ КИСЛОРОДА

Бидюк В.А., Агафонов М.О., Александров А.И.

ИНБИ ФИЦ Биотехнологии РАН

С момента открытия зеленого флуоресцентного белка (GFP), был опубликован ряд работ, в которых отмечалась способность этого белка менять свои свойства под действием света. В частности он способен переходить из зеленой флуоресцентной в красную флуоресцентную форму. Эффективность этого процесса возрастает при разных условиях, в том числе в присутствии оксидантов, при гипоксии, а также в нормальных условиях при сильном освещении светом с длиной волны 405 нм. В данной работе мы показали, что в дрожжах *Saccharomyces cerevisiae* белок GFP (мутант S65T) слитый с различными клеточными белками может фотоконвертировать в красную форму при культивации клеток на несбраживаемых источниках углерода. Фотоконверсия эффективно происходила только при прямой микроскопии между стеклами, в то время как использование агаровых пластин в качестве подложки, или большого объема среды при инвертированной микроскопии полностью предотвращало этот процесс. Оказалось, что данный эффект был связан с быстрой гипоксией клеток с респираторным метаболизмом при помещении их между плотно прилегающими стеклами. Фотоконверсия также предотвращалась антиоксидантами, что указывает на роль активных форм кислорода, которые возникают при недостатке кислорода. Наши данные демонстрируют, что прямая микроскопия клеток, которые активно осуществляют кислородное дыхание, требует особого внимания к проблеме фотоконверсии в частности, и гипоксии в целом. В нашей работе также предложены как простые и эффективные подходы для предотвращения нежелательной фотоконверсии, так и способы стимулировать ее, по крайней мере для готовых линий дрожжей, продуцирующих GFP-меченые белки.

Публикация:

Bidiuk, V.A., Agaphonov, M.O., Alexandrov, A.I. 2020. Modulation of green to red photoconversion of GFP during fluorescent microscopy by carbon source and oxygen availability // *Yeast*, yea.3543. (Q2 WOS, IF = 3,14) <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/yea.3543>.

НОВЫЕ АНАЭРОБНЫЕ ОРГАНОТРОФНЫЕ БАКТЕРИИ СЕМЕЙСТВА *SPHAEROCHAETACEAE* FAM. NOV. И РОДА *SOEHNGENIA* ИЗ НЕФТЯНЫХ ПЛАСТОВ

Биджиева С.Х.¹, Соколова Д.Ш.¹, Груздев Д.С.², Турова Т.П.¹, Паршина С.Н.¹, Кострикина Н.А.¹, Щербакова В.А.³, Автух А.Н.³, Назина Т.Н.¹

¹ ИНМИ, ФИЦ Биотехнологии РАН

² ИНБ, ФИЦ Биотехнологии РАН

³ ИБФМ РАН, ФИЦ “Пушкинский научный центр биологических исследований РАН”, Пушкино

Бактерии с бродильным типом метаболизма являются наиболее многочисленной группой, населяющей нефтяные пласты. Большинство бродильных бактерий выделяли на средах с сахарами или белковыми субстратами, отсутствующими в нефтяных пластах. Высказано предположение, что бродильные бактерии участвуют в биодеградации компонентов нефти совместно с другими группами прокариот – углеводородокисляющими, сульфатредуцирующими и/или метаногенными. Целью настоящей работы было изучение микробных сообществ месторождений тяжелой нефти с высокоминерализованными водами, выделение и описание новых анаэробных бродильных бактерий из нефтяных пластов. Были выделены два штамма сферохет и штамм палочковидных бродильных бактерий, которые по результатам анализа последовательностей гена 16S рРНК относились к новым видам. Исследованы морфо-физиологические и хемотаксономические признаки и секвенированы геномы новых штаммов, что позволило отнести галотолерантные сферохеты к новому виду *Sphaerochaeta halotolerans* nov. sp. Филогеномный анализ имеющихся геномов представителей порядка *Spirochaetales* показал генетическую обособленность сферохет, что позволило выделить их в отдельное семейство *Sphaerochaetaceae*. Генетическая неоднородность внутри рода *Sphaerochaeta* обусловила необходимость выделения известного вида *Sphaerochaeta coccoides* в отдельный род *Parasphaerochaeta* gen. nov. в виде комбинации *Parasphaerochaeta coccoides* comb. nov. Новая палочковидная бродильная бактерия, штамм 1933P^T, выделена из накопительной метаногенной культуры, хранящейся в среде с метанолом без пересева в течение 33 лет. Методом высокопроизводительного секвенирования V4 региона гена 16S рРНК в культуре были выявлены бактерии родов *Desulfovibrio*, *Soehngenia*, *Thermovirga* и *Petrimonas* и археи родов *Methanosarcina* и *Methanomethylovorans*. Штамм 1933P^T был выделен в среде с пептоном и дрожжевым экстрактом. Анализ генома и физиолого-биохимических признаков штамма 1933P^T подтвердил его отнесение к новому виду рода *Soehngenia*, для которого предложено название *Soehngenia longivitae* sp. nov.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 16-04-00028 и Минобрнауки РФ.

Публикации:

- Grouzdev D.S., Bidzhieva S.K., Sokolova D.S., Tourova T.P., Poltarau A.B., Nazina T.N. Draft genome sequence of a fermenting bacterium, *Soehngenia* sp. strain 1933P, isolated from a petroleum reservoir in Azerbaijan // **Microbiol. Resour. Announc.** 2019. 8:e00689-19.
- Bidzhieva S.K., Sokolova D.S., Grouzdev D.S., Kostrikin N.A., Poltarau A.B., Tourova T.P., Shcherbakova V.A., Troshina O.Yu., Nazina T.N. *Sphaerochaeta halotolerans* sp. nov., a novel spherical halotolerant spirochete from a Russian heavy oil reservoir, emended description of the genus *Sphaerochaeta*, reclassification of *Sphaerochaeta coccoides* to a new genus *Parasphaerochaeta* gen. nov. as *Parasphaerochaeta coccoides* comb. nov. and proposal of *Sphaerochaetaceae* fam. nov. // **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.** 2020. V. 70. P. 4748–4759. Doi: 10.1099/ijsem.0.004340
- Nazina T.N., Bidzhieva S.K., Grouzdev D.S., Sokolova D.S., Tourova T.P., Parshina S.N., Avtuh A.N., Poltarau A.B., Talybly A.K. *Soehngenia longivitae* sp. nov., a fermenting bacterium isolated from a petroleum reservoir in Azerbaijan, and emended description of the genus *Soehngenia* // **Microorganisms.** 2020. V. 8. Art. 1967. Doi:10.3390/microorganisms8121967

РОЛЬ ОКСИДА АЗОТА В ФОТОМОРФОГЕНЕЗЕ *NEUROSPORA CRASSA*

Филиппович С. Ю.¹, Бачурина Г.П.¹, Крицкий М.С.¹, Онуфриев М.В.², Перегуд Д.И.³

¹ ИНБИ, ФИЦ Биотехнологии РАН

² Институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН

³ НМИЦ психиатрии и наркологии им. В.П. Сербского Минздрава России

Свет регулирует синтез каротиноидов, образование вегетативных спор (конидий) в бесполом жизненном цикле и формирование предшественников женских половых структур, протоперитециев, при половом развитии у аскомицета *Neurospora crassa*. Роль оксида азота в фотоморфогенезе штамма дикого типа *N. crassa wt-987* и мутантов *nit-2* (дефектен по нитритредуктазе и нитратредуктазе) и *nit-6* (лишен нитритредуктазы) оценивали по присутствию конечных продуктов распада NO, нитрата и нитрита, в мицелии и среде культивирования. Анализ динамики выхода ионов нитрита из мицелия в ходе фотоэкспозиции *nit-6* мутанта *N. crassa* свидетельствовал о возможном участии NO-генерирующего механизма в трансдукции фотосигнала гриба. Несмотря на наличие светозависимого изменения внутриклеточного содержания ионов нитрита и нитрата в изучаемых штаммах, прямой корреляции изменения этого параметра с явлением фотостимуляции конидиогенеза обнаружить не удалось. Введение в среду культивирования донора оксида азота, S-нитрозоглутатиона, ингибировало, а ингибитора NO-синтазы, L-нитроаргинина, стимулировало фотоконидиогенез *N. crassa*, что является свидетельством участия NO в данном процессе. Вместе с тем, отсутствие выхода нитрита на основных стадиях светорегулируемого развития протоперитециев, указывало на малую вероятность участия NO в половом процессе гриба.

Изучение превращения ³H-L-аргинина в ³H-L-цитруллин в клетках *N. crassa* позволило выявить активность NO-синтазы. По чувствительности к ионам кальция, действию специфических ингибиторов фермента и Вестерн-блот анализу NO-синтаза сходна с индуцибельной формой фермента млекопитающих. По данным Вестерн-блоттинга молекулярная масса фермента составляла около 130 кДа. Светозависимые изменения удельной активности NO-синтазы в фотокаротиногенезе и фотоконидиогенезе *N. crassa* не обнаружены.

Публикации:

Филиппович С. Ю., Онуфриев М.В., Бачурина Г.П., Крицкий М.С. Роль оксида азота в фотоморфогенезе *Neurospora crassa* // Прикл. биохим. и микробиол. 2019, Т. 55. № 4. С. 403-409.

Филиппович С. Ю., Онуфриев М.В., Перегуд Д.И., Бачурина Г.П., Крицкий М.С. NO-синтазная активность в фотоморфогенезе *Neurospora crassa* // Прикл. биохим. и микробиол. 2020, Т. 56. № 4. С. 358-365.

МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ОЗЕР ЯМАЛА

Саввичев А.С.¹, Русанов И.И.¹, Дворников Ю.А.³, Кадников В.В.², Каллистова А.Ю.¹, Захарова Е.Е.¹, Веслополова Е.Ф.¹, Лейбман М.О.⁴, Хомутов А.Н.⁴, Равин Н.В.², Пименов Н.В.¹

¹ ИНМИ, ФИЦ биотехнологии РАН

² ИНБ, ФИЦ биотехнологии РАН

³ Аграрно технологический институт Российского университета дружбы народов, Москва,

⁴ Институт криосферы Земли, ФИЦ Тюменский научный центр СО РАН, Тюмень,

Потепление последних десятилетий особенно заметно в полярных широтах. Районом активного увеличения сезонноталого слоя вечной мерзлоты является полуостров Ямал. Процесс таяния мерзлых пород приводит к появлению просадочных форм рельефа, заполнению их водой и образованию термокарстовых озер. Во многих из них скорости диффузной эмиссии метана выше, чем в наземных экосистемах тундры. Исследование зависимости выделения метана от типа озер представляет большой интерес. Выделяющийся метан активно потребляется метанотрофными бактериями, которые значительно снижают эмиссию этого парникового газа из озер Ямала в атмосферу.

Микробиологические, молекулярно-экологические и биогеохимические исследования проводили в августе 2019 г. на 4-х озерах п-ва Ямал в зоне сплошной вечной мерзлоты. Два из них были большими (74 и 118 га) и глубокими (до 12 м) озерами. Два других имели меньшие размеры (3.2 и 4.2 га) и были мелкими (2.3 и 1.8 м). Эти озера образовались в результате термокарстовых процессов на сегрегированных грунтовых льдах. Было обнаружено, что тундровые озера Ямала демонстрируют высокую продукцию фитопланктона (340–1200 мг С м⁻² сут⁻¹) в течение короткого летнего сезона. Показано, что метан является основным продуктом анаэробной деградации органического вещества (ОВ), а его содержание составило 33–990 мкмоль СН₄ дм⁻³. Скорость гидрогенотрофного метаногенеза в отложениях глубоких озер оказалась выше, чем в отложениях мелководных. В осадках всех озер преобладающими компонентами метаногенного сообщества архей были *Methanoregula* и *Methanosaeta*. В метанотрофном сообществе доминировали *Methylobacter tundripaludum* (сем. Methylococcaceae). Активность метанотрофных бактерий приводила к 2–10 кратному снижению концентрации метана в воде озер. Показано, что термокарстовые озера Ямала могут вносить значительный вклад в общие диффузионные выбросы метана с поверхности воды. При этом водная толща глубоких озер на Ямале действует как микробный фильтр, частично предотвращающий выброс метана в атмосферу. Тем не менее, можно предположить, что потепление климата приведет к увеличению общей площади и/или количеству термокарстовых озер, что усилит эффект выброса метана в атмосферу.

Работа выполнена при частичной поддержке гранта РФФИ № 16-14-10201 и Минобрнауки РФ.

Публикации:

Savvichev A., Rusanov I., Dvornikov Y., Kadnikov V., Kallistova A., Veslopolova E., Chetverova A., Leibman M., Sigalevich P., Pimenov N., Ravin N., and Khomutov A.: The water column of the Yamal tundra lakes as a microbial filter preventing methane emission // **Biogeosciences**. <https://doi.org/10.5194/bg-2020-317>. November 2020

Каллистова А.Ю., Саввичев А.С., Русанов И.И., Пименов Н.В. Термокарстовые озера – экосистемы с интенсивными микробными процессами цикла метана // **Микробиология**. 2019. Т. 88. № 6. С. 631–644. DOI:10.1134/S0026365619060041.

СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ФОРМИАТДЕГИДРОГЕНАЗ И СОЗДАНИЕ БИОКАТАЛИЗАТОРОВ НА ИХ ОСНОВЕ

Пометун А.А.^{1,2}, Атрошенко Д.Л.^{1,2}, Бойко К.М.¹, Николаева А.Ю.³, Буник В.И.⁴, Савин С.С.², Паршин П.Д.², Юрченко Т.С.², Тишков В.И.^{1,2}

¹ ИИБИ, ФИЦ Биотехнологии РАН

² Химический факультет МГУ имени М.В. Ломоносова

³ Национальный исследовательский центр "Курчатовский институт",

⁴ НИИ ФХБ им. А.Н.Белозерского МГУ

В нашей лаборатории имеется большая коллекция формиаатдегидрогеназ (ФДГ КФ 1.2.1.2.). Исследования последних лет были сосредоточены на ФДГ из патогенных бактерий *Staphylococcus aureus* (SauFDH), дрожжей *Ogataea parapolymorpha* (OpaFDH) и мха *Physcomitrella patens* (PpaFDH). Получено пять новых пространственных структур ФДГ – структура тройного комплекса PpaFDH (pdb 7ARZ), а также по две структуры для SauFDH (6TTV) и OpaFDH. Среди наиболее интересных результатов по мутагенезу ФДГ последних лет стало увеличение сродства к коферменту и субстрату у SauFDH.

На примере OpaFDH была показана возможность детекции NAD⁺ в реальных биологических системах и разработана соответствующая методика для тканей мозга крыс.

Одним из направлений работы является создание гибридных белков на основе мутантной NADP⁺-зависимой ФДГ. Для таких систем необходима простая и эффективная система очистки, поэтому были получены конструкции, содержащие His-tag. Было показано, что наиболее оптимальным является положение гистидиновой метки на N-конце ФДГ. Получены несколько типов гибридных белков на основе ФДГ и цитохрома BM3 P450. Показано, что с помощью таких конструкций можно более эффективно осуществлять конверсию миристиновой кислоты. Также проведены работы по получению гибридных белков на основе фенилацетонмонооксигеназы (РАМО). Для этого было получено несколько вариантов РАМО с различным расположением His-tag и изучены свойства этого фермента. Выбран лучший вариант РАМО, на его основе получены активные фьюжн-белки и изучены их основные свойства. Работа поддержана грантами РФФИ 17-04-01662, 17-04-01469, 18-34-20098, 19-34-70036, 20-34-90120, РНФ 18-74-00146

Публикации:

- Пометун А.А., Паршин П.Д., Галаничева Н.П., Упоров И.В., Атрошенко Д.Л., Савин С.С., Тишков В.И. Влияние последовательности His₆ на свойства формиаатдегидрогеназы из бактерий *Pseudomonas* sp. 101 // **Вестник Московского университета. Серия 2: Химия**, 2020. Т. 61. No 4 С. 317-325 (Scopus, IF 0,4, Q3).
- Parshin P.D., Pometun A.A., Martysuk U.A., Kleymenov S.Yu., Atroshenko D.L., Pometun E.V., Savin S.S., and Tishkov V.I. Effect of His6-tag position on the expression and properties of phenylacetone monooxygenase from *Thermobifida fusca* // **Biochemistry (Moscow)**, 2020, v. 85, No 5, p.575-582. (Scopus, IF 2,01 Web of Science, IF 1,886)
- Pometun A.A., Boyko K.M., Yurchenko T.S., Nikolaeva A.Yu., Atroshenko D.L., Savin S.S., Popov V.O., Tishkov V.I. Highly-Active Recombinant Formate Dehydrogenase from Pathogenic Bacterium *Staphylococcus aureus*: Preparation and Crystallization // **Biochemistry (Moscow)**. 2020, v.85, No 6, p. 689-696. (Scopus, IF 2,01 Web of Science, IF 1,886).
- Artiukhov A. V., Pometun A. A., Zubanova S. A., Tishkov V. I., Bunik V. I. Advantages of formate dehydrogenase reaction for efficient NAD⁺ quantification in biological samples // **Analytical Biochemistry**, 2020, v. 603, p. 113797 (Web of Science, 2,877).

МИКРОБНОЕ РАЗНООБРАЗИЕ ГОРЯЧИХ ИСТОЧНИКОВ ЧУКОТКИ И ВЫДЕЛЕНИЕ ПРЕДСТАВИТЕЛЯ НОВОГО КЛАССА БАКТЕРИЙ

Кочеткова Т.В.¹, Заюлина К.С.¹, Ельченинов А.Г.¹, Заварзина Д.Г.¹, Лаврушин В.Ю.², Тошчаков С.В.¹, Кубланов И.В.¹

¹ ИНМИ, ФИЦ Биотехнологии РАН

² ФГБУН Геологический институт РАН

Чукотка – одно из самых холодных мест на Земле, где повсеместно развита криолитозона, при этом на востоке региона за счет молодой тектоно-магматической активности разгружается большое количество горячих источников (с температурой воды до 97°C). В рамках данной работы впервые были исследованы микробные сообщества этих гидротерм. С помощью высокопроизводительного секвенирования фрагментов генов 16S рРНК было установлено, что в источниках с температурой 50–75°C доминируют фототрофные бактерии рода *Chloroflexus* (до 89% от всего сообщества). В высокотемпературных источниках (>75°C), в богатых железом осадках и нитевидных обрастаниях, преобладают представители *Aquificae* (до 92%), являющиеся хемолитоавтотрофами. Помимо них, в отдельных источниках было выявлено большое содержание некультивируемых глубоких линий бактерий и архей с неизвестными типами метаболизма. В гидротермах Чукотки, где типичные доноры электронов, такие как H₂S или H₂, отсутствуют, хемолитотрофия, видимо, происходит за счет окисления железа, в большом количестве представленного в виде Fe-содержащих минералов в осадках и/или растворенного в водах источников.

