



ФЕДЕРАЛЬНЫЙ
ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР
**«ФУНДАМЕНТАЛЬНЫЕ
ОСНОВЫ БИОТЕХНОЛОГИИ»**
РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ
НАУК

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

14-16 февраля 2017

МЕТАГЕНОМНЫЙ АНАЛИЗ МИКРОБНЫХ СООБЩЕСТВ ЭКСТРЕМАЛЬНЫХ ЭКОСИСТЕМ

Марданов А.В.¹, Кадников В.В.¹, Белецкий А.В.¹, Карначук О.В.², Равин Н.В.¹

1. ФИЦ Биотехнологии РАН, ИНБ, Отдел молекулярной биологии микроорганизмов / Лаборатория геномики микроорганизмов и метагеномики

2. Томский государственный университет, Томск

Анаэробные условия, повышенное давление и высокая температура характерны для глубоких подземных экологических ниш. В настоящее время данные о микроорганизмах, обитающих в таких условиях, весьма ограничены. В работе проанализированы микробные сообщества подземных термальных вод из нефтепоисковых скважин. Используются два подхода для характеристики микробного сообщества: (1) идентификация микроорганизмов на основе амплификации и последующего пиросеквенирования фрагментов генов 16S рРНК и (2) секвенирование полной метагеномной ДНК микробного сообщества.

Нефтепоисковая скважина 1Р, расположенная вблизи поселка Белый Яр Томской области, была пробурена в 1961 году (температура воды 40-45°C, глубина 2,6 км.). Таксономический анализ на основе фрагментов генов 16S рРНК показал присутствие микроорганизмов различных филумов бактерий, среди которых доминируют *Firmicutes*, *Deltaproteobacteria*, *Chloroflexi* и *Nitrospira*. При этом около 70 % последовательностей 16S рРНК относятся к некультивируемым видам бактерий. В результате анализа метагеномных данных удалось собрать геномы трех известных сульфат-редуцирующих микроорганизмов – это *Desulforudis sp.*, *Desulfobacca sp.* и *Desulfotomaculum sp.*, а также композитные геномы представителей нескольких некультивируемых линий бактерий, в том числе относящихся к филуму *Chloroflexi*, кандидатным филумам ОР8 и ВРС1.

Второй объект исследования - нефтепоисковая скважина 3Р, которая была пробурена около пятидесяти лет назад, предположительно достигает пород мезозойского периода. Вода имеет температуру 46-51°C и поступает с глубины 2.8 км. Расшифровка метагеномной ДНК позволила охарактеризовать состав сообщества и определить последовательности геномов нескольких доминирующих линий микроорганизмов. Проведенный анализ показал, что для микробного сообщества скважины 3Р характерен хемолитоавтотрофный тип метаболизма на основе окисления водорода и низкомолекулярных органических соединений в процессах метаногенеза и сульфат-редукции.

В целом, полученные результаты свидетельствуют о том, что составы микробных сообществ подземных вод значительно отличаются по составу и разнообразию микроорганизмов в зависимости от окружающих условий в подземных водных горизонтах.

Публикации

1. Karnachuk OV, Kadnikov VV, Panova IA, Mardanov AV, Beletsky AV, Danilova EV, Avakyan MR, Ravin NV. Genome sequence of the copper resistant and acid-tolerant *Desulfosporosinus sp.* BG isolated from the tailings of a molybdenum-tungsten mine in the Transbaikal area. **Genom Data**. 2016 Dec 29;11:106-108. (ИФ – нет)
2. Mardanov AV, Beletsky AV, Kadnikov VV, Slobodkin AI, Ravin NV. Genome analysis of *Thermosulfurimonas dismutans*, the first thermophilic sulfur-disproportionating bacterium of the phylum *Thermodesulfobacteria*. **Frontiers in Microbiology**. 2016. 7: 950. (ИФ - 4,165)
3. Frank YA, Kadnikov VV, Gavrilo SN, Banks D, Gerasimchuk AL, Podosokorskaya OA, Merkel AY, Chernyh NA, Mardanov AV, Ravin NV, Karnachuk OV, Bonch-Osmolovskaya EA. Stable and Variable Parts of Microbial Community in Siberian Deep Subsurface Thermal Aquifer System Revealed in a Long-Term Monitoring Study. **Frontiers in Microbiology**. 2016 Dec 27;7:2101. (ИФ - 4,165)
4. Frank YA, Kadnikov VV, Lukina AP, Banks D, Beletsky AV, Mardanov AV, Sen'kina EI, Avakyan MR, Karnachuk OV, Ravin NV. Characterization and Genome Analysis of the First Facultatively Alkaliphilic *Thermodesulfovibrio* Isolated from the Deep Terrestrial Subsurface. **Frontiers in Microbiology**. 2016 Dec 19;7:2000. . (ИФ - 4,165)
5. Кадников В.В., Ивасенко Д.А., Белецкий А.В., Марданов А.В., Данилова Э.В., Пименов Н.В., Карначук О.В., Равин Н.В. (2016) Влияние содержания металлов на состав микробных сообществ кислых дренажных вод месторождения полиметаллических руд. **Микробиология**, т. 85, № 6, с. 732-739. . (ИФ – 0,796)
6. В.В. Кадников, Ю.А. Франк, А.В. Марданов, А.В. Белецкий, Д.А. Ивасенко, Н.В. Пименов, О.В. Карначук, Н.В. Равин «Некультивируемые бактерии и метаногенные археи доминируют в микробном сообществе подземных вод Западной Сибири» // **Микробиология**, т. 86 (принята в печать). (ИФ – 0,796)

МОДЕЛИРОВАНИЕ МОЛЕКУЛЯРНЫХ ОСНОВ БОЛЕЗНИ ГЕНТИНГТОНА В КЛЕТКАХ ДРОЖЖЕЙ *S. CEREVISIAE*

Серпионов Г.В.¹, Александров А.И.¹, Кушниров В.В.¹, Антоненко Ю.Н.², Тер-Аванесян М.Д.¹

1 ФИЦ Биотехнологии РАН, ИНБИ, Лаборатория молекулярной генетики

2 НИИ ФХБ им. Белозерского, МГУ им. М.В. Ломоносова

Болезнь Гентингтона - наследственное нейродегенеративное заболевание, связанное с агрегацией белка гентингина. Характерной особенностью этого белка является вариабельность длины входящего в его состав полиглутаминового домена. Как правило, данная болезнь возникает при наличии в составе полиглутаминового домена не менее 35 остатков, при этом возраст, в котором появляются симптомы заболевания и скорость развития болезни зависят от длины этого домена. Для изучения болезни Гентингтона создано множество животных и клеточных моделей, в том числе и модель, основанная на дрожжах *S. cerevisiae*. Используя данную модель, нам удалось выявить способность к агрегации молекул гентингина с коротким (25 остатков), непатогенным полиглутаминовым трактом и продемонстрировать токсичность таких агрегатов для клеток дрожжей. Эти наблюдения указывают на возможную роль немутантных полиглутаминовых белков в патогенезе болезни Гентингтона и других сходных заболеваний. Мы также продемонстрировали, что токсичность мутантного гентингина в разных штаммах дрожжей может быть вызвана разными механизмами. Так, нами ранее было показано, что одним из ключевых факторов, вызывающих токсичность гентингина у дрожжей, является агрегация факторов терминации трансляции, индуцированная амилоидами этого белка. Тем не менее, оказалось, что данный феномен, присущий, по всей видимости, различным штаммам дрожжей, не у всех из них приводит к токсичности. Эти результаты воспроизводят в дрожжевой модели известный феномен различной чувствительности клеток разных тканей млекопитающих к агрегации гентингина. Наши данные указывают на то, что в разных тканях токсичность гентингина может быть вызвана разными механизмами.

Публикации

1. Serpionov G V, Alexandrov AI, Antonenko YN, Ter-Avanesyan MD (2015) A protein polymerization cascade mediates toxicity of non-pathological human huntingtin in yeast. **Sci Rep** 5: 18407. doi:10.1038/srep18407. (ИФ - 5,228)
2. Alexandrov AI, Serpionov G V., Kushnirov V V., Ter-Avanesyan MD (2016) Wild type huntingtin toxicity in yeast: Implications for the role of amyloid cross-seeding in polyQ diseases. **Prion** 10: 221–227. doi:10.1080/19336896.2016.1176659. (ИФ - 2,444)
3. Serpionov G V., Alexandrov AI, Ter-Avanesyan MD (2016) Distinct mechanisms of mutant huntingtin toxicity in different yeast strains. **FEMS Yeast Res**: fow102. doi:10.1093/femsyr/fow102. (ИФ – 2.479)

Работы были поддержаны грантами Российского научного фонда (#14-14-00361), Российского фонда фундаментальных исследований (#14-04-00073) и программой РАН «Молекулярная и клеточная биология»

ПРИМЕНЕНИЕ МЕТАТРАНСКРИПТОМИКИ ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ ФУНКЦИОНАЛЬНОГО ПОТЕНЦИАЛА БАКТЕРИЙ МАЛОИЗУЧЕННЫХ ГРУПП

Дедыш С.Н., Иванова А.А.

ФИЦ Биотехнологии РАН, ИИМИ Лаборатория микробиологии болотных экосистем

Торфяники и торфяные болота входят в число доминирующих наземных экосистем бореальной зоны Северного полушария и выполняют ряд важных биосферных функций. По данным оценки микробного разнообразия молекулярными методами, большую часть пула прокариотных микроорганизмов этих экосистем составляют бактерии крайне малоизученных филогенетических групп, таких как *Acidobacteria* и *Planctomycetes*. Они почти нацело представлены некультивируемыми формами, а их метаболический потенциал и роль в природных экосистемах остаются неясны. Для исследования функционального потенциала этих бактерий, типичных для северных наземных экосистем, был проведен сравнительный анализ метатранскриптомов торфяных вод с водосбора Верхней Волги, обогащенных различными полимерными субстратами - целлюлозой, ксиланом, пектином и хитином. Анализ пула экстрагированной РНК был осуществлен с помощью технологии секвенирования Illumina HiSeq-2000. В общей сложности, было получено и проанализировано около 75 млн. фрагментов длиной 150-170 п.н. Анализ показал достоверное увеличение пула транскриптов рРНК представителей подгруппы 1 *Acidobacteria*, а также планктомицетов групп родов *Gemmata* и *Phycisphaera* в ответ на обогащение торфа хитином, что свидетельствует о наличии гидролитического потенциала у бактерий этих групп. Планктомицеты родов *Pirellula* и *Paludisphaera* дали отклик на обогащение торфа пектином и ксиланом. Это первые данные, подтверждающие реализацию гидролитического потенциала планктомицетами и ацидобактериями в природных средах.

Публикация

Ivanova A.A., Kim Y., Wegner C.E., Liesack W., Dedysh S.N. Identification of microbial populations driving biopolymer degradation in acidic peatlands by metatranscriptomic analysis // **Molecular Ecology**. 2016. 25: 4818-4835. (IF 5.95)

Исследования выполнены в рамках работ по проекту программы МКБ «Метатранскриптомика микробных сообществ пресноводных экосистем севера России».

СТРУКТУРНЫЕ ОСНОВЫ ВЫСОКОЙ ТЕРМОСТАБИЛЬНОСТИ ГИСТОНОПОДОБНОГО HU-БЕЛКА ИЗ МИКОПЛАЗМЫ SPIROPLASMA MELLIFERUM KC3

Бойко К.М.^{1,2}, Ракитина Т.В.², Корженевский Д.А.², Власкина А.В.², Агапова Ю.К.²,
Клейменов С.Ю.¹, Попов В.О.^{1,2}

1 ФИЦ Биотехнологии РАН, ИНБИ, Лаборатория инженерной энзимологии

2 НИЦ «Курчатовский институт»

HU-белки являются одними из наиболее широко распространенных белков в прокариотических организмах. Эти небольшие (около 90 а.к.) белки, аннотированные в большинстве бактериальных геномов, играют важную роль в процессах репликации, репарации и рекомбинации ДНК, являясь в связи с этим перспективной мишенью для разработки антибактериальных препаратов.

Все известные HU-белки существуют в виде стабильных и компактных димеров, состоящих из нескольких перекрученных α -спиралей, двух β -слоев и двух протяженных петель, отвечающих за связывание с ДНК. Описанные в литературе характеристики HU-белков из различных источников (термофилы, мезофилы), небольшие размеры белковой молекулы, а также сходство их пространственных структур, позволяет рассматривать эти белки в качестве удобной модели для исследования структурных основ термостабильности.

Исследования температурной стабильности HU-белка из паразитической микоплазмы *Spiroplasma melliferum* KC3 (HUSpm) методом ДСК показало, что его термостабильность находится на уровне белков данного класса из термофильных организмов. Нами была получена пространственная структура HUSpm с наивысшим для этого класса белков разрешением - 1.4 Å. Было установлено, что пространственная организация HUSpm сходна с таковой для известных представителей белков этого класса. В то же время проведенный детальный анализ показал, что в случае HUSpm имеется ряд структурных особенностей, ответственных за высокую термостабильность белка, что было подтверждено сайт-направленным мутагенезом.

Публикации

1. Konstantin Boyko, Tatiana Rakitina, Dmitry Korzhenevskiy, Anna Vlaskina, Yuliya Agapova, Dmitry Kamashev, Sergey Kleymenov, Vladimir Popov «Structural basis of high thermal stability of histone-like HU protein from mollicute *Spiroplasma melliferum* KC3» // **Scientific Reports**, 2016, 6, 36366; doi: 10.1038/srep36366. (ИФ - 5,228).
2. Konstantin Boyko, Marina Gorbacheva, Tatiana Rakitina, Dmitry Korzhenevskiy, Anna Vanyushkina, Dmitry Kamashev, Alexey Lipkin and Vladimir Popov «Expression, purification, crystallization and preliminary X-ray crystallographic analysis of the histone-like HU protein from *Spiroplasma melliferum* KC3» // **Acta Cryst. F.**, 2015, 71, 24–27. (ИФ - 0.647).

РАЗРАБОТКА НОВОЙ ТЕХНОЛОГИИ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОЙ ОЧИСТКИ СТОЧНЫХ ВОД НА ОСНОВЕ ПРОЦЕССА АНОКСИДНОГО ОКИСЛЕНИЯ АММОНИЯ АКТИВНЫМ ИЛОМ АНАММОКС

Пименов Н.В.¹, Марданов А.В.², Каллистова А.Ю.¹, Козлов М.Н.³, Равин Н.В.², Николаев Ю.А.^{1,3}

¹ ФИЦ Биотехнологии РАН, ИНМИ, Лаборатория реликтовых микробных сообществ,

² ФИЦ Биотехнологии РАН, ИНБ, Отдел молекулярной биологии микроорганизмов

³ АО «Мосводоканал», Москва

Азот органического происхождения (основная форма – аммоний) является одним из основных загрязнителей сточных вод. Недавнее открытие микробиологического процесса анаммокс – аноксидного хемолитоавтотрофного окисления аммония нитритом с образованием газообразного азота, радикально расширило возможности биологической очистки сточных вод. Технология основана на создании в биореакторе оптимальных условий для одновременного прохождения двух микробиологических процессов: аэробного окисления части аммония в нитрит (нитритации) и анаэробного окисления оставшейся части аммония нитритом с образованием газообразного азота (анаммокс). На базе АО «Мосводоканал» – крупнейшей в РФ водной компанией, обслуживающей очистные сооружения г. Москвы, проведено непрерывное культивирование анаммокс-консорциума, полученного из ила очистных сооружений стадий аэробной очистки сточной воды и анаэробной обработки осадка, в лабораторном (100 л) и пилотном биореакторах (20 м³) полного перемешивания. Субстратом для роста анаммокс-бактерий являлся фильтрат обезвоживающих центрифуг сброженного осадка, содержащий 500-800 мг/л N-NH₄. Целевые биохимические процессы (нитритация и анаммокс) в биореакторах осуществлялись двумя типами активных илов – свободноплавающим флокулированным илом и илом, фиксированным на стационарной листовой загрузке. С помощью молекулярно-биологических методов в активном иле на разных стадиях селекции выявлены новые анаммокс-бактерии *Candidatus* “*Jettenia moscovienalis*” и *Ca.* “*Brocadia*” spp. Для этих бактерий разработаны новые видо-специфичные олигонуклеотидные 16S рРНК зонды, успешно использованные для их *in situ* детекции в активном иле биореакторов и контроля анаммокс-процесса. Эффективное удаление аммония (более 80%) происходило в интервале температур 20-37°C, при концентрации кислорода 0,1-0,7 мг/л и рН 7,5-8,5. При гидравлическом времени пребывания в биореакторе 12-36 ч и производительности по воде 14-30 м³/сут нагрузка по азоту достигала 0,9-1,1 кг N/(м³·сут), удельная объемная мощность удаления азота - 0,8 – 1,0 кг N/(м³·сут). Показана устойчивость активного ила к повышенной концентрации нитрита (250 мг/л) и к пониженным значениям рН (5,7). В пилотном биореакторе отселектирован активный ил анаммокс для запуска промышленного биореактора объемом более 15000 м³. Технология готова к промышленному внедрению на Люберецких очистных сооружениях г. Москвы (АО «Мосводоканал»). Собственный технологический процесс, основанный на оригинальных консорциумах бактерий анаммокс, выделенных из очистных сооружений России, будет патентно чистым и позволит избежать расходов, связанных с использованием дорогостоящих зарубежных технологий.

Публикации

1. Николаев Ю.А., Козлов М.Н., Кевбрина М.В., Дорофеев А.Г., Пименов Н.В., Грачев В.А., Казакова Е.А., Жарков А.В., Кузнецов Б.Б., Патутина Е.О., Бумажкин Б.К. *Candidatus* “*Jettenia moscovienalis*” sp.nov. – новый вид бактерий, осуществляющих анаэробное окисление аммония. **Микробиология**. 2015. Том. 84. №2. С.236-243. (ИФ – 0,796)
2. Yu.A.Nikolaev, M.N.Kozlov, M.V. Kevbrina, A.G. Dorofeev, V.G. Aseeva, N.V. Pimenov, A.V. Zharkov Study of the low temperature anoxic ammonia oxidation feasibility. 2015. **Water Practice & Techn.** V.10(1). P.172-177. (ИФ – нет)
3. А.Ю. Каллистова, А.Г. Дорофеев, Ю.А. Николаев, М.Н. Козлов, М.В. Кевбрина, Н.В. Пименов. Роль анаммокс-бактерий в очистке сточных вод от соединений азота // **Микробиология**. 2016. Т. 85. №2. С. 126-144. (ИФ – 0,796)
4. Марданов А.В., Белецкий А.В., Каллистова А.Ю., Котляров Р.Ю., Николаев Ю.А., Кевбрина М.В., Агарев А.М., Равин Н.В., Пименов Н.В. Динамика изменения состава микробного консорциума в процессе запуска однореакторной проточной лабораторной установки нитритации/анаммокс // **Микробиология**. 2016. Т. 85. №6. С. 663-675. (ИФ – 0,796)
5. Николаев Ю.А., Козлов М.Н., Гаврилин А.М., Кевбрина М.В., Пименов Н.В., Дорофеев А.Г., Агарев А.М., Каллистова А.Ю. Инновационная энергоэффективная и ресурсосберегающая технология очистки сточных вод от аммония в анаэробно-аноксидных условиях // **Водоснабжение и санитарная техника**. 2016. №10. С. 30-35. (ИФ – нет)
6. Дорофеев А. Г., Ю. А. Николаев, М. Н. Козлов, М. В. Кевбрина, А. М. Агарев, А. Ю. Каллистова, Н. В. Пименов. Моделирование процесса анаммокс с использованием пакета прикладных программ BioWin. **Прикладная биохимия и микробиология**. 2017. Т.53. №1. С.88-95. (ИФ - 0,671)

Получено решение о выдаче патента РФ (от 28.10.2016 г.) по заявке № 2015142067 «Способ очистки сточных вод от аммония и органического вещества», авторы: Козлов М.Н., Гаврилин А.М., Кевбрина М.В., Николаев Ю.А., Дорофеев А.Г., Пименов Н.В., Агарев А.М., Каллистова А.Ю., патентообладатель - ФИЦ Биотехнологии РАН.

Заявка на изобретение № 2016144486 «Способ очистки сточных вод от аммония и органического вещества и установка для его осуществления» авторы: Козлов М.Н., Гаврилин А.М., Кевбрина М.В., Николаев Ю.А., Дорофеев А.Г., Пименов Н.В., Жарков А.В., Агарев А.М., Асеева В.Г., Каллистова А.Ю., дата подачи заявки в ФИПС - 14.11.2016, патентообладатель - ФИЦ Биотехнологии РАН

Работа выполнена из средств ФЦП № 14.607.21.0018 (RFMEFI60714X0018).

ГЕНОМИКА И ЭПИГЕНОМИКА АДАПТАЦИИ ОРГАНИЗМОВ

Артемов А.В.¹, Женило С.В.¹, Жигалова Н.А.¹, Мазур А.М.¹, Медведева Ю.А.¹, Прохорчук Е.Б.¹, Скрыбин К.Г., Соколов А.С., Шарко Ф.С., Булыгина Е.С.², Недолужко А.В.², Расторгуев С.М.², Цыганкова С.В.², Мюге Н.С.³, Ощепков Д.Ю.⁴

1 ФИЦ Биотехнологии РАН, ИНБИ, Лаборатория геномики и эпигеномики позвоночных

2 Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт»

3 ФГБНУ «ВНИРО»,

4 Федеральный исследовательский центр «ИЦиГ» СО РАН

Основная проблематика доклада лежит в области генетических и эпигенетических особенностей адаптации позвоночных организмов к стрессовым воздействиям окружающей среды. На примере якутских лошадей рассмотрим геномику адаптации лошадей к арктическим условиям и низким температурам. Однако, позвоночные организмы используют не только генетические, но и надгенетические механизмы для приспособления к стрессовым условиям.

Вторым объектом исследования является процесс адаптации к гипоксии. Гипоксия представляет собой существование живого в условиях недостатка кислорода. В частности, гипоксия является одним из процессов, который сопровождает переход опухоли к метастазированию. Клетки почки с таргетированным (CRISPR-Cas9) геном VHL представляют собой удобную модель для изучения гипоксии: в них происходит стабильная активация гена HIF1 α , как и при стрессовом недостатке кислорода. Это приводит к гиперметилированию генома клеток, активации Jun-Fos системы и ускорению всего каскада генов, характерных для эпителиально-мезенхимального перехода.

Третий объект рассмотрения - переход морских рыб *Gasterosteus aculeatus* к условиям жизни в пресноводных озерах. Такой переход связан с понижением осмотического давления на клетки. Помимо островков дивергенции с измененными частотами аллелей, в морских и пресноводных колюшках наблюдается существенное изменение профиля метилирования генома. В частности, изменения происходят в ЦфГ островках генов, кодирующих ионные насосы. Интересно и то, что слабое генетическое разнообразие пресноводных колюшек компенсируется существенно большим разнообразием эпиаллелей.

Публикации

1. Librado P et al. Tracking the origins of Yakutian horses and the genetic basis for their fast adaptation to subarctic environments. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 2015, 112(50):E6889-97. doi: 10.1073/pnas.1513696112. (ИФ - 9,423)
2. Zhigalova N, Artemov A, Mazur A, Prokhortchouk E Transcriptome sequencing revealed differences in the response of renal cancer cells to hypoxia and CoCl₂ treatment. **F1000Res**. 2015, 4:1518. doi: 10.12688/f1000research.7571.1. eCollection 2015. (ИФ – нет)
3. Жигалова НА, Женило СВ, Артемов АВ, Прохорчук ЕБ. «Моделирование гипоксии в клетках рака почки с помощью CRISPR/CAS9 редактирования» **Молекулярная биология**, 2017, принято в печать (ИФ – 0.612)
4. Rastorguev SM, Nedoluzhko AV, Sharko FS, Boulygina ES, Sokolov AS, Gruzdeva NM, Skryabin KG, Prokhortchouk EB. Identification of novel microRNA genes in freshwater and marine ecotypes of the three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus*). **Molecular Ecology Resources**. 2016, 16(6):1491-1498. doi: 10.1111/1755-0998.12545. (ИФ – 5.298)
5. Колюшка: Расторгуев СМ, Недолужко АВ, Груздева НМ, Булыгина ЕС, Цыганкова СВ, Ощепков ДЮ, Мазур АМ, Прохорчук ЕБ, Скрыбин КГ. «Изучение генной экспрессии при адаптации к гипотоническим условиям на примере трехиглой колюшки», **Acta Naturae**, 2017, принято в печать. (ИФ – 1.77)
6. Rastorguev SM, Nedoluzhko AV, Sharko FS, Boulygina ES, Sokolov AS, Gruzdeva NM, Skryabin KG, Prokhortchouk EB. "Differential miRNA expression in the three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus*): evolutionary adaptation and immediate response to environmental changes. 2017 Submitted to **Molecular Genetics and Genomics**. (ИФ – 2.622)

АКТИВАЦИЯ КИСЛОРОДНЫХ МОЛЕКУЛ ПРИ ИХ ПРЯМОМ ВОЗБУЖДЕНИИ ИК ЛАЗЕРНЫМ ИЗЛУЧЕНИЕМ В АЭРОБНЫХ СИСТЕМАХ

Козлов А.С., Красновский А.А.

ФИЦ Биотехнологии, ИНБИ, Лаборатория физической биохимии

Переходу кислородных молекул из основного в синглетные состояния соответствуют полосы поглощения в ближней ИК-области (765, 1070 и 1273 нм). Лазерное возбуждение этих переходов приводит к образованию реакционно-способного синглетного кислорода. Предполагают, что этот процесс может использоваться для уничтожения раковых опухолей. Для обоснования этого представления необходима информация об оптической плотности ИК полос поглощения молекул кислорода, которая определяет скорость генерации синглетного кислорода лазерным излучением.

Поскольку оптическая плотность мала и ее невозможно измерить прямыми спектрофотометрическими методами, в нашей лаборатории разработан фотохимический метод, в основе которого лежит прямое возбуждение кислорода ИК диодными лазерами с последующей регистрацией образовавшегося синглетного кислорода с помощью химических ловушек. Кинетический анализ позволил нам разработать эффективный метод расчета оптической плотности растворенного кислорода на основе этих данных. Цель работы состояла в том, чтобы применить этот метод к исследованию абсорбционных свойств молекулярного кислорода в органических и водных системах в естественных условиях.

Показано, что в тестовых неполярных органических средах с большим временем жизни синглетного кислорода, синглетный кислород заселяется при лазерном возбуждении всех указанных полос поглощения молекулярного кислорода, причем соотношение максимумов полос составляет 0,13:0,01:1 соответственно. Оптическая плотность в этих максимумах линейно зависит от растворимости кислорода и молярного коэффициента поглощения. Получены значения молярных коэффициентов поглощения в органических и водных средах. Показано, что с увеличением полярности среды молярный коэффициент в полосе 1273 нм уменьшается (от ~5,3 до $1,6 \times 10^{-3} \text{ M}^{-1} \text{ см}^{-1}$), достигая минимума в водных системах, тогда как интенсивность полосы 765 нм в тех же условиях возрастает, достигая максимума (примерно в 1,7 раза больше) в воде. Такое же соотношение соблюдается в гетерогенных водно-мицеллярных системах. Таким образом, в водных системах эффективность заселения синглетного кислорода лазерами с длиной волны 1273 и 765 нм почти одинакова. Эффективность окисления ловушек практически не изменялась при применении импульсных ИК-лазеров вплоть до пиковой мощности 26 МВт/см^2 . Общая эффективность окисления ловушек при прямом лазерном возбуждении кислорода на 4-5 порядков меньше, чем при фотосенсибилизированном порфиринами возбуждении кислорода.

Таким образом, генерация синглетного кислорода за счет прямого возбуждения кислородных молекул существенно менее эффективна, чем при фотосенсибилизации порфиринами, но все же реально происходит в естественных системах, причем лазеры с длиной волны 1273 нм наиболее эффективны в органических средах. Возбуждение полосы 765 нм более эффективно в водных и биологических системах, так как это излучение в 100 раз слабее поглощается водой и поэтому существенно меньше нагревает среду. Излучение 1070 нм непригодно, по крайней мере, для биологических экспериментов, из-за малой эффективности и сильного поглощения водой. Итог этого исследования состоит также в том, что нам удалось провести надежные измерения абсорбционных коэффициентов растворенного кислорода и тем самым полностью завершить исследование фотоники кислородных молекул, растворенных в органических и водных средах.

Публикация

Alexander A. Krasnovsky, Anton S. Kozlov. Photonics of dissolved oxygen molecules. Comparison of the rates of direct and photosensitized excitation of oxygen and reevaluation of the oxygen absorption coefficients. **J. Photochemistry and Photobiology, A: Chemistry**. 2016, V. 329, 167-174. (ИФ - 2,477)

ИЗМЕНЕНИЯ В СТРУКТУРЕ И СВОЙСТВАХ ТРОПОМИОЗИНА ПРИ РАЗЛИЧНЫХ ПАТОЛОГИЧЕСКИХ СОСТОЯНИЯХ СЕРДЕЧНОЙ МЫШЦЫ

Матюшенко А.М.¹, Артемова Н.В.¹, Щепкин Д.В.², Копылова² Г.В., Набиев С.Р.², Бершицкий С.Ю.², Пивоварова А.В.¹, Левицкий Д.И.^{1,3}

¹ Лаборатория структурной биохимии белка, Институт биохимии им. А.Н. Баха, ФИЦ биотехнологии РАН;

² Институт иммунологии и физиологии Уральского отделения РАН, г. Екатеринбург;

³ НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского МГУ им. М.В. Ломоносова

Мутации в гене сердечного тропомиозина (Трп) – актин-связывающего белка, играющего ключевую роль в регуляции сокращения скелетных и сердечных мышц, зачастую ассоциированы с развитием тяжелых наследственных заболеваний человека – кардиомиопатий. Различными методами мы исследовали влияние целого ряда таких кардиомиопатических мутаций на структуру и функциональные свойства сердечного Трп. При этом мы изучали эффекты мутаций, расположенных в тех областях молекулы Трп, в которых она взаимодействует с тропонином Т – в области остатков 170–195 (мутации L185R, E180V и I172) и в области перекрытия N- и C-концов молекул Трп на поверхности актинового филамента (мутации M8R, K15N, I284V, M281T и A277V). Методом дифференциальной сканирующей калориметрии (ДСК) показано, что мутации в области остатков 170–195 по-разному влияют на доменную структуру молекулы Трп: мутации L185R и E180V повышали термостабильность C-концевой области Трп, тогда как мутация I172T дестабилизировала эту область молекулы Трп. Что касается мутаций в области перекрытия N- и C-концов молекул Трп, то большинство из них не оказывало заметного влияния на структуру Трп, но все они снижали вязкость растворов Трп. Методом соосаждения показано, что почти все исследованные мутации снижают сродство Трп к актину. При исследованиях температурных зависимостей светорассеяния комплексов Трп с F-актином показано, что большинство мутаций снижает стабильность таких комплексов, за исключением мутаций A277V и E180V, которые увеличивали ее. В экспериментах, проведенных в искусственной системе подвижности (*in vitro* motility assay), было показано, что мутации L185R и E180V заметно повышают чувствительность к ионам кальция скорости скольжения реконструированных тонких филаментов (актиновых филаментов, содержащих Трп и тропонин). Таким образом, кардиомиопатические мутации в гене сердечного Трп могут оказывать существенное влияние на структуру и функциональные свойства Трп.

Помимо этого, мы исследовали влияние дисульфидной сшивки между остатками Cys-190 в двух цепях сердечного Трп, которая часто наблюдается при различных поражениях сердечной мышцы (например, при инфаркте миокарда), на функциональные свойства Трп. Показано, что такая сшивка резко снижает сродство Трп к актину и понижает стабильность комплексов, образуемых Трп с F-актином, но при этом заметно повышает скорость скольжения реконструированных тонких филаментов в искусственной системе подвижности.