К настоящему моменту нами опубликовано два новых таксона бактерий, выделенных из Чукотских горячих источников. Один из них – *Arenimonas fontis* sp. nov. (семейства *Xanthomonadaceae*), первый термофильный представитель этого широко распространенного рода аэробных органогетеротрофов. Второй – представитель ранее некультивируемой глубокой линии бактерий уровня нового класса внутри филума *Chloroflexi*. Эта бактерия была названа *Tepidiforma bonchosmolovskayae* gen. nov., sp. nov. в честь Е.А. Бонч-Осмоловской – ученого, внесшего огромный вклад в исследование разнообразия и метаболизма термофильных прокариот. Новый класс получил название *Tepidiformia* classis nov. Выделенная бактерия является термофилом, нейтрофилом, строгим аэробом, способным расти на широком спектре органических субстратов. При этом *T. bonchosmolovskayae* также растет и хемолитоавтотрофно на сидерите (FeCO₃) с образованием магнетита.

Таким образом, работа по изучению горячих источников Чукотки расширила наши представления как о микробном разнообразии и экологии наземных гидротермальных экосистем, так и об источниках энергии для хемолитотрофных термофилов. Работа по выделению и исследованию новых микроорганизмов гидротерм Чукотки продолжается.

Работа выполнена при частичной поддержке РФФИ (№ 17-04-01578, 17-74-30025) и Минобрнауки РФ.

Публикации:

- Zayulina K.S., Prokofeva M.I., Elcheninov A.G., Voytova M.P., Novikov A.A., Kochetkova T.V., Kublanov I.V. *Arenimonas fontis* sp. nov., a bacterium isolated from Chukotka hot spring, Arctic region, Russia // **IJSEM**. 2020. V. 70. P. 2726–2731.
- Kochetkova T.V., Zayulina K.S., Zhigarkov V.S., Minaev N.V., Chichkov B.N., Novikov A.A., Toshchakov S.V., Elcheninov A.G., Kublanov I.V. *Tepidiforma bonchosmolovskayae* gen. nov., sp. nov., a moderately thermophilic *Chloroflexi* bacterium from a Chukotka hot spring (Arctic, Russia), representing a novel class, *Tepidiformia*, which includes the previously uncultivated lineage OLB14 // **IJSEM**. 2020. V. 70 (2). P. 1192–1202.
- Kochetkova T.V., Toshchakov S.V., Zayulina K.S., Elcheninov A.G., Zavarzina D.G., Lavrushin V.Yu., Bonch-Osmolovskaya E.A., Kublanov I.V. Hot in Cold: Microbial Life in the Hottest Springs in Permafrost // **Microorganisms**. 2020. V. 8 (9). E1308.

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ОЛИГОНУКЛЕОТИДОВ С ТЯЖЕЛЫМИ МЕТАЛЛАМИ: СПЕЦИФИЧНОСТЬ И АНАЛИТИЧЕСКОЕ ПРИМЕНЕНИЕ

Берлина А.Н., Комова Н.С., Сотников Д.В., Жердев А.В., Дзантиев Б.Б.

ИНБИ, ФИЦ Биотехнологии РАН

Простая и быстрая детекция ионов тяжелых металлов (прежде всего свинца и ртути) – крайне востребованная задача экологического мониторинга и контроля безопасности потребительской продукции. Однако ее реализация возможна лишь при обоснованном выборе рецепторных молекул. Хотя в литературе представлен ряд высокочувствительных аналитических систем, предлагаемые авторами взаимодействия часто плохо воспроизводимы и неэффективны в присутствии компонентов матрикса пробы. Перспективны для детекции тяжелых металлов олигонуклеотидные рецепторы (аптамеры), но их выбор и применение требуют детальной оценки специфичности взаимодействий, что и стало задачей представляемой работы.

Разработаны способы выявления ионов свинца, ртути, сурьмы, основанные на применении G,T-обогащенных аптамеров, поли-С, поли-Т и поли-А олигонуклеотидов, конъюгированных с золотыми наночастицами. В предложенных гомогенных аналитических системах взаимодействие модифицированных аптамером золотых наночастиц с детектируемым ионом вызывает потерю агрегационной и седиментационной устойчивости коллоида. Для формирующихся в результате агрегатов наночастиц характерен существенный сдвиг спектров поглощения из красной в синюю область, обеспечивающий реализацию простого одностадийного тестирования. При изучении данных процессов показаны ограничения их аналитического применения, обусловленные необходимостью использования высоких концентраций наночастиц. Разработана математическая модель, описывающая взаимодействия и генерацию детектируемого сигнала в системах такого типа. На основании анализа модели установлены предельные уровни концентраций ионов металлов, индуцирующих агрегацию и выявляемых визуально или приборно по изменениям оптических свойств раствора. На примере агрегационного детектирования ионов свинца с использованием G,T-аптамера (предел обнаружения – 700 нг/мл) показано соответствие теоретических и экспериментальных концентрационных зависимостей. Предложены способы преодоления установленных ограничений с помощью дополнительных реагентов, модулирующих стабильность коллоидных растворов. Эти реагенты позволили снизить предел обнаружения свинца до 150 нг/мл и даже 0,4 нг/мл, в зависимости от способа обработки коллоида. Для агрегационного детектирования ионов сурьмы с использованием поли-А аптамера предел обнаружения составил 10 нг/мл при 2-минутной продолжительности тестирования. Сравнение взаимодействия различных катионов с комплексами аптамер – золотая наночастица и изучение влияния компонентов проб из природных водоемов на результаты тестирования обеспечило выбор наиболее селективных аптамеров, на взаимодействие с которыми иные ионы не влияют даже в значительном избытке.

Вторая группа разработанных аналитических систем основывается на связывании аптамер-аналит при движении пробы вдоль мембраны под действием капиллярных сил (аналог иммунохроматографии). Реализованная система для селективной детекции ионов свинца характеризовалась пределом обнаружения 10 нг/мл и длительностью тестирования 15 мин. На мембране формировались меченные золотыми наночастицами комплексы, в которых ионы свинца связывались с двумя видами рецепторных молекул – поли-С аптамером и фенилборной кислотой, то есть переход к аптамерам позволил проводить двухсайтное выявление низкомолекулярного аналита. Разработанные мембранные тесты также апробированы для целей экологического мониторинга; показана корреляция результатов, получаемых с использованием предлагаемых и традиционных инструментальных методов.

Интересен механизм взаимодействия металлов и металлоидов с олигонуклеотидами. Для всех разработанных аналитических систем проведена характеристика селективности и вклада различных мономерных звеньев в ее обеспечение. Так, для цитозина (мономера поли-С аптамера) в зависимости от стабильности в разных средах его таутомерной формы в связывании свинца участвуют N1, N3 центры и гидроксильная либо аминогруппа. Комплексы других катионов (например, ионов щелочных или щелочноземельных металлов), образующиеся с участием N1 и O2 центров цитозина, значительно отличаются по аффинности. В связывании сурьмы существенный вклад вносит взаимодействие с рибонуклеозидами. Рассмотрены возможности различных инструментальных средств характеристики образующихся комплексов при изучении механизмов взаимодействий.

Исследование проводится в рамках гранта Российского научного фонда № 19-44-02020.

Основные публикации:

- Berlina A.N., Sotnikov D.V., Komova N.S., Zherdev A.V., Dzantiev B.B. (2021). Limitations for colorimetric aggregation assay of metal ions and ways of their overcoming. // **Analytical Methods**, 13, 250-257. IF=2,596.
- Berlina A.N., Zherdev A.V., Dzantiev B.B. (2019). Progress in rapid optical assays for heavy metal ions based on the use of nanoparticles and receptor molecules // **Microchimica Acta**, 186(3), 172. IF= 6,232.
- Berlina A.N., Komova N.S., Zherdev A.V., Gaur M.S., Dzantiev B.B. (2019). Colorimetric technique for antimony detection based on the use of gold nanoparticles conjugated with poly-A oligonucleotide // **Applied Sciences**, 9(22), 4782-4796. IF=2,474.

РОЛЬ ПОЛИАМИНОВ И АКТИВНОСТИ H⁺-АТФАЗЫ ПЛАЗМАТИЧЕСКОЙ МЕМБРАНЫ В ПОВЫШЕНИИ ПРОДУКЦИИ ВТОРИЧНЫХ МЕТАБОЛИТОВ У ВЫСОКОАКТИВНЫХ ШТАММОВ МИЦЕЛИАЛЬНЫХ ГРИБОВ

Жгун А.А.¹, Нураева Г.К.¹, Думина М.В.¹, Январев Д.В.², Хомутов М.А.², Валиахметов А.Я.³, Эльдаров М.А.¹, Хомутов А.Р.²

¹ ИИБ, ФИЦ Биотехнологии РАН

² ИИБ РАН

³ ИБФМ им. Г.К. Скрыбина РАН, ФИЦ Пушкинский научный центр биологических исследований РАН

Основным методом получения высокоактивных продуцентов вторичных метаболитов (ВМ) у мицелиальных грибов являлся многоаундовый случайный мутагенез с последующей селекцией по целевому признаку (classical strain improvement, CSI), что позволяет увеличить продукцию целевых ВМ в 100–1000 и более раз. Однако этот подход имеет свой технологический предел; рано или поздно наступает этап, когда новое мутагенное воздействие больше не приводит к повышению продукции. В начале 2010-х показали, что у высокоактивных продуцентов, достигнувших технологических пределов улучшения по программам CSI, выход целевых ВМ можно дополнительно повысить при экзогенном введении полиаминов (ПА) в процессе ферментации.