Публикации

1. Matyushenko A.M., Artemova N.V., Shchepkin D.V., Kopylova G.V., Nabiev S.R., Nikitina L.V., Levitsky D.I., Bershitsky S.Y. “The interchain disulfide cross-linking of tropomyosin alters its regulatory properties and interaction with actin filament”. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, 2017, v. 482, p. 305–309. (ИФ - 2.371)
2. Matyushenko A.M., Shchepkin D.V., Kopylova G.V., Popruga K.E., Artemova N.V., Pivovarova A.V., Bershitsky S.Y., Levitsky D.I. “Structural and functional effects of cardiomyopathy-causing mutations in troponin T-binding region of cardiac tropomyosin”. **Biochemistry**, 2017, v. 56, p. 250–259. (ИФ - 2.876)

ПЕРВАЯ КСИЛАНОЛИТИЧЕСКАЯ ГИПЕРТЕРМОФИЛЬНАЯ АРХЕЯ *THERMOCOCCUS* SP. 2319X1: ВЫДЕЛЕНИЕ, ХАРАКТЕРИСТИКИ, АНАЛИЗ МУЛЬТИДОМЕННОЙ МУЛЬТИФУНКЦИОНАЛЬНОЙ ЦЕЛЛЮЛАЗЫ/КСИЛАНАЗЫ

Гаврилов С.Н.¹, Заюлина К.С.¹, Stracke С.², Kallnik V.², Jensen К.³, Menzel P.⁴, Slesarev A.⁵, Bräsen С.², Peng X.⁴, Бонч-Осмоловская Е.А.¹, Siebers В.², **Кубланов И.В.¹**

¹ ФИЦ «Биотехнологии» РАН, ИХМИ, Отдел биологии экстремофилов / Лаборатория разнообразия и экологии экстремофильных микроорганизмов

² University of Duisburg-Essen, Germany

³ Novozymes A/S, Bagsværd, Denmark

⁴ University of Copenhagen, Denmark

⁵ Zylacta Corporation, Gaithersburg, USA

Термостабильные гидролазы могут быть использованы в различных промышленных процессах, например, в целлюлозно-бумажной и пищевой промышленности (Unsworth et al., 2007), производстве биотоплива и т.д. В природных местообитаниях при температурах выше 80°C обычно доминируют археи, однако среди известных к настоящему времени гипертермофильных архей на полисахаридах могут расти единицы. Для выделения гипертермофильных архей, способных расти на полисахаридах и продуцирующих термостабильные гликозидазы (GH) мы использовали подход, основанный на получении *in situ* накопительных культур (Kublanov et al., 2009), инкубируя пробирки с ксиланом непосредственно в горячем источнике, расположенном в прибрежной зоне о. Кунашир (Курильские острова). Полученная накопительная культура стала источником выделения штамма гипертермофильной археи рода *Thermococcus*, растущей на ксилане при 85°C и pH 7.0. Помимо ксилана данный микроорганизм способен расти на карбоксиметил целлюлозе (КМЦ), аморфной целлюлозе (АМЦ), ксилюгукане, альгинате, лихенане, крахмале, а также различных моно- и дисахаридах. Фракции поверхностных белков клеток штамма 2319x1, выращенного на ксилане, АМЦ и ксилюгукане, проявили эндоксилазназную и эндоглюканазную активности при 85-92°C. Геном данного микроорганизма был секвенирован и полностью собран. В ходе анализа генов гликозидаз, был выявлен один, кодирующий уникальный мультидоменный белок (1303 аминокислот, 143 КДа), который состоял из 3 каталитических и 2 связывающих доменов, расположенных следующим образом: GH5-GH12-GH12-CBM2-CBM2. Филогенетический анализ каждого каталитического домена выявил их различное происхождение и одинаковую наиболее вероятную функцию – эндоглюканазную. Весь ген, а также его неполные копии были клонированы и экспрессированы в *E. coli*, и получившиеся рекомбинантные белки охарактеризованы. Все варианты оказались высоко активны по отношению к КМЦ, β-глюкану и лихенану, и в меньшей степени по отношению к другим поли- и олигосахаридам (Gavrilov et al., 2016), при этом спектр гидролизумых субстратов оказался довольно широким и включал не только глюкозиды, но и ксилозиды и маннозиды.

Публикация

S.N. Gavrilov,¹ С. Stracke,² К. Jensen,³ P. Menzel,⁴ V. Kallnik,² A.Slesarev,^{1,5} Т. Sokolova,¹ К. Zayulina,¹ С. Bräsen,² Е.А. Bonch-Osmolovskaya,¹ Xu Peng,⁴ I.V. Kublanov,¹ В. Siebers² Isolation and characterization of the first xylanolytic hyperthermophilic euryarchaeon *Thermococcus* sp. strain 2319x1 and its unusual multidomain glycosidase // **Frontiers in Microbiology**. 2016. 7:552. (ИФ - 4,165).

ФИЛОГЕНЕТИЧЕСКОЕ И ФЕНОТИПИЧЕСКОЕ РАЗНООБРАЗИЕ ФОТОТРОФНЫХ БАКТЕРИЙ В ЭКСТРЕМАЛЬНЫХ И УМЕРЕННЫХ ЭКОСИСТЕМАХ

Горленко В.М.¹, Брянская И.¹, Калашников А.¹, Кузнецов Б.², Гайсин В.², Груздев В.², Сухачева М.², Иванов Т.², Кашкак Е.³, Белькова Н.³, Данилова Э.³, Дагурова О.³, Намсараев Б.³

¹ ФИЦ Биотехнологии РАН, ИНМИ, Лаборатория экологии и геохимической деятельности

² ФИЦ Биотехнологии РАН, ИНБ

³ Институт общей и экспериментальной биологии СО РАН

Из термальных источников Курумканского района (Бурятия) выделены и идентифицированы новые штаммы мезофильных АНФБ *Chloroploca asiatica* и *Oscillochloris* sp. Из термальных источников других регионов выделены культуры термофильных фототрофных. Принята к печати статья в IJSEM с описанием нового вида *Chloroflexus islandicus* sp. nov. Определена полная последовательность геномной ДНК новой бактерии. Особая новизна проведенного исследования заключается в том, что ранее были известны только два вида хлоросом-содержащих термофильных бактерий.

Методом высокопроизводительного секвенирования выполнено сравнительное изучение состава микробных сообществ воды и мата сульфидсодержащего мезотермального минерального источника Хойто-Гол, расположенного в горной системе Восточного Саяна. Обнаружены и получены в культурах аноксигенные фототрофные бактерии филумов *Chloroflexi*, *Chlorobi* и пурпурные бактерии, относящиеся к α -, β - и γ -*Proteobacteria*.

Проведена экспедиция с целью исследования фототрофных сообществ в микробных матах супралиторали Кандалакшского залива. Отобраны пробы из матов холодных высокоминерализованных сульфидных источников на побережье озера Чокрак (Крым). С использованием специфических праймеров на гены PufLM выявлены новые таксоны нитчатых фототрофных бактерий филума *Chloroflexi*. Получены накопительные культуры.

Публикации

1. Vasil A. Gaisin; Alexander M. Kalashnikov; Denis S. Grouzdev, PhD; Marina V. Sukhacheva; Boris B. Kuznetsov, PhD; Vladimir M. Gorlenko. *Chloroflexus islandicus* sp. nov., a thermophilic filamentous anoxygenic phototrophic bacterium from geyser Strokkur (Iceland) // **IJSEM**. DOI 10.1099/ijsem.0.001820 (ИФ - 2,439)
2. Gaisin V.A., Ivanov T.M., Kuznetsov B.B., Gorlenko V.M. Grouzdev D.S. Draft genome sequence of *Chloroflexus* sp. strain isl-2, a thermophilic filamentous anoxygenic phototrophic bacterium isolated from the Strokkur geyser, Iceland // **Genome Announc.** 2016. 4(4):e00714-16. doi: 10.1128/genome.A.00714-16. (ИФ – нет)
3. Кашкак Е.С., Гайсин В.А., Дагурова О.П., Брянцева И.А., Данилова Э.В. Формирование и функционирование микробных матов минерального источника Хойто-Гол (Восточный Саян) // **Известия Самарского научного центра РАН**. 2016. Т. 18. № 2 (2). С. 397-402. (ИФ – нет)
4. Кашкак Е.С., Белькова Н.Л., Данилова Э.В., Дагурова О.П., Намсараев Б.Б., В.М. Горленко. Филогенетическое и функциональное разнообразие прокариот мезотермального источника Хойто-гол // **Микробиология**. 2016. Т. 85. № 5. С. 555-567. (ИФ – 0,796)

РАЗВИТИЕ ПРОТЕОМНЫХ БАЗ ДАННЫХ О БЕЛКАХ КУЛЬТИВИРУЕМЫХ КЛЕТОК И НЕКОТОРЫХ ТКАНЕЙ ЧЕЛОВЕКА, А ТАКЖЕ СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫХ ЖИВОТНЫХ

Шишкин С.С., Ковалев Л.И., Ковалева М.А., Иванов А.В., Еремина Л.С., Лисицкая К.В., Пашинцева Н.В.

ФИЦ Биотехнологии РАН, ИНБИ, Лаборатория биомедицинских исследований.

Во второй декаде 21-го века в Институте биохимии им. А.Н. Баха РАН в сотрудничестве с некоторыми другими научными и медицинскими учреждениями были созданы две оригинальные отечественные базы данных («Протеомика рака простаты», БД «ППП» и «Протеомика мышечных органов», БД «ПМО»). Обе БД формировались, как доступные для Интернет - пользователей (<http://ef.inbi.ras.ru>. и <http://mp.inbi.ras.ru>). Они были включены Государственный реестр баз данных (регистрационные номера: БД «ППП» - 2012620676 от 13.07.2012, БД «ПМО» - 2013620315 от 20.02.2013). К 2016 г. БД «ППП» и «ПМО» прошли несколько этапов модернизации, существенно расширились и проявили себя как биоинформационные ресурсы, использование которых полезно для решения различных биотехнологических задач.

В 2016 г. на основе БД «ППП» был сформирован новый отечественный информационный ресурс, содержащий 16 информационных модулей, среди которых появились три модуля о белках клеточных линий ОКР-GS, 769-P и А-498 (клетки аденокарцином почки), а так же модуль о белках линии НТ-29 (клетки аденокарциномы кишечника). Кроме того, в созданный информационный ресурс были включены три модуля о белках злокачественных клеток мезенхимального происхождения (рабдомиосаркомы RD, лейомиосаркомы SK-UT-1B и остеосаркомы U-2 OS) и модуль о белках нормальных мезенхимальных стволовых клеток (SC5-MSC). Этот информационный ресурс был назван «Протеомика злокачественных клеток» (БД «ПЗК») и размещен в сети Интернет – пользователей по адресу <http://ef2.inbi.ras.ru>. Общее количество идентифицированных белков в БД «ПЗК» достигло 629 и можно надеяться, что оно будет увеличиваться.

В 2016 г. материалы, собранные в БД «ПМО», удалось расширить, к настоящему они охватывают информацию о 780-790 белках. Эти материалы были использованы при выполнении заданий по гранту РНФ на 2016 год «Изучение механизмов биосинтеза и деградации специфических биологически активных белков и пептидов под действием ферментативного и неферментативного протеолиза тканей *Sus scrofa* и *Bos taurus* и разработке на их основе специализированных пищевых продуктов».

Публикации

1. Pashintseva N.V., Shishkin S.S., Lisitskaya K.V., Kovalev L.I., Kovaleva M.A., Eryomina L.S., Kamenikhina I.A., Novikova L.A., Sadykhov E.G. Study of Splicing Factor, Proline- and Glutamine-rich by Proteomic Techniques in Human Malignant and Nonmalignant Cell Lines. **Protein & Peptide Letters**. 2016. V.23, No 11. P. 958-966. DOI: 10.2174/0929866523666160914174007. (ИФ - 1,069)
2. Шишкин С.С., Ковалев Л.И., Пашинцева Н.В., Еремина Л.С., Иванов А.В., Садыхов Э.Г. Протеомные базы данных в России. Биотехнологические аспекты. **Актуальная биотехнология**. 2016. №3 (18) С.42-47. ISSN 2304-4691. (ИФ – нет)
3. Чернуха И.М., Федулова Л.В., Котенкова Е.А., Шишкин С.С., Ковалев Л.И. Влияние автолиза на протеомно-пептидный профиль сердечной мышцы и аорты *BOS TAURUS* и *SUS SCROFA*. **Теория и практика переработки мяса**. 2016. Т. 1. №2. С. 4-9. (ИФ – нет)
4. Vostrikova N.L., Chernukha I.M., Kulikovskiy A.V., Shishkin S.S. Study and identification of main proteins and peptides to determine the content of muscle proteins in structureless cooked products by method of two-dimensional electrophoresis followed by time-of-flight mass spectrometry identification. *Foods and Raw Materials*, 2016, vol. 4, no. 2, P. 136-147. (ИФ – нет)
5. Shishkin S.S. Modern Biochemistry in Research of Human Malignant Cells and Experimental Oncology. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology Research*. 2016. V2, No 4. P.187-195. (ИФ – нет)

БИОКАТАЛИТИЧЕСКАЯ ТРАНСФОРМАЦИЯ ДИГИДРОКВЕРЦЕТИНА (ТАКСИФОЛИНА) С УЧАСТИЕМ МЕДЬСОДЕРЖАЩИХ ОКСИДАЗ

Хлупова М.Е.¹, Васильева И.С.¹, Шумакович Г.П.¹, Морозова О.В.¹, Чертков В.А.², Шестакова А.К.³, Кисин А.В.³, Ярополов А.И.¹

¹ ФИЦ Биотехнологии РАН, ИНБИ, Лаборатория химической энзимологии

² МГУ имени М.В. Ломоносова, Химический факультет

³ ФГУП «Государственный научно-исследовательский институт химии и технологии элементоорганических соединений»

Фундаментальная задача исследования - изучение механизма гомо- и гетеромолекулярных реакций радикального сочетания природных физиологически активных веществ с участием ферментов с целью получения соединений с новыми свойствами.

Проведена окислительная полимеризация дигидрокверцетина (ДГК) с участием многоядерных медьсодержащих оксидаз: билирубиноксидазы *Myrothecium verrucaria* (БОД) и лакказы базидиального гриба *Trametes hirsuta* (ЛК). Продукты ферментативного синтеза были охарактеризованы методами УФ-видимой, FTIR и ЯМР ¹H и ¹³C спектроскопией. По сравнению с мономером олигомеры ДГК, синтезированные с использованием обоих ферментов, имели более высокую термостабильность. В зависимости от используемой оксидазы продукты полимеризации ДГК имели различные физико-химические характеристики. В результате ЯМР исследований было показано различие в структурах олигомеров ДГК, полученных с использованием ЛК и БОД. Олигомеры ДГК, синтезированные с использованием БОД, обладали более высокой антиоксидантной активностью по сравнению с олигомерами, полученными в результате ЛК-катализируемой полимеризации мономера. Проведена лакказа-катализируемая дериватизация ДГК *n*-аминобензойной кислотой (АБК). Определена структура основного продукта реакции.

Публикации

1. Khlopova M., Vasil'eva I., Shumakovich G., Morozova O., Chertkov V., Shestakova A., Kisin A., Yaropolov A. Laccase-mediated biotransformation of dihydroquercetin (taxifolin). **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**. 2016. V. 123. №1. P. 62-66. (ИФ - 2,189)
2. М.Е. Хлупова, И.С. Васильева, Г.П. Шумакович, О.В. Морозова, В.А. Чертков, А.К. Шестакова, А.В. Кисин, А.И. Ярополов. Ферментативная полимеризация дигидрокверцетина с участием билирубиноксидазы. **Биохимия**. 2015. Т. 80. №2. С. 285-295. (ИФ - 1,421)

ИССЛЕДОВАНИЕ СИСТЕМАТИКИ АРХЕЙ РОДА *ACIDIPLASMA*

Булаев А.Г.¹, Сухачева М.В.¹, Кузнецов Б.Б.¹, Каныгина А.В.², Манолов А.И.²

¹ ФИЦ Биотехнологии РАН, ИНБИ,

² Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины ФМБА

Археи рода *Acidiplasma*, аэробные умеренно термофильные ацидофильные ($pH_{opt} \sim 1.0$) окислители железа – одна из доминирующих групп в биоокислении сульфидных руд. Было показано, что археи рода *Acidiplasma* более устойчивы к высоким концентрациям ионов железа, чем бактерии р. *Sulfobacillus* (которые также являются доминирующей группой микроорганизмов в процессах биовыщелачивания), и поэтому являются достаточно интересной с точки зрения биотехнологии группой.

Описанные типовые виды *A. aeolicum* и *A. cupricumulans* (а также все известные штаммы рода) идентичны по 16S рРНК и разделены на основании ДНК-ДНК гибридизации (метода с низкой воспроизводимостью результатов). Объектом нашего исследования были штаммы *A. aeolicum* V1^T, *A. cupricumulans* ВН2^T и *Acidiplasma* sp. МВА-1. Исследуемые штаммы были проанализированы методом геномного фингерпринтинга с использованием ERIC–праймеров, специфичных к повторяющимся межгенным консенсусным последовательностям, REP–праймеров, специфичных к внегенным палиндромным повторам, BOXA1 и BOXS1–праймеров, специфичных к повторяющимся BOX последовательностям. Все проанализированные штаммы имели специфические ПЦР–фингерпринты, различающиеся числом фрагментов, их размерами и интенсивностью. Таким образом, различия между фингерпринтами по числу и размеру фрагментов подтвердило наличие генетические различия между штаммами, несмотря на высокое сходство генов 16S рРНК и высокий уровень ДНК-ДНК гибридизации. Более детально систематика штаммов была изучена с помощью методов высокопроизводительного секвенирования. Последовательности геномов были секвенированы по технологии Illumina и депонированы в GenBank под номерами LKBG01000000, LKBH00000000 и JYHS00000000, соответственно. Размеры геномов составили 1817456, 1759073 и 1747364 п.н. Было проведено сравнение средней нуклеотидной идентичности (ANI), средней аминокислотной идентичности (AAI), частоты распределения тетра- и динуклеотидов в геноме (Karin genomic signature), in-silico ДНК-ДНК гибридизация, а также филогенетический анализ с использованием коровых генов представителей порядка *Thermoplasmatales*, геномы которых депонированы в базах данных (773 общих гена). ANI между всеми штаммами были > 98%, AAI > 99%, сходство штаммов по частотам встречаемости тетра- и динуклеотидов > 99%, уровни ДНК-ДНК гибридизации > 90%. Последовательности коровых генов штаммов *Acidiplasma* были практически идентичны между собой. Таким образом, результаты показывают, что согласно принятым таксономическим критериям все исследованные штаммы должны быть отнесены к одному виду, а систематика рода должна быть пересмотрена.

Публикации

1. Булаев А.Г., Сухачева М.В., Кузнецов Б.Б. Применение метода REP-PCR для типирования близкородственных штаммов эвриархей рода *Acidiplasma* (*Thermoplasmatales*) // **Микробиология**. 2016. Т. 85. № 2. С. 223–226. (ИФ – 0,796)
2. Булаев А.Г., Каныгина А.В., Манолов А.И. Анализ генома полиэкстремофильной археи *Acidiplasma* sp. МВА-1, доминирующей в микробном сообществе реактора биовыщелачивания // **Микробиология**. 2017. Т. 86. № 1. С. 80–87. (ИФ – 0,796)
3. Bulaev A.G. Ferrous iron oxidation in packed-bed reactors at elevated temperatures // **Adv. Materials Res.** 2015. V. 1130. P. 226–229. (ИФ – нет)

ВИРУСОПОДОБНЫЕ ЧАСТИЦЫ - НОСИТЕЛИ АНТИГЕНОВ ВИРУСА ГРИППА КАК ОСНОВА НОВЫХ РЕКОМБИНАНТНЫХ ВАКЦИН

Блохина Е.А., Котляров Р.Ю., Марданова Е.С., Зыкова А.А., Куприянов В.В., **Равин Н.В.**

ФИЦ Биотехнологии РАН, ИНБ, Отдел молекулярной биологии микроорганизмов / Лаборатория систем молекулярного клонирования

Разработаны новые способы получения наноразмерных частиц – носителей консервативных эпитопов вируса гриппа, которые могут стать основой рекомбинантных противогриппозных вакцин. В рамках первого подхода в качестве белка-носителя использован ядерный антиген вируса гепатита В (НВс антиген). Разработан способ получения вставок протяженных пептидов в районе иммунодоминантной петли НВс без нарушения сборки частиц за счет использования "гибких" линкеров в точках "стыков" между вставкой и последовательностями НВс антигена. С использованием этого подхода получены гибридные белки, в которых в состав НВс антигена включены 1, 2 или 4 копии последовательности М2е пептида вируса гриппа. Установлено, что иммуногенность и протективное действие препаратов коррелируют с числом копий М2е. Установлено, что иммунизация мышей препаратами вирусоподобных частиц с 4 копиями М2е вызывает эффективный иммунный ответ против М2е, причем титр антител против М2е даже выше, чем против НВс носителя. Иммунизация мышей обеспечивала защиту от заражения штаммами вируса гриппа человека А/PR/8/34 (H1N1) и А/Аichi (H3N2) в дозе 5LD50 на уровне около 90%. Разработанная кандидатная противогриппозная вакцина прошла доклинические исследования в ФГБУ «НИИГриппа» Минздрава.

В рамках второго подхода использовали в качестве носителя эпитопов альфа-спиральные линкерные пептиды, способные к агрегации в растворе. Сконструированы химерные гены, кодирующие гибридные белки, содержащие четыре или восемь копий М2е пептида вируса гриппа и альфа-спиральные линкеры. Показано, что рекомбинантные белки, содержащие 4 повтора М2е пептида вируса гриппа и спиральные линкеры на N- и C-конце, образуют наночастицы размером 100-200нм, тогда как белки с 8 повторами и со спиральными линкерами на N- и C-конце - 80-140нм. Белки, содержащие 4 повтора М2е пептида вируса гриппа и спиральный линкер на N- конце, образуют частицы размером 40-100нм. Полученные наночастицы на основе рекомбинантных белков, состоящих из повторов М2е пептида вируса гриппа и спиральных линкеров, могут быть использованы в качестве основы новой рекомбинантной противогриппозной вакцины.

Публикации

1. Ravin NV, Blokhina EA, Kuprianov VV, Stepanova LA, Shaldjan AA, Kovaleva AA, Tsybalova LM, Skryabin KG. (2015) Development of a candidate influenza vaccine based on virus-like particles displaying influenza M2e peptide into the immunodominant loop region of hepatitis B core antigen: Insertion of multiple copies of M2e increases immunogenicity and protective efficiency. **Vaccine**. 33(29):3392-3397. (ИФ - 3.413)
2. Tsybalova LM, Stepanova LA, Kuprianov VV, Blokhina EA, Potapchuk MV, Korotkov AV, Gorshkov AN, Kasyanenko MA, Ravin NV, Kiselev OI. (2015) Development of a candidate influenza vaccine based on virus-like particles displaying influenza M2e peptide into the immunodominant region of hepatitis B core antigen: Broad protective efficacy of particles carrying four copies of M2e. **Vaccine**. 33(29):3398-3406. (ИФ - 3.413)
3. Stepanova LA, Kotlyarov RY, Kovaleva AA, Potapchuk MV, Korotkov AV, Sergeeva MV, Kasianenko MA, Kuprianov VV, Ravin NV, Tsybalova LM, Skryabin KG, Kiselev OI (2015) Protection against multiple influenza A virus strains induced by candidate recombinant vaccine based on heterologous M2e peptides linked to flagellin. **PLoS One**. 10(3): e0119520. (ИФ - 3,057).
4. Mardanova ES, Kotlyarov RY, Kuprianov VV, Stepanova LA, Tsybalova LM, Lomonosoff GP, Ravin NV. (2015) Rapid high-yield expression of a candidate influenza vaccine based on the ectodomain of M2 protein linked to flagellin in plants using viral vectors. **BMC Biotechnology**. 15: 42. (ИФ - 2.452)
5. Mardanova ES, Kotlyarov RY, Kuprianov VV, Stepanova LA, Tsybalova LM, Lomonosoff GP, Ravin NV. (2016) High immunogenicity of plant-produced candidate influenza vaccine based on the M2e peptide fused to flagellin. **Bioengineered**. 7(1):28-32. (ИФ - 1,87)

ОКИСЛЕНИЕ ЖЕЛЕЗА ПРИ БИОТРАНСФОРМАЦИИ БИОТИТА И ГЛАУКОНИТА ПОД ВОЗДЕЙСТВИЕМ АЛКАЛОФИЛЬНЫХ АНАЭРОБОВ

Заварзина Д.Г.¹, Чистякова Н.И.², Шапкин А.В.², Савенко А.В.³, Жилина Т.Н.¹, Кевбрин В.В.¹, Алексеева Т.В.⁴, Марданов А.В.⁵, Гаврилов С.Н.¹, Бычков А.Ю.³

¹ФИЦ Биотехнологии РАН, ИНМИ, Лаборатория реликтовых микробных сообществ

²МГУ им. М.В. Ломоносова, Физический факультет

³МГУ им. М.В. Ломоносова, Геологический факультет

⁴Институт физико-химических и биологических проблем почвоведения РАН

⁵ФИЦ Биотехнологии РАН, ИНБ

Две алкалофильные, анаэробные бактерии – диссимиляторная железоредуцирующая бактерия *Geoalkalibacter ferrihydriticus* и ферментативная целлюлозолитическая бактерия *Clostridium alkalicellulosi*, а также их бинарная культура, были исследованы на способность извлекать Si и Fe из железосодержащих слюд – биотита и глауконита. После 200 дней инкубации воздействие чистой культуры *C. alkalicellulosi* на оба минерала, не отличалось от такового для стерильного контроля. В случае присутствия *G. ferrihydriticus* в чистой культуре или в бинарной с *C. alkalicellulosi*, было зафиксировано увеличение растворимости минералов, сопровождающееся извлечением Si в раствор, а также образованием новой магнитоупорядоченной фазы, представляющей собой смесь магнетита и маггемита. При этом в чистой культуре, вместо ожидаемого окисления ацетата, добавленного в качестве донора электронов, *G. ferrihydriticus* дополнительно продуцировал около 3 mM ацетата. Анализ мессбауэровских спектров биотита и глауконита выявил, что образование магнитоупорядоченной фазы обусловлено не восстановлением атомов Fe³⁺, входящих в решетку минералов, но окислением атомов Fe²⁺. Единственным объяснением этого явления могла быть способность *G. ferrihydriticus* к гомоацетогенезу за счет окисления Fe²⁺ с участием карбоната в качестве акцептора электронов. Термодинамические расчеты подтвердили возможность этого процесса. Анализ генома *G. ferrihydriticus* показал присутствие генов, ответственных за окисление железа и ацетогенез. Таким образом, показано, что в щелочных условиях основную роль в выветривании силикатов играют микроорганизмы с хемолитотрофным типом метаболизма. Открыт новый процесс ацетогенеза за счет анаэробного окисления железа.

Публикация

Zavarzina D.G., Chistyakova N.I., Shapkin A.V., Savenko A.V., Zhilina T.N., Kevbrin V.V., Alekseeva T.V., Mardanov A.V., Gavrilov S.N., Bychkov A.Yu. Oxidative biotransformation of biotite and glauconite by alkaliphilic anaerobes: The effect of Fe oxidation on the weathering of phyllosilicates // **Chem. Geol.** 2016. V. 439. P. 98–109. (ИФ - 3,482).

МИКРОРНК И ГЕНЫ РЕГУЛЯТОРНЫХ БЕЛКОВ ПАРАЗИТИЧЕСКОГО РАСТЕНИЯ *MONOTROPA HYPOPITYS*

Скрябин К.Г., Щенникова А.В., Белецкий А.В., Шульга О.А., Мазур А.М., Прохорчук Е.Б., Кочиева Е.З., Равин Н.В.

ФИЦ Биотехнологии РАН, ИНБ, Лаборатория системной биологии растений, Лаборатория геномики и эпигеномики позвоночных

Подъельник *M. hypopitys* является уникальным представителем Цветковых семейства Ericaceae в составе базальной группы Asterids. Это – бесхлорофилльный микогетеротроф, который получает питательные вещества от корней автотрофных деревьев посредством микоризного симбиоза. Анализ библиотек малых РНК из разных тканей подъельника позволил идентифицировать и охарактеризовать консервативные микроРНК, их изоформы, новые микроРНК, а также мРНК-мишени консервативных и новых микроРНК. Анализ 6 транскриптомов из тканей корней, прицветников и цветков двух растений подъельника позволил выявить и охарактеризовать гены семейства LRR-RLK-киназ – ERECTA и GASSHO, гомеодомен-содержащих факторов транскрипции WOX, MADS-доменных факторов транскрипции, а также факторов транскрипции семейств YABBY и FLO/ LFY. Полученные данные позволят глубже понять эволюционные механизмы адаптации растений к неблагоприятным условиям (гетеротрофия, отсутствие фотосинтеза), а также физиологические особенности жизненного цикла микогетеротрофных растений.

Публикации

1. Shchennikova A.V., Beletsky A.V., Shulga O.A., Mazur A.M., Prokhortchouk E.B., Kochieva E.Z., Ravin N.V., Skryabin K.G. Deep-sequencing Profiling of miRNAs and Their Target Prediction in *Monotropa hypopitys*. **Plant Molecular Biology** (2016) 91(4-5):441-58. (ИФ - 3,905)
2. Щенникова А.В., Кочиева Е.З., Белецкий А.В., Филюшин М.А., Шульга О.А., Равин Н.В., Скрябин К.Г. Идентификация и характеристика кДНК гена рецепторной киназы ERECTA у микогетеротрофного растения *Monotropa hypopitys*. **Молекулярная биология** (июль 2017 г.) Принята в печать (ИФ – 0.612)
3. Щенникова А.В., Кочиева Е.З., Белецкий А.В., Филюшин М.А., Шульга О.А., Равин Н.В., Скрябин К.Г. Идентификация и характеристика мРНК генов рецептор-подобных киназ MhyGSO1 и MhyGSO2 в паразитическом растении *Monotropa hypopitys* на стадии цветения. **Вавиловский журнал генетики и селекции** (2017 г.). Принята в печать (ИФ – нет)
4. Щенникова А.В., Шульга О.А., Белецкий А.В., Филюшин М.А., Кочиева Е.З., Равин Н.В., Скрябин К.Г. Идентификация и характеристика кДНК гена идентичности цветковой меристемы MhyLFY у микогетеротрофного растения *Monotropa hypopitys*. **Доклады Академии Наук** (2017 г.) Принята в печать (ИФ – 0,234)
5. Щенникова А.В., Шульга О.А., Кочиева Е.З., Белецкий А.В., Филюшин М.А., Равин Н.В., Скрябин К.Г. Гомеобоксные гены факторов транскрипции WOX в цветущем паразитическом растении *Monotropa hypopitys*. **Вавиловский журнал генетики и селекции** (2017г.). Принята в печать (ИФ – нет)
6. A.V. Shchennikova, A.V. Beletsky, A.V. Mardanov, O.A. Shulga, E.Z. Kochieva, N.V. Ravin, K.G. Skryabin. Transcriptome-wide identification and characterization of the *Monotropa hypopitys* YABBY family. **Plant Cell Reports** (On the revision from November 2016).). (ИФ – 3.088)
7. O.A. Shulga, A.V. Shchennikova, A.V. Beletsky, A.V. Mardanov, E.Z. Kochieva, M.A. Filyushin, N.V. Ravin, K.G. Skryabin. Transcriptome-wide identification and characterization of the MADS-box family in *Monotropa hypopitys*. **Plant Cell Reports**. Принята в печать. (ИФ – 3.088).

БЕЛКИ СЕМЕЙСТВА VENT И ИХ МРНК ЛОКАЛИЗОВАНЫ В РАЗНЫХ УЧАСТКАХ ХВОСТОВ ЗАРОДЫШЕЙ *DANIO RERIA* И *XENOPUS LAEVIS*

Пшенникова Е.С. и Воронина А.С.

ФИЦ Биотехнологии РАН, ИНБИ, Лаборатория биохимии стрессов микроорганизмов

В молекулярной эмбриологии существует предубеждение, что наличие или отсутствие специфических мРНК в клетке указывает на наличие или отсутствие соответствующего белка. Тем не менее, есть много доказательств того, что мРНК могут быть ассоциированы с неактивными нетранслируемыми рибонуклеопротеидными комплексами. В нашей работе мы впервые сравнили пространственно-временные распределения транскрипционных факторов Vent-семейства и их мРНК в хвостах зародышей двух биологических видов—шпорцевой лягушки *Xenopus laevis* и рыбки *Danio rerio*. Мы показали, что *Xvent-2* мРНК не активна в хвостах эмбрионов *Xenopus* на стадии хвостовой почки. Было также показано методами whole-mount in situ гибридизации и иммуноокрашивания, что тогда как *Xvent-2* мРНК *Xenopus* и *vox* мРНК *Danio* были обнаружены в кончиках хвостов, белки *Xvent-2* и *vox* были выявлены в других областях хвостов—вдоль осевых структур и вокруг сомитов. Мы предполагаем, что при активации трансляции маскированных *Xvent-2* (или *vox*) мРНК в стволовых клетках хвостовой почки, этот транскрипционный фактор изменяет активности генов-мишеней, и в результате, клетка становится мобильной и переходит к дальнейшей дифференцировке.