Наши исследования также показали стимулирующее воздействие ПА на биосинтез цефалоспориноса С (цефС) и ловастатина (ЛОВ) у высокоактивных штаммов *Acremonium chrysogenum* и *Aspergillus terreus*, соответственно. Мы обнаружили, что стимулирующий эффект сопровождается апрегуляцией генов соответствующих биосинтетических кластеров и апрегуляцией *laeA*. *LaeA* представляет собой S-аденозилметионин-зависимую метилазу гистонов, является фактором ремоделирования хроматина и служит глобальным регулятором вторичного метаболизма мицелиальных грибов. С другой стороны, для высокоактивных штаммов показали повышенную устойчивость к ингибиторам ключевого фермента биосинтеза ПА (орнитиндекарбоксилазы, ODC), увеличение (в 2–5 раз) общего содержания ПА в клетке, апрегуляцию основных генов биосинтеза ПА и даунрегуляцию гена антизима (*AZ*), негативного регулятора ODC. Проверяется гипотеза: увеличение содержания ПА у улучшенных штаммов мицелиальных грибов может быть побочным свойством программ CSI, повышающим выживаемость при мутагенном воздействии. Экзогенное введение ПА приводит по механизму обратной связи к снижению их эндогенного биосинтеза, что снижает нагрузку на пул S-аденозилметионина, используемого как для биосинтеза ПА, так и ЛОВ, и работы *LaeA*. Также выявили, что сниженная в 2 раза активность H⁺-АТФазы плазматической мембраны (РМА) у высокоактивного продуцента *A. chrysogenum* высвобождает АТФ для АТФ-зависимого биосинтеза цефС. На серии рекомбинантных штаммов показали корреляцию между увеличением РМА-активности (путем введения дополнительной копии гена), снижением пула АТФ и снижением выходов цефС и его предшественника, дезацетил-цефС.

Работа выполнена при поддержке РФФИ № 19-04-01173

Публикации:

- Zhgun A.A., Dumina M.V., Valiakhmetov A.Ia., Eldarov M.A. The critical role of plasma membrane H⁺-ATPase activity in cephalosporin C biosynthesis of *Acremonium chrysogenum* // **PLoS One**, 2020, 15 (8), e0238452.
- Zhgun, A.A., Nuraeva, G.K., Volkov, I.A. High-yielding lovastatin producer aspergillus terreus shows increased resistance to inhibitors of polyamine biosynthesis // **Applied Sciences**, 2020, 10(22), 8290
- Hyvönen M.T., Keinänen T.A., Nuraeva G.K., Yanvarev D.V., Khomutov M.A., Khurs E.N., Kochetkov S.N., Vepsäläinen J., Zhgun A.A., Khomutov A.R. Hydroxylamine analogue of agmatine: Magic bullet for arginine decarboxylase // **Biomolecules**, 2020,10 (3), 406
- Zhgun A.A., Nuraeva G.K., Eldarov M.A. The role of *LaeA* and *LovE* regulators in lovastatin biosynthesis with exogenous polyamines in *Aspergillus terreus* // **Appl. Biochem. Microbiol.**, 2019, 55 (6), 626–635.
- Zhgun A.A., Nuraeva G.K., Dumina M.V., Voinova T.M., Dzhavakhiya V.V., Eldarov M.A. 1,3-Diaminopropane and spermidine upregulate lovastatin production and expression of lovastatin biosynthetic genes in *Aspergillus terreus* via *LaeA* regulation // **Appl. Biochem. Microbiol.**, 2019, 55 (3), 244–255.

БИОСИНТЕТИЧЕСКОЕ ПОЛУЧЕНИЕ ПЕПТИДОВ В СОСТАВЕ СЛИТОГО БЕЛКА НА ОСНОВЕ ТЕРМОСТАБИЛЬНОГО ШАПЕРОНА

Зенин В.А., Юркова М.С., Федоров А.Н.

ИНБИ, ФИЦ Биотехнологии РАН

Существующие способы синтеза крупных пептидов имеют свои сильные стороны и недостатки. Самые популярные подходы — химический синтез и биосинтез в виде слитого белка, например, с кетостероидизомеразой. Нами разработан еще один метод биосинтеза пептидов — в составе термостабильного шаперона.

Шаперон HSP60 микроорганизма *Thermus thermophilus* был модифицирован для обеспечения удобства выделения целевого пептида после гидролиза с помощью бромциана: остатки метионина в последовательности белка были заменены на лейцин. В нуклеотидную последовательность, кодирующую белок, для удобства дальнейшего клонирования был включен полилинкер.

В качестве целевых модельных пептидов был использован один из самых активных антибактериальных пептидов, полифемузин I, и зарегистрированный как лекарственное средство антиретровирусный пептид энфувиртид, один из самых крупных промышленно химически синтезируемых пептидов.

Для экспрессии конструкта была использована бицистронная плазида pET-DUET-1, совместно был экспрессирован ко-шаперон GroES, вместе с GroEL участвующий в образовании комплекса GroELS.

Полученные слитые белки были очищены, гидролизованы бромцианом, пептиды выделены при помощи ОФ-ВЭЖХ и охарактеризованы методом ВЭЖХ-МС. Метод позволяет получать практически интактные пептиды, кроме гомосеринлактона на С-конце. Выход пептидов составил более 50% от теоретического, чистота — более 90%

Введение пептидных последовательностей, в отличие от модификаций, повлияло на термостабильность слитых белков: денатурация слитого белка с полифемузином наблюдалась при 70-75°C, слитого белка с энфувиртидом — при 60-65°C.

Ранее была показана важность электростатических взаимодействий для связывания субстратов с шапероном. По нашему мнению, значительная разница в термостабильности связана с разницей в pI полифемузина I (10.33) и энфувиртида (4.3).

Публикации:

Юркова М. С., Садыхов Э. Г., Федоров А. Н. Production of a toxic polypeptide as a fusion inside GroEL cavity // **Scientific Reports**, v. 10, p. 21024, 2020.

Юркова М. С., Саввин О. И., Зенин В. А., Федоров А. Н. Design and Characterization of a Methionineless Variant of Thermostable Chaperon GroEL from *Thermus thermophilus* // **Applied Biochemistry and Microbiology**, v. 55, No. 2, pp. 112–116, 2019.

НОВЫЙ ТИП БИНАРНЫХ АНТИМИКРОБНЫХ ПРЕПАРАТОВ

Николаев Ю.А.¹, Сидоренко С.В.², Манзенюк О.В.³, Эль-Регистан Г.И.¹

¹ ИНМИ, ФИЦ Биотехнологии РАН

² ФГБУ Детский научно-клинический центр инфекционных болезней ФМБА, Санкт-Петербург,

³ ФБУН ГНЦ прикладной микробиологии и биотехнологии, Оболенск, Московская обл.

Неэффективность антибиотиков, обусловленная устойчивостью к ним возбудителей инфекционных заболеваний, постоянно возрастает, носит глобальный характер и угрожает здоровью населения всех стран.

Одно из направлений по повышению эффективности антимикробных средств – создание комбинированных препаратов из уже известных соединений. В работе исследованы в качестве адъювантов (усилителей) антибиотиков новые биологически активные соединения – химические аналоги межклеточных плотностных регуляторов микроорганизмов класса алкилрезорцинов (АР). Эти соединения ингибируют метаболическую активность бактериальной клетки, что обуславливает антимикробное действие и препятствует адаптации к действию антибиотиков. Амфифильность и механизмы молекулярного действия АР (способность изменять структурную организацию и функциональную активность белков и мембран) обуславливают их эффективность в сочетании с антибиотиками разных групп, отсутствие в бактериальных клетках специфических механизмов адаптации к действию АР.

В опытах *in vitro* показана эффективность применения композиций АР и антибиотиков основных групп против музейных штаммов и клинических изолятов патогенных и бактерий, возбудителей госпитальных инфекций (*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, включая антибиотикорезистентные (АБР) штаммы): 1) минимальная рост-ингибирующая концентрация для разных антибиотиков в отношении бактерий снижалась в 4–512 раз; 2) ускорилась гибель клеток патогенов; 3) на порядок снижалась мутант-превентивная концентрация.

На модели летального клебсиеллёзного сепсиса белых мышей с использованием как антибиотикочувствительного, так и АБР штамма *Klebsiella pneumoniae* показано повышение эффективности лечения препаратами на основе гексилрезорцина и полимиксина по сравнению с индивидуальным антибиотиком: выживаемость мышей увеличивалась с 40 до 80%, доля полностью излеченных животных возрастала с 0 до 60%. Эффективность применения бинарных препаратов с ГР была подтверждена в другом опыте *in vivo* – по элиминации *Mycobacterium smegmatis* из белых мышей.

Публикации:

Nikolaev Y.A., Tutel'yan A.V., Loiko N.G., Buck J., Sidorenko S.V., Lazareva I., Gostev V., Manzen'yuk O.Y., Shemyakin I.G., Abramovich R.A., Huwyler J., El'-Registan G.I. The use of 4-Hexylresorcinol as antibiotic adjuvant // **PLoS One**. 2020. V. 15 (9). e0239147. doi: 10.1371/journal.pone.0239147

Эль-Регистан Г.И., Николаев Ю.А., Лойко Н.Г., Плакунов В.К. Композиция антимикробных препаратов для лечения инфекционных заболеваний людей и животных и способ её применения. **Патент РФ** № 2665006. 2018.