Публикация

Pshennikova E.S., Voronina A.S. 2016. The proteins of Vent-family and their mRNAs are located in different areas of the tails of Zebrafish and *Xenopus* embryos. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology** 79 (2016) 388–392. (ИФ - 3,905)

НОВЫЕ ВЫСОКОЭФФЕКТИВНЫЕ АКТИВАТОРЫ ФАКТОРА ИНДУЦИРУЕМОГО ГИПОКСИЕЙ (HIF). МИШЕНИ, ЦИТОТОКСИЧНОСТЬ И МЕТАБОЛИЗМ В ГЕПАТОЦИТАХ ЧЕЛОВЕКА

Тишков В.И.^{1,2,3}, Полозников А.А.,^{4,5} Хушпульян Д.М.², Никулин С.В.⁴, Захарянц А.А.^{3,5},
Смирнова Н.А.⁴, Газарян И.Г.^{2,3,4}

¹Институт биохимии им. А.Н. Баха ФИЦ Биотехнологии РАН, ИНБИ, Лаборатория молекулярной инженерии

²МГУ имени М.В. Ломоносова, Химический факультет

³ООО "Инновации и высокие технологии МГУ"

⁴Федеральный научно-клинический центр детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Дмитрия Рогачёва

⁵ООО Научно-технический центр «БиоКлиникум», Москва

В условиях гипоксии (инсульт, инфаркт и т.д.) клетки вырабатывают специальный фактор HIF, который запускает синтез более 100 генов для ликвидации последствий гипоксии. Утилизация HIF в клетке происходит в результате сложного многостадийного процесса, запускаемого за счет гидроксирования остатка Pro564 HIF с помощью специального фермента HIF пролилгидроксилазы (HIFPH, 3 изофермента). Введение ингибиторов HIFPH позволяет снизить скорость деградации фактора и, таким образом, повысить общую активность. В настоящее время ведущие мировые фармацевтические и биотехнологические корпорации проводят поиск таких ингибиторов. Некоторые из них находятся на стадии клинических испытаний. Ранее с использованием репортерной линии клеток был проведен скрининг библиотеки разветвленных хинолонов были найдены два соединения (соединения 7 и 8), в присутствии нангомлярных концентраций которых наблюдалось увеличение активности HIF-фактора. В рамках данной работы были проведены следующие исследования

1. Клонированы нуклеотидные последовательности, кодирующие каталитические домены трех изоферментов пролилгидроксилазы, проведена их экспрессия в клетках *E.coli* в виде телец включения. Разработана методика рефолдинга и получена очищенная активная HIFPH2. Напрямую показано, что найденные соединения 7 и 8 являются ингибиторами пролилгидроксилазы.

2. Проведена оптимизация структуры соединений 7 и 8 и получены соединения с более высокой активностью.

3. Исследована гепатотоксичность соединений 7 и 8, и показано, что в случае соединения 7 токсичность отсутствуют вплоть до концентрации 200 мкМ, в то время как для соединения 8 наблюдается незначительная токсичность (оценочное значение LD50 составляет более 600±300 мкМ). Таким образом, оба препарата в диапазоне концентраций, превышающем более чем на порядок диапазон концентраций проявления биологической активности, являются нетоксичными для печени человека.

4. Разработана и оптимизирована панель субстрат-ингибитор для микробиореактора с микроциркуляцией – «печени на чине» - для доклинической оценки путей биотрансформации лекарственных соединений. Проведен выбор панели субстратов и ингибиторов цитохромов P450: на основании изучения литературных данных были отобраны следующие специфические пары субстрат-ингибитор: бупропион/2-фенил-2-(1-пиперидинил)пропан для оценки активности CYP2B6, толбутамид/сульфазолил для CYP2C9, омепразол/(+)-N-бензилпириванол для CYP2C19, тестостерон/кетоназол для CYP3A4. Оптимизированы концентрации субстратов и ингибиторов для обеспечения достоверной детекции основных метаболитов методом ВЭЖХ-масс-спектрометрии. Продемонстрирована специфичность выбранной панели к заданным формам цитохрома P450. Полученные результаты по взаимодействию лекарственных средств соответствуют литературным данным.

5. Проведена валидация разработанной панели субстратов и ингибиторов цитохромов P450 для доклинического исследования биотрансформации лекарственных средств *in vitro* на гистотипической трехмерной клеточной модели печени человека (КМПЧ), культивируемой в условиях микроциркуляции. Проведена экспериментальная оценка разработанной методики на примере двух тестовых лекарственных средств, варфарина и дазатиниба. Результаты по биотрансформации этих веществ клетками КМПЧ, культивируемыми в микробиореакторе, соответствуют ранее опубликованным данным по метаболизму этих препаратов *in vitro*: биотрансформация дазатиниба происходит с участием изоформы цитохрома P450 CYP3A4, а варфарина - CYP2C9. Показано также возможное лекарственное взаимодействие дазатиниба и варфарина с лекарствами, метаболизируемыми цитохромом CYP2C19.

6. Проведено тестирование новых кандидатов антигипоксических препаратов на разработанной панели субстрат-ингибитор и показано, что оба изучаемых препарата гидроксильруются цитохромами CYP2B6 и CYP3A4. На основе результатов апробации панели субстрат-ингибитор и при использовании программы ChemAxon Metabolite Predict, предложена схема биотрансформации.

Публикации

1. Хушпульян Д.М., Захарянц А.А., Смирнова Н.А., Мороз Н., Тишков В.И., Газарян И.Г. Реактивация из телец включения HIF пролилгидроксилазы 2, экспрессированной в клетках *E.coli*. **Известия Академии наук. Серия химическая**, 2015, т.64, № 7, с.1671-1677. (ИФ - 0.579)
2. Hushpulyan D.M., Zakharyants A.A., Smirnova N.A., Poloznikov A.A., Moroz N.A., Tishkov V.I., Gazaryan I.G. Reactivation of HIF prolyl hydroxylase 2 from *E.coli* **Известия РАН. Сер. химическая**, 2015, в.64, N 7, p.1671-1677. DOI 10.1007/s11172-015-1058-4. (ИФ - 0.579)
3. Полозников А.А., Смирнова Н.А., Христинченко А.Ю., Хушпульян Д.М., Никулин С.В., Тишков В.И., Гайсина И.Н., Газарян И.Г. Антиоксидантные и антигипоксические свойства нейропротекторных препаратов. **Известия Академии наук. Серия химическая**, 2016, т.65, №12, с.2970-2977. (ИФ - 0.579)
4. Smirnova N.A., Kaidery N.A., Hushpulyan D.M., Rakhman I.I., Poloznikov A.A., Tishkov V.I., Karuppagounder S.S., Gaisina I.N., Pekcec A., van Leyen K., Kazakov S.V., Yang L., Thomas B., Ratan R.R., Gazaryan I.G. Bioactive Flavonoids and Catechols as Hif1 and Nrf2 Protein Stabilizers – Implications for Parkinson’s Disease. **Aging and Disease**, 2016, v.7, N 6, p.745-762. February. DOI 10.14336/AD.2016.00505. (ИФ - 3.697)
5. Poloznikov A.A., Zakharyants A.A., Nikulin S.V., Smirnova N.A., Hushpulyan D.M., Gaisina I.N., Tonevitsky A.G., Tishkov V.I., Gazaryan I.G. Structure-activity relationship for branched oxyquinoline HIF activators: effect of modifications to phenylacetamide “tail”. **Biochimie Biochemie** 2017, v.133 (February 2017), p.74-79. DOI: 10.1016/j.biochi.2016.12.004. (ИФ – 2.474).

БИОДЕГРАДАЦИЯ НЕФТИ И ГЕНЫ ДЕГРАДАЦИИ *n*-АЛКАНОВ *alkB* И *ladA* У ТЕРМОФИЛЬНЫХ УГЛЕВОДОРОДОКИСЛЯЮЩИХ БАКТЕРИЙ РОДОВ *GEOBACILLUS* И *AERIBACILLUS*

Турова Т.П.¹, Соколова Д.Ш.¹, Семенова Е.М.¹, Коршунова А.В.², Груздев Д.С.³, Назина Т.Н.¹, Полтараус А.Б.²

¹ ФИЦ Биотехнологии РАН, ИНМИ, Лаборатория нефтяной микробиологии

² Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН

³ ФИЦ Биотехнологии РАН, ИНБ

Ранее на матрице ДНК термофильных бактерий рода *Geobacillus* с помощью ПЦР впервые были амплифицированы несколько различающихся последовательностей, гомологичных генам *alkB* – рубредоксин зависимой алкан-монооксигеназы, окисляющей *n*-алканы со средней длиной углеродной цепи. В ДНК разных штаммов геобацилл было выявлено от 3 до 7 гомологов, среди которых только 2 являлись универсальными для всех штаммов. Анализ последовательностей генов-гомологов *alkB* геобацилл выявил их сходство с генами *alkB*, обнаруженными ранее у некоторых штаммов родококков, что свидетельствует о том, что *alkB*-гены могли попасть в геном геобацилл путем межвидового горизонтального переноса. Для определения функциональной роли генов-гомологов у штамма *G. subterraneus* К была исследована транскрипция этих генов (образование мРНК гомологов *alkB*) в экспоненциальную и стационарную фазы роста культуры при 60°C при использовании *n*-алканов с разной длиной цепи (*n*-C₁₆ и *n*-C₂₂). Показано, что независимо от использованных субстратов, в экспоненциальную и стационарную фазу транскрибировались разные гены-гомологи *alkB*. Выявлена способность к деградации *n*-алканов нефти у новых штаммов *G. toebii* В-1024, *Aeribacillus pallidus* 8m3 и *Geobacillus* sp. 1017, выделенных из нефтяных пластов. Штамм В-1024 использовал наиболее широкий спектр *n*-алканов нефти, включая C₁₀–C₃₀ *n*-алканы, штамм 1017 использовал C_{10,11} и C₁₃–C_{19,22} *n*-алканы, а штамм 8m3 деградировал C₁₁–C₂₉ *n*-алканы. При проведении ПЦР-амплификации у этих штаммов был выявлен универсальный для геобацилл ген-гомолог *alkB-geol*. У штамма 1024 были амплифицированы также гены, гомологичные гену *ladA*, детерминирующему флаavin-зависимую алкан-монооксигеназу. Последовательности этих генов были практически идентичны последовательностям генов *ladA*□, *ladA*□ и *ladB*, впервые обнаруженным у штамма *G. thermoleovorans* В23, для которого была показана активность соответствующих ферментов при окислении длинноцепочечных *n*-алканов. Таким образом, впервые у ряда представителей родов *Aeribacillus* и *Geobacillus* было показано одновременное присутствие генов *alkB* и *ladAB*, кодирующих алкан-монооксигеназы, окисляющие *n*-алканы со средней длиной углеродной цепи и длинноцепочечные *n*-алканы, соответственно.

Публикации

1. Т. П. Турова, Д. Ш. Соколова, Е. М. Семенова, Е. С. Шумкова, А. В. Машукова, Т. Л. Бабич, А. В. Розанов, Т. Н. Назина, А. Б. Полтараус. Биодegradация нефти и гены деградации *n*-алканов *alkB* и *ladA* у термофильных углеводородоокисляющих бактерий родов *Aeribacillus* и *Geobacillus*. **Микробиология**, 2016, 86, 6, 676-692. (ИФ – 0,796)
2. Poltaraus AB, Sokolova DS, Grouzdev DS, Ivanov TM, Malakho SG, Korshunova AV, Rozanov AS, Tourova TP, Nazina TN. Draft Genome Sequence of *Aeribacillus pallidus* Strain 8m3, a Thermophilic Hydrocarbon-Oxidizing Bacterium Isolated from the Dagang Oil Field (China). **Genome Announc.** 2016;4(3). pii: e00500-16. (ИФ – нет)
3. Poltaraus AB, Sokolova DS, Grouzdev DS, Ivanov TM, Malakho SG, Korshunova AV, Tourova TP, Nazina TN. Draft Genome Sequence of *Geobacillus subterraneus* Strain K, a Hydrocarbon-Oxidizing Thermophilic Bacterium Isolated from a Petroleum Reservoir in Kazakhstan. **Genome Announc.** 2016;4(4). pii: e00782-16. (ИФ – нет)

Исследование выполнено при поддержке РФФ (грант № 16-14-00028) и РФФИ (грант №15-04-02622).

РАЗНООБРАЗИЕ АВТОТРОФНЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ В КАМЧАТСКИХ ГОРЯЧИХ ИСТОЧНИКАХ

Меркель А.Ю., Пименов Н.В., Русанов И.И., Слободкин А.И., Слободкина Г.Б., Тарновецкий И.Ю., Фролов Е.Н., Перевалова А.А., Бонч-Осмоловская Е.А.

ФИЦ Биотехнологии РАН, ИНМИ, Отдел биологии экстремофилов / Лаборатория разнообразия и экологии экстремофильных микроорганизмов

В нашей работе микробные сообщества горячих источников Камчатки были исследованы с применением молекулярных, радиоизотопных и культуральных подходов. Анализ фрагментов гена 16S рРНК, основанный на использовании технологий высокопроизводительного секвенирования, выявил, что аэробные сероокисляющие бактерии рода *Sulfurihydrogenibium* (филум *Aquificae*) доминировали в большинстве источников. Другой широко распространенной и многочисленной группой микроорганизмов в исследовавшихся микробных сообществах оказался род *Caldimicrobium* (филум *Thermodesulfobacteria*). Археи рода *Vulcanisaeta* были широко представлены в высокотемпературных источниках со значениями рН в кислой зоне, в которых им сопутствовали многочисленные наноархеи, тогда как в кислых источниках с умеренной температурой зачастую доминировали представители некультивируемого кластера архей «A10», относящегося к семейству *Thermoplasmataceae* (филум *Euryarchaeota*). Наиболее высокие темпы ассимиляции неорганического углерода, выявленные путем *in situ* инкубации образцов в присутствии ¹⁴С-меченого бикарбоната, были нами зафиксированы в присутствии кислорода, и лишь для двух образцов осадков было показано, что скорость этого процесса не зависит от кислорода. Использование культуральных методов позволило продемонстрировать широкое распространение в камчатских горячих источниках микроорганизмов, осуществляющих диспропорционирование соединений серы. Это новый литоавтотрофный процесс, способный питать автономные анаэробные экосистемы в биотопах, ассоциированных с геотермальной активностью.

Публикация

Merkel A.Yu., Pimenov N.V., Rusanov I.I., Slobodkin A.I., Slobodkina G.B., Dubin A.V., Tarnovetskii I.Yu., Frolov E.N., Perevalova A.A., Bonch-Osmolovskaya E.A. Microbial diversity and autotrophic activity in Kamchatka hot springs // **Extremophiles**. 2016. doi: 10.1007/s00792-016-0903-1. (ИФ - 2,346)

СТРУКТУРА, ФИЛОГЕНИЯ И ЭКСПРЕССИОННЫЕ ПАТТЕРНЫ НОВЫХ ГЕНОВ-ГОМОЛОГОВ УГЛЕВОДНОГО МЕТАБОЛИЗМА ДИКОРАСТУЩИХ И КУЛЬТИВИРУЕМЫХ ВИДОВ ТОМАТОВ (*SOLANUM SECTION LYCOPERSICON*)

Слугина М.А., Щенникова А.В., Кочиева Е.З.

ФИЦ Биотехнологии РАН, ИНБ, Лаборатория системной биологии растений/ Группа молекулярных методов анализа генома

Наиболее важными хозяйственно-ценными признаками такой культуры, как томат, являются размер плодов, сроки созревания и вкусовые качества, которые зависят от апопластической доставки углеводов в нефотосинтезирующие органы и их качественного и количественного состава. Одним из основных ферментов, участвующих в процессе доставки сахарозы в клетку по апопластическому пути во время развития плодов, являются инвертазы.

В настоящей работе определены полноразмерные последовательности генов - гомологов кислой апопластической инвертазы *LIN7* у диких и культивируемых видов томатов (*Solanum section Lycopersicon*). Идентифицированы 12 новых генов-гомологов. Все гены состояли из шести экзонов и пяти интронов и включали высоко консервативный экзон 2, состоящий из 9 пн. Помимо интронного полиморфизма, выявлен высокий уровень полиморфизма в экзонах (226 SNPs, 7.89%), что указывает на сильную межвидовую дивергенцию тестируемых видов томатов. Определены экспрессионные паттерны гомологичных генов *LIN7*. Показана специфичность экспрессии в зрелых плодах и цветках, что указывает на важную роль данного гена в формировании плодов томатов. Биоинформатическое прогнозирование выявило первичную, вторичную и третичную структуру, характерную для семейства белков инвертаз, и показано наличие у них консервативных каталитических сайтов, описанных ранее. Показана возможность использования генов-гомологов *LIN7* для установления филогении представителей секции *Lycopersicon* рода *Solanum*. С большой достоверностью все исследованные виды томатов сформировали два кластера, соответствующие самоопыляемым и перекрестноопыляемым, а также красноплодным и зеленоплодным видам. Найденные вариабельные сайты, различия в уровнях экспрессии у отдельных видов томатов, наряду с выявленными радикальными замещениями аминокислот, могут быть причиной функциональных различий в работе кислых инвертаз. Характеристика аминокислотной вариабельности кислых инвертаз различных представителей секции *Lycopersicon* может быть полезна для оценки генетического потенциала генов-гомологов и будет использоваться в селекции новых сортов томата, так как *LIN7* имеет существенное значение для процесса закладки и развития плодов.