Манзенюк О.Ю., Эль-Регистан Г.И., Комбарова Т.И., Гнеушева Т.Ю., Фирстова В.В., Кязимов Э.И., Николаев Ю.А. Влияние 4-гексилрезорцина как адъюванта антибиотиков на эффективность антибиотикотерапии экспериментального сепсиса мышей, вызванного антибиотикоустойчивой *Klebsiella pneumoniae* // **Бюлл. эксп. биол. мед.** 2020. Принято к печати.

ВЛИЯНИЕ ПОВРЕЖДАЮЩИХ ФАКТОРОВ НА СВЯЗЫВАНИЕ ГЕМОГЛОБИНОМ МЕТАЛЛОВ И ЕГО ПРИСОЕДИНЕНИЕ К МЕМБРАНЕ

Топунов А.Ф.¹, Космачевская О.В.¹, Насыбуллина Э.И.¹, Шумаев К.Б.¹, Новикова Н.Н.², Ковальчук М.В.², Якунин С.Н.², Рогачев А.В.², Яловега Г.Э.³, Кременная М.А.³, Блиндарь В.Н.⁴, Юрьева Э.А.⁵, Степина Н.Д.⁶, Коновалов О.В.⁷

¹ ИИБИ, ФИЦ Биотехнологии РАН;

² НИЦ «Курчатовский институт»;

³ Южный федеральный университет, Ростов-на-Дону;

⁴ НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина Минздрава РФ;

⁵ НИКИ педиатрии им. академика Ю.Е. Вельтищева, РНИМУ им. Н.И. Пирогова;

⁶ Институт кристаллографии им. А.В. Шубникова, ФНИЦ Кристаллография и фотоника РАН;

⁷ European Synchrotron Radiation Facility, Grenoble, France

Впервые установлен факт образования дополнительных высокоаффинных центров связывания металлов (Zn и Fe) в гемоглобине (Hb) в условиях, моделирующих эндогенную интоксикацию в организме (мочевина, соли металлов, умеренный нагрев). Связанные ионы Zn координируются в кластер с четырехкоординатным окружением, где двумя лигандами являются остатки цистеина и гистидина, а другими двумя лигандами могут быть карбоксильная группа аминокислотного остатка и молекула воды. Предложен механизм возникновения дополнительных центров связывания металлов под действием повреждающих факторов. Сначала происходит лабилизация конформации Hb с демаскировкой «скрытых» цистеинов, затем образуются интермедиаты окисления тиолов, выступающих в роли лигандов для формирования комплексов с Zn. Это позволяет объяснить возникновение многих патологий при эндогенной интоксикации.

Мы также показали, что включение реакционноспособных остатков цистеина Cys-93 β -субъединиц Hb в состав комплексов железа с NO защищает тиолы от окисления. Поэтому связывание гемоглобином металлов можно рассматривать как возможный путь стабилизации белка при окислительном и электрофильном стрессе.

Hb помимо транспорта кислорода выполняет в организме и другие функции: 1) каталитические, обусловленные гемовым и белковым компонентами; 2) участвует в метаболизме NO; 3) регулирует морфофункциональные свойства эритроцитов через образование мембраносвязанной формы (МВHb). Взаимодействуя с белком мембраны Band 3, Hb изменяет энергетический обмен, морфологию и деформируемость эритроцитов, высвобождение регуляторов сосудистого тонуса – NO и АТР. При этом Hb функционирует как датчик редокс- и кислородных условий. Сигнальную функцию выполняют и продукты окислительной денатурации Hb – гемихромы, несущие информацию о редокс-условиях и возрасте эритроцита. Сформулирована гипотеза о существовании программы гемолиза, запускаемой Hb, при изменении его окислительно-восстановительного состояния. Данные о количестве МВHb в эритроцитах могут быть использованы в диагностике различных заболеваний.

Публикации:

Космачевская О.В., Топунов А.Ф. Альтернативные и дополнительные функции эритроцитарного гемоглобина. // **Биохимия**. 2019. Т. 84. № 1. С. 3–23.

Космачевская О.В., Насыбуллина Э.И., Блиндарь В.Н., Топунов А.Ф. Связывание эритроцитарного гемоглобина с мембраной как способ осуществления сигнально-регуляторной функции. // **Прикл. биохимия и микробиология**. 2019. Т. 55. № 2. С. 107–123.

Новикова Н.Н., Якунин С.Н., Ковальчук М.В., Юрьева Э.А., Степина Н.Д., Рогачев А.В., Кременная М.А., Яловега Г.Э., Космачевская О.В., Топунов А.Ф. Возможности рентгеновской абсорбционной спектроскопии в геометрии полного внешнего отражения для исследования белковых пленок на жидкости. // **Кристаллография**. 2019. Т. 64. № 6. С. 945-951.

Novikova N.N., Kovalchuk M.V., Yurieva E.A., Konvalov O.V., Stepina N.D., Rogachev A.V., Yalovega G.E., Kosmachevskaya O.V., Topunov A.F., Yakunin S.N. The enhancement of metal-binding properties in hemoglobin: the role of mild damaging factors. // **Journal of Physical Chemistry**. В. 2019. V. 123. № 40. P. 8370-8377.

Космачевская О.В., Насыбуллина Э.И., Шумаев К.Б., Новикова Н.Н., Топунов А.Ф. Влияние комплексов железа с оксидом азота на реакционную способность цистеинов гемоглобина. // **Прикл. биохимия и микробиология**. 2020. Т. 56. № 5. С. 436-445.

ИЗУЧЕНИЕ РАЗНООБРАЗИЯ И ЭВОЛЮЦИИ МАГНИТОТАКТИЧЕСКИХ БАКТЕРИЙ

Узун М.М., Козьяева В.В., Дзюба М.В.

ИНБ, ФИЦ Биотехнологии РАН

Отличительным свойством магнитотактических бактерий (МТБ) является синтез магнетосом. Магнетосомы – это кристаллы магнетита или грейгита, покрытые липопротеиновой мембраной. На январь 2020 года было известно всего 60 геномов МТБ, большая часть которых относилось к филуму *Proteobacteria*, а также, несколько геномов известно в филумах *Nitrospirae*, *Omnitrophica*, *Latescibacteria* и *Planctomycetes*. Синтез магнетосом контролируется генетически магнетосомным геномным кластером (МГК). В данный момент, в силу недостаточного количества геномных данных МТБ, мало известно о происхождении и эволюции их МГК.

В данной работе был проведен первый широкомасштабный поиск генов биоминерализации магнетосом в открытых базах данных NCBI и IMG. В результате были реконструированы 38 новых геномов МТБ. Далее проводили определение их филогенетического положения, идентификацию генов МГК и изучение их экологического распространения. В данной работе впервые была выявлена филогенетическая принадлежность полученных геномов МТБ к филумам *Elusimicrobia*, *Ca. Hydrogenedentes* и *Nitrospirae*. Кроме того, реконструированные геномы принадлежали к различным таксономическим группам, где представители МТБ были известны ранее. В результате анализа МГК была показана возможность горизонтального переноса магнетосомных генов, в том числе и между филумами. Это дало основания предполагать, что горизонтальный перенос генов МГК происходит с большей частотой и, вероятно, может играть большую роль в эволюции МГК, чем считалось ранее. Был предсказан химический состав магнетосом для МТБ из новых филумов и сделаны предположения о происхождении МТБ. Так, было выявлено, что представители МТБ филумов *Elusimicrobia* и *Ca. Hydrogenedentes*, вероятно, синтезируют магнетосомы грейгитового состава, а МТБ филума *Nitrospirae* – магнетитового.

Таким образом, результаты этой работы позволили расширить представления о разнообразии МТБ, получить данные об их экологии и эволюции и открыть новые возможности для дальнейших поисков и исследований магнитотактических бактерий.

Было исследовано их морфологическое и филогенетическое разнообразие МТБ оз. Белое Бордуковское. Показано доминирование МТБ филума *Nitrospirae*. Также, был обнаружен не известный ранее представитель семейства *Syntrophobacteraceae*, содержащий в МГК *man* гены, ранее обнаруженные только у МТБ филума *Nitrospirae*.

Также был исследован потенциал трех не-МТБ штаммов рода *Magnetospirillum* производить магнетосомы после переноса основных генов синтеза магнетосом из МТБ *M. gryphiswaldense*. Трансформация вектором pTrsMAG1 привела к появлению способности к синтезу магнетосом только у не-МТБ штамма *Magnetospirillum* sp. 15-1. Однако магнетосомы в клетках мутантов имели меньший диаметр и были организованы менее регулярно. Следствием этого явилось то, что клетки *Magnetospirillum* sp. 15-1 *tpsMAG* не были способны использовать магнитные поля диапазона μT для магнитотаксиса.

Публикации:

- Uzun M, Alekseeva L, Krutkina M, Koziaeva V, Grouzdev D. Unravelling the diversity of magnetotactic bacteria through analysis of open genomic databases // *Sci Data* 2020; 7: 1–13.
- Koziaeva V. V., Alekseeva L.M, Uzun M.M, Leão P, Sukhacheva M. V., Patutina E.O, Kolganova T.V., Grouzdev D.S. Biodiversity of Magnetotactic Bacteria in the Freshwater Lake Beloe Bordukovskoe, Russia // *Microbiology* 2020; 89: 348–358. (english version only)
- Dziuba M V., Zwiener T, Uebe R, Schüler D. Single-step transfer of biosynthetic operons endows a non-magnetotactic *Magnetospirillum* strain from wetland with magnetosome biosynthesis // *Environ Microbiol* 2020; 22: 1603–1618.