Публикации

1. М. А. Слугина, Е. А. Снигирь, Н. Н. Рыжова, Е. З. Кочиева “Структура и полиморфизм фрагмента локуса *Pain-1*, кодирующего вакуолярную инвертазу видов *Solanum*” - **Молекулярная биология**, 2013, Том. 47, N. 2, стр. 215–221. (ИФ – 0.612)
 2. М. А. Слугина, И.А. Храпалова, Н. Н. Рыжова, Е. З. Кочиева, академик К.Г. Скрябин “Полиморфизм гена инвертазы *Pain-1* у представителей рода *Solanum*” - **Доклады Академии Наук**, 2014. Том. 454, N. 1, стр. 1–3. (ИФ – 0,234)
- М.А. Слугина, Е.З. Кочиева «Вариабельность фрагмента кислой вакуолярной инвертазы *Pain-1* у сортов картофеля» - **Вавиловский журнал генетики и селекции**, 2014, том 18, №4/1. (ИФ – нет)

МЕМБРАНОСВЯЗАННЫЙ ГЕМОГЛОБИН КАК ИНДИКАТОР ФУНКЦИОНАЛЬНОГО СОСТОЯНИЯ ЭРИТРОЦИТОВ: ОПРЕДЕЛЕНИЕ, ИСПОЛЬЗОВАНИЕ В ДИАГНОСТИКЕ

Насыбуллина Э.И.¹, Космачевская О.В.¹, Шумаев К.Б.¹, Никитаев В.Г.², Проничев А.И.², Блиндарь В.Н.³, Топунов А.Ф.¹

¹ФИЦ Биотехнологии РАН, ИНБИ, Лаборатория биохимии азотфиксации и метаболизма азота

²Национальный исследовательский ядерный университет "МИФИ"

³Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина

Многие болезни системы крови связаны с дисфункцией эритроцитов, вызванной повышенным уровнем реакционно-активных метаболитов в плазме крови вследствие развития воспалительных процессов, гипергликемии (карбонильный стресс) и хронической почечной недостаточности. Ключевым белком для поддержания структуры цитоскелета эритроцита является трансмембранный белок полосы 3 (CDB3). Сорбция/десорбция белков с CDB3 является механизмом, регулирующим энергетический и ионный метаболизм, структуру цитоскелета и время жизни эритроцита. Важным компонентом такой регуляции является гемоглобин (Hb). Переход Hb из растворимого в мембраносвязанное состояние (MBHb) в некоторых случаях может носить и патологическую направленность. Определение уровня MBHb имеет практическое значение для диагностики болезней крови или состояния хронической эндогенной интоксикации.

Нами разработана простая и чувствительная методика, позволяющая обнаруживать <0,1% MBHb, основанная на определении связанного с теньями эритроцитов Hb после солубилизации мембран в щелочном растворе пиридина. Методика была проверена в экспериментах с суспензией эритроцитов и на крови пациентов с железодефицитной анемией и анемиями при различных заболеваниях. Установлен диапазон нормальных значений для MBHb: 3,3%–4,9%. У онкологических больных, получавших химиотерапию, несоответствие норме уровня MBHb было у 61% пациентов, в контрольной группе — у 37% обследованных. Установлены диапазоны величин [MBHb], соответствующие повышенной устойчивости эритроцитов к окислительному гемолизу.

Совместно с кафедрой компьютерных медицинских систем НИЯУ МИФИ и клинико-диагностической лабораторией Российского онкологического научного центра разработана пилотная версия компьютерной экспертной системы (ЭС) «BLOOD» для диагностики анемий и гемоглобинопатий. Структура ЭС включает четыре блока: модель базы знаний, механизм принятия решений, механизмы ввода и вывода данных. ЭС дает возможность работы с базой знаний: просмотр, редактирование, добавление новых элементов, проведение сравнительного анализа и статистическую постановку диагноза. Для проверки ЭС были использованы данные о 350 пациентах Онкоцентра. Показано, что система в полной мере реализует все заявленные функции и в большинстве случаев верно определяет диагноз. ЭС может также учитывать новый для гематологического анализа показатель — содержание мембраносвязанного гемоглобина.

Публикации

1. Насыбуллина Э.И., Никитаев В.Г., Проничев А.И., Блиндарь В.Н., Космачевская О.В., Топунов А.Ф. Экспертная система диагностики гемоглобинопатий с использованием данных о состоянии крови, эритроцитов и гемоглобина. // **Краткие сообщения по физике**. 2015. Т. 42. № 7. С. 22-27. (*Bulletin of the Lebedev Physics Institute*. 2015. V. 42. N 7. P. 206-208. doi: 10.3103/S1068335615070039.) (ИФ - 0,326)
2. Космачевская О.В., Шумаев К.Б., Топунов А.Ф. Сигнальное и регуляторное действие метилглиоксаля в эукариотических клетках. // **Прикладная биохимия и микробиология**. 2017. Т. 53. № 3 (принято к печати). (ИФ - 0,671)

МИКРОБНЫЕ ПРОЦЕССЫ ЦИКЛОВ УГЛЕРОДА И СЕРЫ В ПРЕСНОВОДНОМ МЕРОМИКТИЧЕСКОМ ОЗЕРЕ СВЕТЛОЕ (АРХАНГЕЛЬСКАЯ ОБЛАСТЬ)

Саввичев А.С.¹, Кокрятская Н.М.², Забелина С.А.², Русанов И.И.¹, Захарова Е.Е.¹, Веслополова Е.Ф.¹, Лунина О. Н.¹, Патутина Е.О.³, Бумажкин Б.К.³, Груздев Д. С.³, Сигалевич П.А.¹, Пименов Н.В.¹, Кузнецов Б.Б.³, Горленко В.М.¹

¹ФИЦ Биотехнологии РАН, ИНМИ, Лаборатория микробиологии и биогеохимия водоемов

²Институт экологических проблем Севера УрО РАН, г. Архангельск

³ФИЦ Биотехнологии РАН, ИНБ

В апреле 2014 г проведены биогеохимические, изотопно-геохимические и микробиологические исследования пресноводного меромиктического оз. Светлое, принадлежащего к бассейну Белого моря. В период проведения исследований толщина льда была около 0.5 метра, подледный слой воды содержал кислород до глубины 23 м. В придонном слое обнаружено значительное количество солей железа (до 240 μM), марганца (до 60 μM), сульфида (2 μM), а также растворенного метана (30 мМ). Значительное количество закисного железа в анаэробной зоне монимолимниона, позволяет рассматривать оз. Светлое в как аналог Поздне-Архейского Океана. Максимум численности микроорганизмов приходился на зону хемоклина (ред-окс зону) в интервале глубин 23-24.5 м. По результатам клонирования ПЦР-фрагментов генов, кодирующих 16S рРНК, в воде хемоклина (металимниона) оз. Светлое выявлено значительное разнообразие фило типов, относящихся к альфа-, бета-, гамма- и дельта-*Proteobacteria*, *Chlorobi*, *Cyanobacteria*, *Bacteroides* и *Actinobacteria*. Пик оксигенного фотосинтеза ($0.43 \mu\text{M C л}^{-1} \text{сут}^{-1}$) находился непосредственно подо льдом в зоне концентрации цианобактерий, филогенетически близких к *Synechococcus rubescens*. Максимум аноксигенного фотосинтеза на границе анаэробной зоны превышал оксигенный и составил $0.69 \mu\text{M C л}^{-1} \text{сут}^{-1}$. Бактериальная сульфатредукция имела максимальную интенсивность ниже зоны хемоклина ($1.5 \mu\text{M S л}^{-1} \text{сут}^{-1}$). Радиоизотопным методом зарегистрировано окисление метана (до $3.4 \mu\text{M CH}_4 \text{ л}^{-1} \text{сут}^{-1}$) как в аэробной зоне, так и в бескислородных слоях монимолимниона. В хемоклине обнаружено большое количество психрофильных аэробных видов метанотрофных бактерий рода *Methylobacter* и метилотрофных бактерий рода *Methylotenera*. Предполагается участие закисного железа в анаэробном окислении метана в монимолимнионе. Микроскопический контроль воды с глубин 23 и 24 метров выявил скопление мелких клеток, окруженных оксидами железа и марганца. В аккумуляции оксидов металлов в ред-окс зоне озера Светлое принимали участие мелкие фикоэритрин-содержащие цианобактерии рода *Synechococcus*. Предполагается участие аноксигенных фототрофных бактерий филума *Chlorobi* в окислении Fe(2).

Публикация

Savvichev A., Kokryatskaya N., Zabelina S. Rusanov I., Zakharova E., Veslopolova E., Lunina O., Patutina E., Bumazhkin B., Gruzdev D., Sigalevich P., Pimenov N., Kuznetsov B., and Gorlenko V. Microbial processes of the carbon and sulfur cycles in an ice-covered, iron-rich meromictic lake Svetloe (Arkhangelsk oblast, Russia) // **Environmental Microbiology**. Version of Record online: 8 DEC 2016 DOI: 10.1111/1462-2920.13591. (ИФ - 5,932)

ИЗУЧЕНИЕ АГРЕГАЦИИ МНОГОКОМПОНЕНТНЫХ МЕЖМОЛЕКУЛЯРНЫХ КОНЪЮГАТОВ МЕТОДОМ ПРОТОЧНОГО ФРАКЦИОНИРОВАНИЯ В ПОПЕРЕЧНОМ ПОЛЕ

Сафенкова И.В., Панферов В.Г., Самохвалов А.В., Слуцкая Э.С., Жердев А.В., Дзантиев Б.Б.
ФИЦ Биотехнологии РАН, ИНБИ, Лаборатория иммунобиохимии

Межмолекулярные конъюгаты активно используются в биоаналитических системах и биосенсорах. Их функциональные характеристики в существенной степени зависят от состава, структуры, степени агрегации, причем получаемые препараты конъюгатов могут быть крайне гетерогенными по этим характеристикам. В этой связи крайне востребованы методы, позволяющие фракционировать и дифференцированно характеризовать компоненты нано- и субмикрометровых размеров. В работе для характеристики компонентов иммуноаналитических систем использован метод проточного фракционирования в поперечном поле (ПФПП). Проведено фракционирование межмолекулярных конъюгатов наночастицы золота (НЗ) – антитела и олигонуклеотиды - белки в соответствии с их размерами с использованием системы ПФПП Eclipse 3+ (Wyatt Technology, США), последовательно соединенной со спектрофотометрическим детектором (Agilent Technologies, США), детектором многоугольного рассеяния света Dawn HELEOS II, вискозиметром ViscoStar II и рефрактометром OptilabT-Rex (Wyatt Technology, США).

Конъюгаты НЗ со специфическими антителами являются основным компонентом при проведении иммунохроматографического анализа. Однако разработка мультианалитических систем сопровождается повышением концентрации конъюгатов и использованием нескольких видов конъюгатов одновременно, что требует оценки стабильности и степени агрегации сложных препаратов. Смесь восьми конъюгатов антител разной специфичности и НЗ с диаметром $15,3 \pm 1,2$ нм характеризовали при разных концентрациях (от 23 до 184 нМ) и при добавлении стабилизирующих компонентов. Для пиков на фрактограммах, полученных методом ПФПП, были определены радиусы гирации (R_g) и гидродинамические радиусы (R_h). Установлено, что пик на фрактограмме, соответствующий конъюгатам, включает две популяции: (1) с постоянным радиусом: $R_g = 9,9 \pm 0,9$ нм; $R_h = 14,3 \pm 0,5$ нм; и (2) с увеличенным радиусом от 9,9 до 24,4 нм для R_g и от 14,3 до 28,1 нм для R_h . Варьирование концентраций конъюгатов в диапазоне от 23 до 184 нМ не вызывало достоверных изменений степени агрегации. Полученные результаты позволяют контролировать комплектацию разрабатываемых мультианалитических систем и обеспечивать высокую чувствительность детекции. [1]

Размеры специфических комплексов являются важной характеристикой для поляризационного флуоресцентного анализа (ПФА), основанного на отличиях комплексов разных размеров по степени деполаризации флуоресценции, индуцированной плоскополяризованным возбуждающим светом. Для усиления сигнала в ПФА с аптамерным рецептором проведена теоретическая оценка влияния размеров рецептора, образующего комплекс, на поляризацию флуоресценции. В соответствии с результатами анализа модели было предложено увеличить размеры аптамерного рецептора посредством конъюгации с белковыми якорными модулями. С этой целью были синтезированы конъюгаты аптамера, специфичного к охратоксину А, со стрептавидином и иммуноглобулинами G (IgG) в разных соотношениях. Гидродинамические размеры конъюгатов были определены после фракционирования методом ПФПП, функциональную характеристику конъюгатов проводили методом ПФА. Подтверждена эффективность использования белковых якорных модулей, размеры которых контролируются методом ПФПП, для повышения чувствительности ПФА. Использование комплекса аптамер–стрептавидин–IgG позволило снизить предел обнаружения в 40 раз по сравнению с традиционным форматом анализа, основанным на применении нативного аптамера, и достоверно выявлять охратоксин А в пробах белого вина в концентрациях до 2,8 нМ (1,1 мкг/кг), что ниже нормативных требований РФ и ЕС (2–5 мкг/кг). [2]

Результаты работы показывают, что метод ПФПП позволяет характеризовать гетерогенные препараты биополимеров, наночастиц и их комплексов и может применяться для решения широкого ряда задач.

Публикации

1. Safenkova I.V., Slutskaia E.S., Panferov V.G., Zherdev A.V., Dzantiev B.B. Complex analysis of concentrated antibody-gold nanoparticle conjugates' mixtures using asymmetric flow field-flow fractionation. **Journal of Chromatography A**. 2016, v. 1477, p. 56-63. (ИФ - 3,926)
2. Samokhvalov A.V., Safenkova I.V., Eremin S.A., Zherdev A.V., Dzantiev B.B. Use of anchor protein modules in fluorescence polarisation aptamer assay for ochratoxin A determination, **Analytica Chimica Acta**. 2017. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aca.2017.01.024> (ИФ - 4,712)

НЕКОТОРЫЕ АСПЕКТЫ АДАПТАЦИИ ЭКСТРЕМОФИЛЬНЫХ ДРОЖЖЕЙ *YARROWIA LIPOLYTICA* К ЭКСТРЕМАЛЬНЫМ pH

Секова В.Ю.¹, Гесслер Н.Н.¹, Исакова Е.П.¹, Антипов А.Н.¹, Дергачева Д.И.², Дерябина Ю.И.¹, Куланбаева Ф.Ф.^{1,3}, Трубникова Е.В.⁴, Николаев А.В.⁵

¹ ФИЦ «Биотехнологии РАН», ИНБИ, Лаборатория экологической и эволюционной биохимии

² Московский государственный университет тонких химических технологий имени М. В. Ломоносова

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

⁴ Курский государственный университет

⁵ Институт физики Земли им. О.Ю. Шмидта РАН

Исследованы изменения активности ферментов антиоксидантной защиты (супероксиддисмутаза, и каталаза), а также уровня активных форм кислорода в дрожжевых клетках *Yarrowia lipolytica* W29 при культивировании на средах с различными значениями pH (4.5, 5.5 и 9.0). Показано, что увеличение уровня активных форм кислорода в клетках происходило как в кислых, так и в щелочных условиях. Рост клеток в экстремальных условиях сопровождался значительным увеличением активности СОД (в 2.5 раза в кислых и в 4 раза в щелочных условиях), при стабильной активности каталазы. Изучение электрофоретического профиля каталазы показало присутствие трех изоформ, различающихся по устойчивости к ингибиторам этих ферментов. Электрофоретический профиль СОД и ингибиторный анализ выявил, наряду с присутствием Cu, Zn-СОД, наличие двух других форм, предположительно митохондриального происхождения. Обсуждается роль СОД в pH-адаптации экстремофильных дрожжей *Y. lipolytica*. Возрастание активностей антиоксидантных ферментов при экстремальных значениях pH сопровождалось индукцией гена *POR1*, кодирующего белок внешней митохондриальной мембраны порин (VDAC), используемый в качестве промотора в составе генетической конструкции pUVLT2, введенной в штамм *Y. lipolytica* W29. Получена характеристика промотора гена митохондриального порина VDAC, показана его высокая индуцибельность в присутствии экзогенных прооксидантов и щелочных значений pH (pH 9,0). Разработаны рекомендации к использованию нового промотора в составе новых генетических конструкций как в фундаментальных исследованиях для оценки адаптивной стратегии низших эукариот в неблагоприятных условиях, так и при конструировании на его основе новых высококонкурентных трансформантов-продуцентов экономически важных соединений (белков, липидов, органических кислот).

Публикации

1. Секова В. Ю., Гесслер Н. Н., Исакова Е. П., Антипов А. Н., Дергачева Д. И., Дерябина Ю. И., Трубникова Е. В. Окислительно-восстановительный статус экстремофильных дрожжей *Yarrowia lipolytica* при адаптации к pH стрессу. **Прикладная биохимия и микробиология**, 2015, том 51, № 6, с. 1–8. (ИФ - 0,671)
2. Куланбаева Ф. Ф., Секова В. Ю., Исакова Е. П., Дерябина Ю. И., член-корреспондент РАН Николаев А. В. Новый эффективный промотор гена митохондриального потенциалзависимого порина VDAC в геноме дрожжей *Yarrowia lipolytica*. **Доклады Академии наук**, 2016, том 470, № 4, с. 475–478. (ИФ – 0,394)

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ИНДУЦИБЕЛЬНОГО ПРОМОТОРА ГЕНА ГЛЮКОАМИЛАЗЫ *PENICILLIUM VERRUCULOSUM* ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ ФЕРМЕНТНЫХ ПРЕПАРАТОВ ЦЕЛЛЮЛАЗ С УВЕЛИЧЕННОЙ ГИДРОЛИТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТЬЮ, СОДЕРЖАЩИХ ГЕТЕРОЛОГИЧНЫЕ В-ГЛЮКОЗИДАЗУ И ПОЛИСАХАРИДМОНООКСИГЕНАЗУ

Булахов А.Г.¹, Волков П.В.¹, Рожкова А.М.¹, Гусаков А.В.^{1,2}, Шашков И.А.¹, Сатрутдинов А.Д.¹, Синецын А.П.^{1,2}

¹ ФИЦ Биотехнологии РАН, ИНБИ, Лаборатория биотехнологии ферментов

² МГУ имени М.В. Ломоносова, Химический факультет

Микроскопический гриб рода *P. verruculosum* является высокоактивным продуцентом комплекса целлюлолитических ферментов. Одним из подходов для увеличения эффективности действия целлюлаз при гидролизе целлюлозосодержащих материалов является обогащение ферментного комплекса β-глюкозидазой (β-ГЛ) и/или литической полисахаридмонооксигеназой (ЛПМО), проявляющими синергизм с основными ферментами целлюлазного комплекса (целлобиогидролазами и эндоглюканазами).

Ген *bglI*, кодирующей β-Гл из *Aspergillus niger*, и ген *egIV*, кодирующий ЛПМО (ранее эндоглюканаза IV) *Trichoderma reesei*, были клонированы и экспрессированы в реципиентном штамме *P. verruculosum* В1-537 под контролем индуцибельного промотора гена глюкоамилазы *glal*. Содержание гетерологичной β-Гл в составе секретируемого ферментного комплекса варьировало от 4 до 10% от общего пула белка, а содержание ЛПМО составляло около 3%. Глубина конверсии микрокристаллической целлюлозы (МКЦ) и измельченной осиновой древесины до глюкозы ферментными препаратами (ФП), полученными с помощью рекомбинантных штаммов *P. verruculosum* – продуцентов β-Гл, увеличивалась до 99 и 80%, соответственно, относительно контроля, когда использовали ФП, полученный с помощью реципиентного штамма В1-537 (дозировка ФП – 5 мг белка на 1 г субстрата, 48 часов гидролиза). ФП, содержащий гетерологичную ЛПМО, обеспечивал увеличение глубины конверсии измельченной осиновой древесины на 10-43% по сравнению с контрольным ФП, однако при гидролизе МКЦ рекомбинантный ФП с ЛПМО был менее эффективен, чем контрольный. Следует отметить, что максимальная глубина конверсии измельченной осиновой древесины была получена при совместном использовании рекомбинантных ФП, содержащих β-Гл и ЛПМО в соотношении 1:1.

Публикации

1. Bulakhov A.G., Volkov P.V., Rozhkova A.M., Gusakov A.V., Nemashkalov V.A., Sinityn A.P. Using an inducible promoter of a gene encoding *Penicillium verruculosum* glucoamylase for production of enzyme preparations with enhanced cellulase performance. **PLOS ONE**, 017 Jan 20;12(1):e0170404. doi: 10.1371/journal.pone.0170404 . eCollection 2017 (ИФ - 3,057)
2. Булахов А.Г., Гусаков А.В., Чекушина А.В., Сатрутдинов А.Д., Кошелев А.В., Матыс В.Ю., Синецын А.П. Получение гомогенных полисахаридмонооксигеназ и изучение их синергизма с целлюлазами при действии на целлюлозу. **Биохимия**, 2016, т.81, вып.5, с.702-711. (ИФ - 1,421)

ФУНКЦИОНАЛЬНОЕ РАЗНООБРАЗИЕ И АКТИВНОСТЬ ХЕМОТРОФНЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ В ЭКСТРЕМАЛЬНЫХ ЭКОСИСТЕМАХ НА ПРИМЕРЕ ГАЛОАРХЕЙ И СЕРООКИСЛЯЮЩИХ БАКТЕРИЙ

Сорокин Д.Ю.¹, Дубинина Г.А.¹, Хижняк Т.В.¹, Грабович М.Ю.², Фоменков А.², Орлова М.², Белоусова Е.², Тарлачков С.³, Тощаков С.⁴, Ferrer M.⁵, Smedile F.⁶, La Cono V.⁶, Arcadi E.⁶, La Spad G.⁶, Messina E.⁶, Yakimov M.⁶, Golyshin P.⁷, Roman P.⁸, Tutukina M.⁹, Lopatina A.¹⁰, Vincze T.¹¹, Anton B.¹¹, Roberts R.J.¹¹, Rojo D.¹², Slepak V.¹³, Rijpstra W.¹⁴, Sinninghe Damste J.¹⁵,

1 ФИЦ Биотехнологии РАН, ИХМИ, Лаборатория экологии и геохимической деятельности

2 Воронежский ГУ,

3 Институт биохимии и физиологии микроорганизмов РАН,

4 БФУ им. И. Канта,

5 Institute of Catalysis, CSIC, Madrid, Spain,

6 Institute for Coastal Marine Environment, CNR, Italy,

7 School of Biological Sciences, Bangor University, Gwynedd, UK,

8 Sub-department of Environmental Technology, Wageningen University, Wageningen, The Netherlands,

9 Institute of Cell Biophysic RAS.,

10 Институт молекулярной генетики РАН и Институт молекулярной биологии РАН

11 New England Biolabs, Ipswich, Massachusetts, USA,

12 Center for Metabolomics and Bioanalysis, Faculty of Pharmacy, CEU San Pablo University, Spain,

13 Department of Molecular and Cellular Pharmacology, University of Miami Miller School of Medicine, USA,

14 NIOZ Royal Netherlands Institute for Sea Research, Department and Utrecht University, The Netherlands,

15 Department of Earth Sciences, Utrecht University, Utrecht, The Netherlands

Из анаэробных осадков гиперсоленых хлоридно-сульфатных озер Алтайского края и юга России выделено 6 чистых культур экстремально галофильных облигатно анаэробных галоархей, способных к росту за счет окисления формиата или водорода в присутствии серы, тиосульфата и ДМСО в качестве акцепторов электронов. Это является **первым примером литогетеротрофного роста у галоархей**. Проведены геномные и протеомные исследования. Обнаруженная нами первая группа анаэробных серозависимых литогетеротрофных галоархей позволяет по новому взглянуть на физиологию и эволюцию экстремально галофильных эвриархеот.

Комплексное использование геномного анализа и физиологических и молекулярно-биохимических исследований *A. thiophilum* и "*Thioflexothrix psekipisii*" позволило выявить и расшифровать неизвестные ранее аспекты их метаболизма. Оказалось, что соединения серы могут выполнять двоякую функцию – в качестве доноров или акцепторов электронов в зависимости от ростовых условий. Полученные результаты позволили объяснить большие адаптационные возможности исследованных серобактерий и высокую устойчивость к неравновесным физико-химическим условиям среды обитания в минеральных сульфидных источниках с нестабильным O₂-H₂S режимом. Выявленные механизмы адаптационной устойчивости к неблагоприятным факторам среды могут быть присущи многим представителям подобных местообитаний.

Публикации

1. Sorokin D.Y., Kublanov I.V., Gavrillov S.N., Rojo D., Roman P., Golyshin P.N., Slepak V.Z., Smedile F., Ferrer M., Messina E., La Cono V., Yakimov M.M. (2016). Elemental sulfur and acetate can support life of a novel strictly anaerobic haloarchaeon. **The ISME Journal** 10: 240-252. (ИФ - 9,328)
2. Sorokin D.Y., Kublanov I.V., Yakimov M., Rijpstra W.I.C., Sinninghe Damsté J.S. (2016). Halanaeroarchaeum sulfurireducens gen. nov., sp. nov., a first obligately anaerobic sulfur-respiring haloarchaeon from hypersaline lakes. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology** 66: 2377-2381. (ИФ - 2,439)
3. Messina E., Sorokin D.Y., Kublanov I.V., Toshchakov S., Lopatina A., Arcadi E., Smedile F., La Spad G., La Cono V., Yakimov M.M. (2016). Complete genome sequence of Halanaeroarchaeum sulfurireducens M27-SA2, a sulfur-reducing and acetate-oxidizing haloarchaeon from the deep-sea hypersaline anoxic lake Medee. **Standards in Genomic Sciences** 11:35 (ИФ - 1,594)
4. Sorokin D.Y., Messina E., Smedile F., Roman P., Sinninghe Damste J.S., Ciordia S., del Carmen Mena M., Ferrer M., Golyshin P.N., Kublanov I.V., Samarov N.I., Toshchakov S.V., La Cono V., Yakimov M.M. (2017). Discovery of the anaerobic lithoheterotrophic haloarchaea, ubiquitous in hypersaline habitats. **The ISME Journal** 11: XXXX: (ИФ - 9,328)
5. Fomenkov A., Vincze T., Grabovich M., Anton B.P., Dubinina G., Orlova M., Belousova E., Roberts R.J. Complete genome sequence of a strain of Azospirillum thiophilum isolated from a sulfide spring. **Genome Announc.** 2016. 4(1). pii: e01521-15. (ИФ – нет)
6. Orlova M.V., Tarlachkov S.V., Dubinina G.A., Belousova E.V., Tutukina M.N., Grabovich M.Y. Genomic insights into metabolic versatility of a lithotrophic sulfur-oxidizing diazotrophic Alphaproteobacterium Azospirillum thiophilum // **FEMS Microbiol Ecol.** 2016. 92(12): fiw199 (ИФ – 3,53)

ПОЛУЧЕНИЕ АЛКИЛИРОВАННЫХ ПРОИЗВОДНЫХ ХИТОЗАНА И ИССЛЕДОВАНИЕ ИХ БИОЛОГИЧЕСКИХ СВОЙСТВ

Шагдарова Б.Ц.¹, Ильина А.В.¹, Зубарева А.А.¹, Дрозд Н.Н.², Свирщевская Е.В.³, Варламов В.П.¹

¹ФИЦ Биотехнологии РАН, ИНБ, Лаборатория инженерии биополимеров

²Гематологический научный центр МЗ РФ, Лаборатория патологии и фармакологии гемостаза

³Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Лаборатория клеточных взаимодействий

Целью работы является получение алкилированных производных низкомолекулярного хитозана, изучение их свойств и возможности применения в биомедицине. Использование хитозана в различных областях резко ограничивает плохая растворимость полимера при нейтральных и щелочных значениях pH, а также высокая вязкость растворов. Для решения этой проблемы первоначально методом химической деполимеризации получен низкомолекулярный хитозан с молекулярной массой (ММ) 20 кДа, степенью деацетилирования (СД) 98%, индексом полидисперсности 1.4, растворимый при pH 5.0. Для расширения диапазона растворимости от pH 3.5 до 9.5 и увеличения положительного заряда низкомолекулярный хитозан алкилировали глицидилтриметиламмоний хлоридом в оптимально подобранных условиях. Синтезирован ряд кватернизированных производных (КвХ) со степенью замещения (СЗ) 9, 40, 58, 98 % и растворимостью от 2 до ≥ 100 мг/мл при pH 7.0.

Увеличение суммарного положительного заряда за счёт четвертичных аммониевых групп в молекуле хитозана способствовало росту антибактериального действия на клетки микроорганизмов. Рост СЗ от 9 до 98% способствовал снижению минимальной ингибирующей концентрации (МИК) более чем на порядок и на два порядка по сравнению с исходным хитозаном 20 кДа, СД 98%. На основе производного КвХ40 были получены конъюгаты с антимикробными катионными пептидами варнерином и мелиттином. В качестве сшивающего агента использовали ферментный препарат трансклутаминазы. Выявлен синергизм их антибактериального действия.

Исследовали взаимодействие алкилированных производных хитозана (КвХ9 – КвХ98) с эукариотическими клетками. В тестах *in vitro* и методом проточной цитометрии показано, что токсичность имела дозозависимый характер и увеличивалась с ростом СЗ. Тогда как эффективность проникновения кватернизированных производных в клетку существенно возрастала с ростом СЗ, и составляла 20 и 55% для КвХ9 и КвХ98, что является предпосылкой для использования таких производных в качестве систем доставки терапевтических средств.

Использование различных полимеров в области биомедицины в основном подразумевает их контакт с кровью. Изучено влияние КвХ на клетки крови - тромбоциты, эритроциты. В используемых концентрациях они не агрегировали тромбоциты и не приводили к гемолизу. Растворимые при pH 7.2-7.4, обладающие антибактериальным действием и большим положительным зарядом производные КвХ, в перспективе можно использовать для нейтрализации антикоагулянтной активности гепарина (НФГ). Для этой цели в настоящее время используют сульфат протамина (СПТ), который приводит к побочным эффектам, вплоть до летального исхода. Исследования *in vitro* по оценке прокоагулянтного действия (появление фибринового сгустка), показали что, КвХ98 так же, как и СПТ, эффективно нейтрализовало антитромбиновую активность НФГ. Так, для полной нейтрализации 0.143 аПа ед./мл НФГ требовалось 0.0014 мг/мл производного КвХ98. Исследовали нейтрализацию производным КвХ98 антикоагулянтной активности плазмы морских свинок после внутривенного введения НФГ. Выявлено, что он эффективно, как и СПТ, нейтрализует антитромбиновую активность НФГ. Таким образом, показано, что производное КвХ98 может быть перспективным биосовместимым полимером для использования его в качестве нового антидота гепарина.

Публикации

- Шагдарова Б.Ц., Ильина А.В., Варламов В.П. Антибактериальная активность алкилированных, ацилированных производных низкомолекулярного хитозана // **Прикладная биохимия и микробиология**. 2016. Т.52. №2, с 237-241. (ИФ - 0,671)
 - Шагдарова Б.Ц., Дрозд Н.Н., Ильина А.В., Логвинова Ю.С., Варламов В.П. Нейтрализация антикоагулянтной активности гепарина N-[(2-гидрокси-3-триметиламмоний)пропил] хлорид-производными хитозана // **Прикладная биохимия и микробиология**. 2016. Т 52. №4, с. 421-428. (ИФ - 0,671)
 - Anastasia A. Zubareva, Balzhima Ts. Shagdarova, Valery P. Varlamov, Elena V. Svirshchetskaya Cell binding and penetration of quaternized chitosan derivatives // **Progress in the Chemistry and Application of Chitin and its Derivatives**. 2016. V. XXI. P. 217-223, DOI: 10.15259.PCASC.21.23. (ИФ - нет)
 - Чудинова Ю.В., Шагдарова Б.Ц., Ильина А.В., Варламов В.П. Антибактериальное действие конъюгатов пептидов и кватернизированного производного хитозана и его изучение методом атомно-силовой микроскопии // **Прикладная биохимия и микробиология**. 2016. Т 52. №5, с. 482–488. (ИФ - 0,671)
 - Свирщевская Е.В., Зубарева А.А., Бойко А.А., Шустова О.А., Гречишина М.В., Шагдарова Б.Ц., Варламов В.П. Анализ токсичности и биосовместимости производных хитозана с различными физико-химическими свойствами // **Прикладная биохимия и микробиология**. 2016. Т. 52. №5, с. 467-475 (ИФ - 0,671)
 - Луньков А.П., Шагдарова Б.Ц., Ильина А.В. Синтез кватернизированных производных хитозана и изучение их свойств // **Известия Уфимского научного центра РАН**. 2016. № 3(1), с 56-58. (ИФ - нет)
 - Дрозд Н.Н., Шагдарова Б.Ц., Варламов В.П. Влияние N-[(2-гидрокси-3-триметиламмоний)пропил] хлорид – производного хитозана на антикоагулянтную активность плазмы морских свинок // **Бюллетень экспериментальной биологии и медицины** (принята к публикации) (ИФ – 0.448)
 - Zubareva A., Shagdarova B., Varlamov V., Kashirina E., Svirshchetskaya E. Penetration and toxicity of chitosan and its derivatives // **European Polymer Journal**. 2017. принята в печать (ИФ - 3.485)
- Заявка на патент № 2016133240 «Способ получения низкомолекулярного хитозана и олигомеров хитозана» от 12.08.2016 г. Шагдарова Б.Ц., Лопатин С.А., Коновалова М.В., Ильина А.В., Албулов А.И., Варламов В.П

ПОРОФОРМЕРЫ И МИТОХОНДРИИ

Аливердиева Д.², Мамаев Д.¹

¹ ФИЦ Биотехнологии РАН, ИНБИ, Лаборатория биоэнергетики

² Прикаспийский институт биологических ресурсов, РАН, Махачкала

Пороформеры это группа липофильных соединений различной природы (пептиды, липопептиды, гликолипопептиды и полиеновые соеинения), формирующие отверстия в энергизованных мембранах и накапливающиеся в микроорганизмах в большей степени, чем в организме больного. В настоящее время к клиническому применению рекомендовано 10 антибиотиков из этой группы, причем показано, что в течение долгих лет к ним не формируется устойчивости. Однако неизбежное накопление этих лекарств в почках ограничивает применение препаратов или смертельно опасными инфекциями, или лечением «наружных» органов (кожа, дыхательные пути, ухо, глаз и т.п.). Увеличивается интерес медиков к таким потенциальным лекарствам пороформерам, как аламетицин, мелиттин и мастопаран. В присутствии аламетицина имеет место синергическое повышение эффективности эндофлоксацина при лечении респираторных болезней, вызываемых *Mycoplasma pulmonis*. Мастопаран предотвращает метастазообразование в модельных экспериментах и является потенциальным агентом против септического шока. Мелиттин рассматривается как перспективное средство при лечении карциномы печени и как малотоксичный противоопухолевый препарат.