**ПОЛИАМИНЫ МИКОБАКТЕРИЙ – ПРЕДПОЛОЖЕНИЯ И НАХОДКИ
(MYCOBACTERIUM SMEGMATIS ИМЕЕТ ФУНКЦИОНАЛЬНУЮ АГМАТИНАЗУ,
НО НЕ СОДЕРЖИТ ПОЛАМИНОВ)**

Замахаев М.¹, Цыганов И.^{2,3}, Нестерова Л.^{2,3}, Ахова А.³, Григоров А.⁴, Беспятых Ю.⁵, Ажикина Т.⁴, Ткаченко А.^{2,3}, Шумков М.¹

¹ ИНБИ, ФИЦ Биотехнологии РАН

² ФГБОУ Пермский государственный национальный исследовательский университет, Пермь,

³ Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН, Пермь,

⁴ Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН

⁵ Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины ФМБА

Полиамины представляют собой алифатические углеводороды, содержащие две или более амино- (или имино-) группы. Эти молекулы способны оказывать влияние на скорость роста бактерий и их чувствительность к антибактериальным препаратам. Они встречаются практически во всех группах живых организмов, однако их присутствие и физиологическая роль в клетках микобактерий до сих пор исследованы не были. В настоящей работе по результатам анализа данных транскриптомики, протеомики и исследования ферментативных активностей впервые получены доказательства присутствия в клетках *Mycobacterium smegmatis* белков, которые могут быть связаны с синтезом и транспортом полиаминов. В экспериментах *in vitro* показана функциональность одного из двух ключевых ферментов синтеза путресцина – агматиназы SpeB. Однако сами полиамины в клетках микобактерий обнаружить не удалось.

Публикация:

Zamakhaev M, Tsyganov I, Nesterova L, Akhova A, Grigorov A, Bespyatykh J, et al. Mycolicibacterium smegmatis Possesses Operational Agmatinase But Contains No Detectable Polyamines // **Int J Mycobacteriol**, 2020;9:138-43.

ПРОТЕОЛИТИЧЕСКИЙ ПУТЬ В АЛКАЛОФИЛЬНОМ МИКРОБНОМ СООБЩЕСТВЕ

Кевбрин В.В.¹, Болтыанская Ю.В.¹, Груздев Д.С.², Козьяева В.В.², Лаврентьева Е.В.³, Эрдынеева Е.В.³, Cho J.-C.⁴

¹ ИНМИ, ФИЦ Биотехнологии РАН

² ИНБ, ФИЦ Биотехнологии РАН

³ Институт общей и экспериментальной биологии СО РАН, Улан-Удэ

⁴ Department of Biological Sciences, Inha University, Incheon, Republic of Korea

В ходе целенаправленного поиска выделены и описаны аэробные, алкалофильные спутники цианобактерии *Geitlerinema* sp., штаммы G-192 и G-116. По трофическим свойствам оба штамма являются протеолитиками с выраженной специализацией: штамм G-192 является протеолитиком-деструктором, способным к утилизации длинноцепочечных белков, но не аминокислот, тогда как штамм G-116 оказался протеолитиком-диссипотрофом, утилизирующим короткоцепочечные пептиды и аминокислоты. Оба выделенных штамма образовали новые таксоны на уровне рода–вида: *Alkalicaulis satelles* G-192^T gen. nov., sp. nov. и *Natronospirillum operosum* G-116^T gen. nov., sp. nov. Новые таксоны привели к значительной ревизии в классах *Alphaproteobacteria* и *Gammaproteobacteria* с образованием новых семейств и даже порядков. Для аэробных (G-192 и G-116), а также ранее выделенных нами анаэробных (Z-910 и Z-710) спутников-протеолитиков были определены типы щелочных протеаз, секретируемых ими для утилизации белковых компонентов прижизненных или посмертных выделений цианобактерии. Некоторые из протеаз были выделены и частично очищены. Определены интервалы их активности и стабильность по отношению к солености, рН и температуре, а также устойчивость к некоторым хаотропным агентам. Показана потенциальная возможность применения выделенных протеаз в индустрии моющих средств. Впервые сделана попытка связать типы протеаз с местом в сообществе их организма-продуцента. Найденные особенности в трофических свойствах выделенных организмов, как аэробных, так и анаэробных, позволили нам предложить протеолитический путь в цианобактериальном алкалофильном микробном сообществе.

Работа выполнена при частичной поддержке РФФИ (№18-04-00236) и МОН РФ.

Публикации:

Лаврентьева Е.В., Эрдынеева Е.В., Дунаевский Я.Е., Болтыанская Ю.В., Кевбрин В.В. Пептидазная активность бактерий рода *Proteinivorax* и их возможная экологическая роль в микробном сообществе содовых озер Танатар (Алтайский край) // **Микробиология**. 2019. Т. 88. № 6. С. 735–739.

Kevbrin V., Boltyanskaya Y., Grouzdev D., Koziaeva V., Park M., Cho J.-C. *Natronospirillum operosum* gen. nov., sp. nov., a haloalkaliphilic satellite isolated from decaying biomass of a laboratory culture of cyanobacterium *Geitlerinema* sp. and proposal of *Natronospirillaceae* fam. nov., *Saccharospirillaceae* fam. nov., and *Gynuellaceae* fam. nov. // **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.** 2020. V. 70. P. 511-521.

Kevbrin V., Boltyanskaya Y., Koziaeva V., Uzun M., Grouzdev D. *Alkalicaulis satelles* gen. nov., sp. nov., a novel haloalkaliphile isolated from a laboratory culture cyanobacterium *Geitlerinema* sp. and proposals of *Maricaulaceae* fam. nov., *Robiginitomaculaceae* fam. nov., *Maricaulales* ord. nov., and *Hyphomonadales* ord. nov. // **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.** DOI: 10.1099/ijsem.0.004614. Epub 2020 Dec 22.

ИССЛЕДОВАНИЯ МУТАНТНЫХ ФОРМ ТРОПОМИОЗИНА, НАБЛЮДАЕМЫХ ПРИ НАСЛЕДСТВЕННЫХ ПАТОЛОГИЯХ РАЗЛИЧНЫХ ТИПОВ МЫШЦ

А.М. Матюшенко¹, В.В. Нефедова¹, Д. С. Ямпольская¹, А.Д. Гончар^{1,2}, Г.В. Копылова³, Д.С. Щепкин³, С.Ю. Бершицкий³, А.К. Цатурян⁴, Д.И. Левицкий¹.

¹ ИНБИ, ФИЦ Биотехнологии РАН

² Кафедра биохимии биологического факультета МГУ

³ Институт Иммунологии и Физиологии Уральского отделения РАН, Екатеринбург,

⁴ Институт Механики МГУ

Тропомиозин (Трм) – это актин-связывающий белок, играющий важнейшую роль в регуляции сокращения различных типов мышц. Многообразие типов мышечных волокон обеспечивается различными изоформами саркомерных белков, в том числе Трм. Мутации в генах Трм часто приводят к развитию тяжелых наследственных заболеваний мышц, которые можно разделить на две большие группы – кардиомиопатии и миопатии. Так, мутации в гене TPM1 ведут к появлению аминокислотных замен в Трм1.1 – основной изоформе Трм сердечных мышц, и развитию кардиомиопатий, а мутации в генах TPM2 и TPM3 приводят к появлению мутантных форм Трм скелетных мышц – Трм2.2 и Трм3.12, что часто ассоциировано с развитием миопатий. В нашей работе мы применили комплексный подход к изучению структурных и функциональных свойств мутантных форм Трм с целью установить молекулярный механизм развития наследственных заболеваний различных типов мышц.

В группу исследований кардиомиопатий попали 9 аминокислотных замен в изоформе Трм1.1. С помощью целого ряда самых разных методов удалось обнаружить эффекты, которые могут приводить к различным патологиям сердца. В группу исследований заболеваний скелетных мышц – миопатий были включены 4 замены в изоформе Трм2.2 и 5 замен в изоформе Трм3.12. Поскольку в скелетных мышцах практически не существует гомодимеров Трм2.2, была предложена новая модель изучения миопатий в гетеродимерах Трм, состоящих из двух разных изоформ Трм. Изоформа Трм3.12 может существовать как в форме гомодимера, так и гетеродимера, свойства которых с миопатическими заменами в Трм3.12 отличаются друг от друга. Тем не менее, нам удалось установить механизм развития патологии в случае мутации M9R в изоформе Трм3.12.

Таким образом, проведенные исследования приближают нас к пониманию механизма развития наследственных мышечных заболеваний, что может быть полезно в дальнейшем при формировании стратегии их коррекции.

Публикации:

- Matyushenko A.M., Nefedova V.V., Shchepkin D.V., et al. (2020) Mechanisms of disturbance of the contractile function of slow skeletal muscles induced by myopathic mutations in the tropomyosin TPM3 gene // *FASEB J.* 34, 13507-13520. (IF=4,97)
- Matyushenko A.M. and Levitsky D.I. (2020) Molecular mechanisms of pathologies of skeletal and cardiac muscles caused by point mutations in the tropomyosin genes (review) // *Biochemistry (Moscow)* 85, S20-S33. (IF=1,98)
- Kopylova G.V., Matyushenko A.M., Koubassova N.A., et al. (2020) Functional outcomes of structural peculiarities of striated muscle tropomyosin // *J. Muscle Res. Cell Motil.* 41, 55-70. (IF=1,74)
- Matyushenko A.M., Shchepkin D.V., Susorov D.S., et al. (2019) Structural and functional properties of $\alpha\beta$ -heterodimers of tropomyosin with myopathic mutations Q147P and K49del in the β -chain // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 508, 934-939. (IF=2,99).
- Matyushenko A.M., Koubassova N.A., Shchepkin D.V., et al. (2019) The effects of cardiomyopathy-associated mutations in the head-to-tail overlap junction of α -tropomyosin on its properties and interaction with actin // *Int. J. Biol. Macromol.* 125, 1266-1274. (IF=5,16)
- Kopylova G.V., Shchepkin D.V., Nabiev S.R., et al. (2019) Cardiomyopathy-associated mutations in tropomyosin differently affect actin-myosin interaction at single-molecule and ensemble levels // *J. Muscle Res. Cell Motil.* 40, 299-308. (IF=1,74)
- Bershtitsky S.Y., Logvinova D.S., Shchepkin D.V., et al. (2019) Myopathic mutations in the beta-chain of tropomyosin differently affect the structural and functional properties of betabeta- and alphabeta-dimers // *FASEB J.* 33, 1963-1971 (IF=4,97)

СИНТЕЗ МЕТАЛЛИЧЕСКИХ НАНОЧАСТИЦ ИЗОГЕННОЙ ПАРОЙ БАКТЕРИАЛЬНЫХ КУЛЬТУР ОБЛИГАТНЫХ МЕТИЛОТРОФНЫХ БАКТЕРИЙ *METHYLOPHILUS QUAYLEI*

Сорокин В.В.¹, Складнев Д.А.¹, Пшеничникова А.Б.², Калёнов С.В.³, Суясов Н.А.³

¹ ИНМИ, ФИЦ биотехнологии РАН

² РТУ МИРЭА

³ Российский химико-технологический университет имени Д.И. Менделеева

Проведено исследование способности двух изогенных бактериальных культур восстанавливать катионы серебра и палладия. В качестве таких культур мы использовали культуру облигатных метилотрофных бактерий *Methylophilus quaylei* и её изогенного стрептомицинустойчивого производного. Было показано, что обе культуры облигатных метилотрофных бактерий *Methylophilus quaylei* (культура дикого типа МТ^Т и стрептомицинустойчивого мутанта SM^Р) способны восстанавливать соли серебра и формировать наночастицы Ag⁰ непосредственно в ростовой среде с метанолом. Культура изогенного SM^Р мутанта способна также восстанавливать соль палладия с образованием наночастиц Pd⁰, в то время как культура *M. quaylei* МТ^Т такой способностью не обладала. Таким образом, оценка способности микроорганизмов образовывать биогенные наночастицы различных металлов позволяет выявить тонкие метаболические различия даже близкородственных культур.

Электронная микроскопия проводилась на оборудовании ЦКП «Коллекция UNIQEM» ФИЦ биотехнологии РАН.

Публикация:

Sorokin V.V., Skladnev D.A., Pshenichnikova A.B., Kalenov S.V., Suyasov N.A. Comparison of the Wild-Type Obligate Methylophilic Bacterium *Methylophilus quaylei* and its Isogenic Streptomycin-Resistant Mutant via Metal Nanoparticle Generation // **Biological Trace Element Research**. 2020. V. 193 (2). P. 564–573.

СРАВНИТЕЛЬНО-ГЕНОМНЫЙ АНАЛИЗ ЗАПРОГРАММИРОВАННОГО СДВИГА РАМКИ СЧИТЫВАНИЯ В ГЕНЕ *CHLD* У ПРОКАРИОТ

Антонов И.В.

ИНБ, ФИЦ Биотехнологии РАН

В случае мутаций типа вставка или делеция (длиной не кратной трем) в кодирующей области гена нарушается порядок чтения кодонов (т.е. происходит сдвиг рамки считывания или frameshift), что как правило приводит к преждевременной терминации трансляции. Мутации такого типа часто приводят к тому, что синтезируемый укороченный пептид уже не способен выполнять функцию целого белка. Из-за этого на соответствующий ген с мутацией перестает действовать отбор, и он постепенно превращается псевдоген. Однако, известны гены, у которых рядом с мутацией, сбивающей рамку считывания, находится встроенный сигнал, который корректирует ритм работы рибосомы таким образом, что мутация в гене корректируется, и происходит синтез полноценного белка. Данный механизм называется «запрограммированным сдвигом рамки считывания» (ПСРС). Следует отметить, что подтвержденные функциональные сигналы ПСРС чаще всего встречается в вирусных генах или их производных (например, мобильных элементах). В настоящее время известно лишь несколько истинных прокариотических генов, использующих ПСРС для трансляции. (*prfB*, *dnaX* и *copA*).

В 2013 году нами были предсказаны и экспериментально подтверждены ранее неизвестный сигнал ПСРС в гене *chlD*, кодирующем среднюю субъединицу магний-хелатазы (фермента, участвующего в синтезе хлорофилла и бактериохлорофилла). Следует отметить, что магний-хелатаза состоит из трех субъединиц: I (~350 а.к.), D (~650 а.к.) and H (~1300 а.к.), которые, как правило, закодированы в генах *chlI*, *chlD* и *chlH*, соответственно. В данной работе был осуществлен детальный сравнительно-геномный анализ генов *chlD*, содержащих ПСРС сигналы. Было показано, что данный ген присутствует в более чем 1200 прокариотических геномах из базы данных RefSeq. Неожиданно оказалось, что существенная часть этих организмов не являются фотосинтетиками. При этом более 60% найденных прокариот были способны синтезировать кобаламин (витамин B12). С другой стороны кобальт-хелатаза CobNST, которая является одним из примерно 25 ферментов, необходимых для аэробного биосинтеза кобаламина (витамина B12) у прокариот, имеет высокое сходство с магний-хелатазой. Большая, средняя и малая субъединицы кобальт-хелатазы кодируются генами *cobN*, *cobT* и *cobS* соответственно.

В настоящем исследовании мы заметили, что во многих геномах, содержащих ген *chlD* с ПСРС, *отсутствует* ген *chlI* (в то время как ген большой субъединицы кобальт-хелатазы *cobN* всегда присутствует). Учитывая высокое сходство между белком ChII и N-концевой частью белка ChID, мы предположили, что трансляционный сдвиг рамки может позволить мРНК *chlD* продуцировать две субъединицы кобальт-хелатазы. Действительно, проведенный филогенетический анализ выявил статистически значимую корреляцию между наличием сигнала ПСРС в гене *chlD* и отсутствием отдельного гена *chlI* в геноме. Таким образом, такие гены могут иметь потенциал для образования недостающей малой субъединицы хелатазы посредством преждевременного прекращения трансляции *chlD*.

Таким образом, в настоящей работе мы описали еще один случай, когда запрограммированный сдвиг рамки позволяет мРНК продуцировать два разных белка. Особенно интересно, что данный механизм был обнаружен в прокариотическом, а не вирусном гене, и является очень консервативным, т.к. может быть обнаружен как у архей, так и у бактерий. В связи с этим мы считаем, что дальнейшие исследования данного феномена могут пролить новый свет на раннюю эволюцию путей биосинтеза хлорофилла и / или кобаламина.

Мы хотели бы поблагодарить Павла Баранова и Марка Бородовского за важный вклад в первоначальное открытие ПСРС в гене *chlD*. Данная работа была выполнена при частичной поддержке гранта РФФИ № 18-34-00589.

Публикация:

Antonov IV. Two Cobalt Chelatase Subunits Can Be Generated from a Single *chlD* Gene via Programed Frameshifting // **Mol Biol Evol.** 2020;37(8):2268-2278.

БОКОВАЯ ЦЕПЬ ОСТАТКА ЦИСТЕИНА КАК НУКЛЕОФИЛ В РЕАКЦИЯХ ФЕРМЕНТАТИВНОГО КАТАЛИЗА И КОВАЛЕНТНОМ ИНГИБИРОВАНИИ

Хренова М.Г.^{1,2}, Кулакова А.М.², Цирельсон В.Г.³, Немухин А.В.^{2,4}

¹ ИНБИ, ФИЦ Биотехнологии РАН

² МГУ имени М.В. Ломоносова, химический факультет

³ РХТУ имени Д.И. Менделеева

⁴ ИБХФ имени Н.М. Эмануэля РАН

Современные методы молекулярного моделирования позволяют описывать химические реакции в рамках комбинированного метода квантовой механики / молекулярной механики. Качественный скачок, связанный с применением этого метода в последние годы, вызван появлением нового программного обеспечения, в котором метод Кона-Шэма эффективно реализован на графических ускорителях. Это позволяет не только проводить поиск стационарных точек на поверхности потенциальной энергии, но и анализировать динамическое поведение системы, в частности, той области, где протекает химическая реакция. В рамках представляемой работы обсуждаются две задачи, их объединяет то, что в обоих случаях реакции инициируются нуклеофильной атакой атомом серы остатка цистеина карбонильного углерода субстрата или ингибитора. В случае ингибирования малой ГТФазы Ras предложенный механизм объясняет сложную наблюдаемую кинетику образования ковалентного аддукта. Для основной протеазы вируса SARS-COV-2 проведена интерпретация наблюдаемой субстратной специфичности и показана важность выбора адекватного квантовохимического метода.

Публикации:

1. M.G. Khrenova, V.G. Tsirelson, A.V. Nemukhin. Dynamical properties of enzyme–substrate complexes disclose substrate specificity of the SARS-CoV-2 main protease as characterized by the electron density descriptors// **Phys. Chem. Chem. Phys.** 2020. V. 22. P. 19069-19079.
2. M.G. Khrenova, A.M. Kulakova, A.V. Nemukhin. Proof of concept for poor inhibitor binding and efficient formation of covalent adducts of KRASG12C and ARS compounds // **Org. Biomol. Chem.** 2020. V. 18. P. 3069–3081.

**Программа
Научной конференции ФИЦ Биотехнологии РАН
2021**

№№	Время	ФИО докладчика	Название доклада	Лаборатория (по докладчику)
Конференция будет проходить в Zoom				
15 февраля, понедельник				
	10-30	Открытие научной Конференции Центра		
1	10-40	Макаров Вадим Альбертович	Прогресс в разработке лекарственного препарата для лечения COVID-19 и ряда других вирусных заболеваний	Лаборатория биомедицинской химии
2	11-00	Жур Кристина Валерьевна	Анализ ДНК останков человека из мегалитических гробниц	Лаборатория геномики и эпигеномики
3	11-20	Черных Николай Алексеевич	Диссимиляционная сульфатредукция у археи <i>Candidatus Vulcanisaeta moutnovskia</i> проливает свет на эволюцию метаболизма серы	Лаб. разнообразия и экологии экстремофильных микроорганизмов
4	11-40	Тихонова Тамара Викторовна	Тиоцианатдегидрогеназа – новый фермент, новый медный центр, новая химическая реакция	Лаборатория инженерной энзимологии
5	12-00	Кадников Виталий Валерьевич	Метаболическое разнообразие и эволюционная история некультивируемого архейного филума <i>Candidatus Micrarchaeota</i> , выявленные в результате метагеномного анализа донных осадков субарктического озера Светлое	Отдел молекулярной биологии микроорганизмов
6	12-20	Тугаева Кристина Владимировна	Взаимодействие нуклеокапсидного белка коронавируса SARS-CoV2 с белками 14-3-3	Группа «Блок-белковые взаимодействия»
7	12-40	Сорокин Дмитрий Юрьевич	Характеристика экстремально галоалкалофильной CO-трофной ацетогенной бактерии из гиперсоленого содового озера, представляющей новую глубокую филогенетическую ветвь в классе <i>Natranaerobiiia</i> (фирмикуты)	Лаб. экологии и геохимической деятельности микроорганизмов
13-00 – 13-30 ПЕРЕРЫВ				
8	13-30	Коротков Евгений Вадимович	Поиск промоторных последовательностей, тандемных и дисперсных повторов в геноме риса	Группа математического анализа последовательностей ДНК и белков
9	13-50	Ошкин Игорь Юрьевич	Анализ пангенома двух филогенетически близких родов метанотрофных бактерий: <i>Methylocystis</i> и <i>Methylosinus</i>	Лаб. микробиологии болотных экосистем
10	14-10	Салина Елена Геннадьевна	Малая РНК MTS1338 – потенциальный фактор вирулентности <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Лаборатория биохимии стрессов микроорганизмов
11	14-30	Летаров Андрей Викторович	Экогеномика кишечных вирусных сообществ домашних и одичавших лошадей <i>Equus caballus</i>	Лаб. вирусов микроорганизмов
12	14-50	Жердева Виктория Вячеславовна	Влияние оптического просветления кожи на изменение интенсивности флуоресценции белка-маркера и MPT-сигнала в подкожных опухолях	Лаборатория молекулярного имиджинга
13	15-10	Меерович Ирина Геннадьевна	Использование МР-контрастного агента «Гадовист» для оптического просветления для улучшения визуализации флуоресценции TagRFP-экспрессирующей опухоли	Лаборатория физической биохимии
14	15-30 15-50	Панкратов Тимофей Анатольевич	Лишайниковый симбиоз как модель холобионта – хост-специфичной комплексной биопленочной структуры	Лаб. выживаемости микроорганизмов

16 февраля, вторник

№№	Время	ФИО докладчика	Название доклада	Лаборатория (по докладчику)
15	10-30	Рогов Антон Геннадиевич	Окислительный стресс и его распространение в клетке	Лаборатория биоэнергетики
16	10-50	Ядерец Вера Владимировна	Получение ДГЭА и его производных из стеринов растительного и животного происхождения	Лаборатория биотехнологии физиологически активных веществ
17	11-10	Осипов Дмитрий Олегович	Сравнительное исследование реакционной способности сельскохозяйственных отходов и других целлюлозосодержащих материалов при гидролизе комплексом целлюлаз <i>Penicillium verruculosum</i>	Лаборатория биотехнологии ферментов
18	11-30	Безсуднова Екатерина Юрьевна	Эффекты органических растворителей в реакциях, катализируемых трансаминазами. Активация ферментов трансаминаз органическими растворителями.	Лаборатория инженерной энзимологии
19	11-50	Мионов Владимир Витальевич	Динамика биологических процессов при компостировании анаэробно обработанного осадка сточных вод	Лаб. микробиологии антропогенных местообитаний
20	12-10	Федорова Татьяна Васильевна	Пробиотический потенциал и функциональные свойства штаммов <i>Lactobacillus helveticus</i> , <i>Lactobacillus rhamnosus</i> и <i>Lactobacillus reuteri</i>	Лаборатория молекулярных основ биотрансформаций
21	12-30	Синельников Игорь Геннадьевич	Изучение биохимических и фунгицидных свойств хитиназ 19 семейства из <i>D. sarpenis</i>	Лаборатория биотехнологии ферментов
12-50 – 13-30 ПЕРЕРЫВ				
22	13-30	Луньков Алексей Павлович	Синтез наночастиц серебра с использованием производных хитозана и исследование их биологической активности	Лаборатория инженерии биополимеров
23	13-50	Булаев Александр Генрихович	Исследование особенностей окисления сульфидных минералов	Лаб. хемолитотрофных микроорганизмов
24	14-10	Александров Александр Иванович	Фотоконверсия GFP из зеленой в красную форму при стандартных условиях микроскопии – роль источника углерода и наличия кислорода	Лаборатория молекулярной генетики, Группа генной инженерии низших эукариот
25	14-30	Биджиева Салима Хасановна	Новые анаэробные органотрофные бактерии семейства <i>Sphaerochaetaceae</i> fam. nov. и рода <i>Soehngenia</i> из нефтяных пластов	Лаб. нефтяной микробиологии
26	14-50	Филиппович Светлана Юрьевна	Роль оксида азота в фотоморфогенезе <i>Neurospora crassa</i>	Лаборатория экологической и эволюционной биохимии
27	15-10	Русанов Игорь Иванович	Микробиологические исследования озер Ямала	Лаб. микробиологии и биогеохимии водоемов
28	15-30 -15-50	Пометун Анастасия Александровна	Структурно-функциональные исследования форматдегидрогеназ и создание биокатализаторов на их основе	Лаборатория молекулярной инженерии

17 февраля, среда

№№	Время	ФИО докладчика	Название доклада	Лаборатория (по докладчику)
29	10-30	Кочеткова Татьяна Вячеславовна	Микробное разнообразие горячих источников Чукотки и выделение представителя нового класса бактерий	Лаб. метаболизма экстремофильных прокариот
30	10-50	Берлина Анна Николаевна	Взаимодействие олигонуклеотидов с тяжелыми металлами: специфичность и аналитическое применение	Лаборатория иммунобиохимии
31	11-10	Жгун Александр Александрович	Роль полиаминов и активности H+-АТФазы плазматической мембраны в повышении продукции вторичных метаболитов у высокоактивных штаммов мицелиальных грибов	Группа генетической инженерии грибов
32	11-30	Зенин Владимир Андреевич	Биосинтетическое получение пептидов в составе слитого белка на основе термостабильного шаперона	Лаборатория молекулярной биотехнологии
33	11-50	Николаев Юрий Александрович	Новый тип бинарных антимикробных препаратов	Лаб. выживаемости микроорганизмов
34	12-10	Топунов Алексей Федорович	Влияние повреждающих факторов на связывание гемоглобином металлов и его присоединение к мембране	Лаборатория биохимии азотфиксации и метаболизма азота
35	12-30	Узун Мария Михайловна	Изучение разнообразия и эволюции магнитотактических бактерий	Центр коллективного пользования «Биоинженерия»
12-50 – 13-30 ПЕРЕРЫВ				
36	13-30	Шумков Михаил Сергеевич	Полиамины микобактерий – предположения и находки (<i>Mycobacterium smegmatis</i> имеет функциональную агматиназу, но не содержит поламинов)	Группа редактирования геномов микроорганизмов
37	13-50	Кевбрин Вадим Владимирович	Протеолитический путь в алкалофильном микробном сообществе	Лаб. реликтовых микробных сообществ
38	14-10	Матюшенко Александр Михайлович	Исследования мутантных форм тропомиозина, наблюдаемых при наследственных патологиях различных типов мышц	Лаборатория структурной биохимии белка
39	14-30	Сорокин Владимир Владиславович	Синтез металлических наночастиц изогенной парой бактериальных культур облигатных метилотрофных бактерий <i>Methylophilus quaylei</i>	ЦКП «Коллекция UNIQEM»
40	14-50	Антонов Иван Валентинович	Сравнительно-геномный анализ запрограммированного сдвига рамки считывания в гене <i>chlD</i> у прокариот	Группа регуляторной транскриптомики и эпигеномики
41	15-10	Хренова Мария Григорьевна	Боковая цепь остатка цистеина как нуклеофил в реакциях ферментативного катализа и ковалентном ингибировании	Группа молекулярного моделирования
42	15-30 - 15-50			
	15-50	Закрытие научной Конференции Центра		