Первая фаза стационарной активации дыхания митохондрий печени крыс аламетицином не выявляется в монотрисовой среде, но появляется в присутствии KCl в среде инкубации. По-видимому, индуцированная проводимость для этой фазы активации определяется аламетициновыми каналами в низшей степени олигомеризации, непроницаемыми для Трис⁺. Это позволило изучить концентрационную зависимость такой активации, неосуществимой традиционными методами.

Ранее в нашей группе было показано, что калиевый трансмембранный ток (КТТ), индуцированный в митохондриях печени крыс линейно зависит от степени активации дыхания вышеупомянутыми пороформерами. Это позволяет использовать препарат органелл как сенсор КТТ. Определено соотношение степеней активации дыхания аламетицином, тетраацетилмелиттином, мелиттином или мастопараном в монокалиевой и монокалиевой средах при одинаковом значении $\Delta\Psi$ (соответственно, 1.59 ± 0.04 , 1.39 ± 0.01 , 1.12 ± 0.03 и 1.18 ± 0.02). С учетом того, что соотношение чисел переноса (соотношение подвижностей) для K^+ и Li^+ в растворе с ионной силой, такой же, как в средах инкубации – 1.53, сделано предположение, что в присутствии аламетицина и тетраацетилмелиттина проводимость лимитируются реакцией образования поры, а в присутствии мелиттина или мастопарана – стадией, предшествующей порообразованию. Существенно, что первые 2 полипептида радикально подавляют трансмембранный потенциал митохондрий в ходе активации дыхания митохондрий, а остальные два умеренно, до некоторого стабильного состояния. Причем последнее сопоставимо по величине с эффектом физиологических активаторов дыхания (АДФ). Это означает, что такие соединения потенциально менее гепатотоксичны.

Публикация

Dinara Aliverdieva, and Dmitry Mamaev. Discrimination of Conductance of Lower and Higher Oligomeric Alamethicin Pores, **International Journal of Membrane Science and Technology**, 2015, 2, 1-4 (ИФ – нет)

БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫЕ ПЕПТИДЫ ЖИВОТНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ И ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ПРОДУКТЫ НА ИХ ОСНОВЕ

Торкова А.А.¹, Центалович М.Ю.¹, Лисицкая К.В.¹, Федорова Т.В.¹, Хотченков В.П.¹, Зверева Е.А.¹, Исмаилова Д.Ю.², Волик В.Г.², Агаркова Е.Ю.³, Кручинин А.Г.³, Рязанцева³ (Березкина) К.А., Николаев И.В.¹, Королева О.В.¹

¹ ФИЦ «Биотехнологии» РАН, ИНБИ, Лаборатория молекулярных основ биотрансформаций

² ФГБНУ ВНИИПП

³ ФГБНУ «ВНИМИ»

В последнее время проводятся активные исследования по поиску новых функциональных ингредиентов и изучению механизмов их действия на молекулярном, клеточном и организменном уровнях. На основе полученных данных проводится конструирование функциональных продуктов питания. Интерес к функциональным продуктам питания постоянно растет, что связано с тем, что продукты питания перестали быть просто средством удовлетворения голода и обеспечения необходимыми пищевыми веществами человека: потребители ищут продукты, которые обладают дополнительными преимуществами для поддержания их физического и умственного здоровья. Уже хорошо доказана взаимосвязь питания и ряда заболеваний, таких как сердечно-сосудистые заболевания, гипертония, диабет 2 типа, избыточный вес и ожирение, остеопороз, онкологические заболевания и пр. Растущие потребности в функциональных продуктах также связаны с глобальным ростом цен на медицинские услуги, постепенно растущей продолжительностью жизни и желанием пожилых людей вести активный образ жизни. Вышесказанное обуславливает необходимость проведения научных исследований, направленных на идентификацию биологически активных компонентов в пище, поиск и получение новых функциональных ингредиентов и созданию на их основе функциональных продуктов питания.

Исследования белково-пептидных гидролизатов как источника биологически активных пептидов интенсивно развиваются, что обусловлено возможностью использования их для создания функциональных продуктов; разработки новых лекарственных препаратов; и главное получение продуктов с высокой добавочной стоимостью из вторичных материальных ресурсов животного и растительного происхождения.

В представленной работе изучены и оптимизированы процессы ферментативного гидролиза мясокостного остатка птицы и сывороточных белков коровьего молока. Установлена взаимосвязь между степенью гидролиза, антиоксидантной емкостью и органолептическими характеристиками полученных гидролизатов. На основе полученных результатов разработана стратегия рационального дизайна ферментной композиции, включающая идентификацию белков в составе исходного сырья, биоинформационную оценку специфичности протеолитических ферментов по отношению к идентифицированным белкам, анализ функциональных свойств (пробиотическая и антиоксидантная активность, гипотензивные свойства и др.) получаемых белковых гидролизатов и идентификацию в их составе биологически активных пептидов.

На основе белковых гидролизатов разработаны функциональные продукты и проведено исследование их биологической активности в моделях *in vitro* и *in vivo*.

Публикации

1. Nikolaev I.V., Sforza S., Lambertini F., Ismailova D.Yu., Khotchenkov V.P., Volik V.G., Dossena A., Popov V.O., Koroleva O.V. Biocatalytic conversion of poultry processing leftovers: Optimization of hydrolytic conditions and peptide hydrolysate characterization. **Food Chemistry** (2016), V. 197, p. 611–621. (ИФ - 4,052)
2. Torkova A., Kononikhin A., Bugrova A., Khotchenkov V., Tsentalovich M., Medvedeva U. Effect of *in Vitro* Gastrointestinal Digestion on Bioactivity of Poultry Protein Hydrolysate. **Current Research in Nutrition and Food Science**. (2016), Vol. 4(SI. 2), p. 77-86. (ИФ – нет)
3. Torkova A., Ryazantzeva K., Agarkova E.Yu., Tsentalovich M., Kruchinin A., Fedorova T.V. Cheese Whey Catalytic Conversion For Obtaining a Bioactive Hydrolysate With Reduced Antigenicity. **Current Research in Nutrition and Food Science** (2016), Vol. 4(SI. 2), pp. 182-196. (ИФ – нет)
4. Torkova A., Koroleva O., Khrameeva E., Fedorova T., Tsentalovich M. Structure-Functional Study of Tyrosine and Methionine Dipeptides: An Approach to Antioxidant Activity Prediction. **International Journal of Molecular Sciences**. – 2015. – No 16. – P. 25353-25376; doi:10.3390/ijms161025353. (ИФ - 3.257)
5. Харитонов В.Д., Агаркова Е.Ю., Кручинин А.Г., Рязанцева К.А., Королева О.В., Федорова Т.В., Зверева Е.А., Тяжелова Т.В., Малошенок Л.Г., Ревякина В.А., Георгиева О.В., Пономарева Н.В., Мельникова Е.И., Лаптев Г.Ю., Ильина Л.А. Влияние нового кисломолочного продукта с гидролизатом сывороточных белков на переносимость и динамику проявлений атопического дерматита у детей с аллергией на белки коровьего молока. **Вопросы питания**. – 2015. – Т. 84, №5. – с. 56–63. (ИФ – нет)

Пат. 2537555 Российская Федерация, МПК. Корм сухой полнорационный для собак крупных пород сбалансированного аминокислотного состава с доказанными био-функциональными свойствами [Текст] / Королева О.В., Лисицкая К.В., Николаев И.В., Торкова А.А., Попов В.О., Лаптев Г.Ю., Никонов И.Н.; заявитель и патентообладатель Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биохимии им. А.Н. Баха Российской академии наук (RU) – № 2012142975; заявл. 09.10.2012; опубл. 10.01.2015, Бюл. № 1. – 21 с.

НОВЫЙ ТИП ГИПЕРМОДИФИКАЦИИ ДНК У БАКТЕРИОФАГОВ – ЗАМЕЩЕНИЕ ГУАНИНА НА АРХЕОЗИН

Летаров А.В., Голомидова А.К., Куликов Е.Е., Летарова М.А.

Институт микробиологии им. С.Н. Виноградского, ФИЦ Биотехнологии РАН, Москва

Бактериофаг 9g, инфицирующий *Escherichia coli*, был выделен нами из образца фекалий лошади на лабораторном штамме *E. coli* С600. Этот бактериофаг присутствовал в качестве контаминанта в бляшке другого бактериофага, относящегося к T5-подобным.

Электронно-микроскопическое исследование обнаружило, что новый бактериофаг является сифовирусом, морфологически сходным с фагом *Pseudomonas aeruginosa* YuA. Изучение биологических свойств фага обнаружило ряд интересных особенностей, в том числе высокоэффективное образование псевдолизогенных ассоциаций с хозяином.

Секвенирование ДНК фага позволило определить полную последовательность генома, составляющую 56702 п.н. Интересно, что ДНК фага оказалась полностью резистентна к гидролизу ферментами DraI, EcoRV, EcoRI, HaeIII, MboI, несмотря на наличие сайтов узнавания этих ферментов в последовательности генома. В то же время ферменты RsaI и SspI расщепляли ДНК нормально. Это свойство свидетельствовало о массовой модификации одного или более оснований. Анализ последовательности генома фага обнаружил присутствие в нем оперона синтеза азотистого основания, подобного кьюозину. Наличие подобных генов у некоторых фагов отмечалось и раньше, однако о связи этой особенности генома с устойчивостью ДНК к нуклеазам рестрикции не сообщалось. Предположение о наличии необычного основания в ДНК фага 9g было проверено с помощью метода хромато-масс-спектрометрии. Установлено, что около 25% гуанина в составе ДНК фага 9g замещено на археозин, ранее обнаруженный лишь в составе тРНК архей.

Необычные биологические свойства фага 9g, а также низкий уровень сходства большинства генов с геномами других фагов послужили основанием для выделения ICTV нового рода *Nonagvirus*, который в настоящее время насчитывает 4 узаконенных вида фагов.

Публикация

Thiaville J.J., Kellner S.M., Yuan Y., Hutinet G., Thiaville P.C., Jumpathong W., Mohapatra S., Brochier-Armanet C., Letarov A.V., Hillebrand R., Malik C.K., Rizzo C.J., Dedon P.C., de Crécy-Lagard V. (2016) Novel genomic island modifies DNA with 7-deazaguanine derivatives // **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.** 2016 113:E1452-1459 (ИФ - 9,423)

ОСОБЕННОСТИ ФОРМИРОВАНИЯ БИОГЕННЫХ НАНОЧАСТИЦ ВОССТАНОВЛЕННОГО СЕРЕБРА В ЧИСТЫХ КУЛЬТУРАХ И ПРИРОДНЫХ ВОДНЫХ ПРОБАХ

Складнев Д.А., Тюпа Д.В., Сорокин В.В., Гальченко В.Ф.

ФИЦ Биотехнологии РАН, ИНМИ, Лаборатория выживаемости микроорганизмов

Микроорганизмы формируют наночастицы восстановленных атомов металлов для защиты от избыточных концентраций соответствующих катионов в среде. Формирование биогенных наночастиц различных металлов происходит по-разному в присутствии различных микроорганизмов, в различных условиях и различных средах.

В наших экспериментах эти наблюдения подтверждены на нескольких моделях микробиологических сообществ и на серии чистых культур-изолятов. Предложен метод, позволяющий проводить быструю детекцию живых микробиологических объектов и интегральную оценку микробиологических сообществ, в том числе в природных водных пробах. Метод основан на наблюдении за динамикой процесса формирования наночастиц металлов *in situ* из стерильных растворов катионов, внесённых непосредственно в аликвоту исследуемого образца. Метод получил название OBNG (Observation of Biogenic Nanoparticles Growth). Этот нанобиотехнологический подход использован при исследовании нескольких препаратов активного ила, а также свойств водных проб подлёдного антарктического озера Унтерзее.

Публикации

1. Tyupa D.V., Kalenov S.V., Skladnev D.A., Khokhlachev N.S., Baurina M.M., Kuznetsov A.Ye. Toxic influence of silver and uranium salts on activated sludge of wastewater treatment plants and synthetic activated sludge associates modeled on its pure cultures // **Bioprocess Biosyst. Eng.**, 2015, 38(1), 125–135.
2. Anisimkin V.I., Pokusaev B.G., Skladnev D.A., Sorokin V.V., Tyupa D.V. Application of an acoustoelectronic technique to study ordered microstructured disperse systems with biological objects in a hydrogel // **Acoustical Physics**, 2016, 62(6), 754–759. (ИФ – 0,699)
3. Tyupa D. V., Kalenov S. V., Baurina M. M., Kabanov O. V., Skladnev D. A., Kuznetsov A. Ye. Optimization of silver biosorption by fungi forming granules from aqueous solutions of silver nitrate // **Clean Techn. Environ. Policy**, 2016, DOI 10.1007/s 10098-016-1187-y (ИФ – нет)
4. Tyupa D.V., Kalenov S.V., Baurina M.M., Yakubovich L.M., Morozov A.N., Zakalyukin R.M., Sorokin V.V., Skladnev D.A. Efficient continuous biosynthesis of silver nanoparticles by activated sludge micromycetes with enhanced tolerance to metal ion toxicity // **Enzyme and Microbial Technology**, 2016, <http://dx.doi.org/10.1016/j.enzmictec.2016.10.008>. (ИФ - 2,624)

НОВЫЕ АНОКСИГЕННЫЕ НИТЧАТЫЕ ФОТОТРОФНЫЕ БАКТЕРИИ: РАЗНООБРАЗИЕ И ЭВОЛЮЦИЯ

Гайсин В.А.¹, Брянцева И.А.², Груздев Д.С.¹, Бурганская Е.И.², Сухачева М.В.¹, Горленко В.М.² и Кузнецов Б.Б.¹

¹ФИЦ Биотехнологии РАН, ИНБ, Лаборатория молекулярной диагностики

¹ФИЦ Биотехнологии РАН, Институт микробиологии им. С.Н.Виноградского, Лаб. экол. и геохим. деятельности микроорганизмов

Коллектив лаборатории молекулярной диагностики совместно с лабораторией экологии и геохимической деятельности микроорганизмов работает над исследованием биоразнообразия, экологии и эволюции аноксигенных нитчатых фототрофных бактерий (АНФБ). Основные результаты, достигнутые коллективом в 2016 году при работе над данным проектом, можно отнести к трем направлениям:

(I) **Биогеография термофильных АНФБ.** Выявлена структура глобального филогенетического разнообразия термофильных АНФБ рода *Roseiflexus*. Особенности паттерна распределения филотипов позволяют предполагать влияние географической изоляции на эволюцию *Roseiflexus spp.* [1, 2].

(II) **Геномика АНФБ.** Определены полные нуклеотидные последовательности геномной ДНК бактерий *Chloroflexus islandicus* и *Candidatus Chloroploca asiatica*, которые в совокупности с ранее опубликованными данными были использованы для анализа характерного профиля делеций и инсерций фототрофных *Chloroflexi*, а также для характеристики новой бактерии *Chloroflexus islandicus* и исследования бактерии *Candidatus Chloroploca asiatica* [3, 4, 5].

(III) **Экология и биоразнообразие мезофильных АНФБ.** Изучено распределение АНФБ в микробных сообществах соленых маршей Белого моря. Для этого исследовано распределение фотопигментов, морфотипов, а также определен состав микробного сообщества с помощью гена 16S с применением метода высокопроизводительного секвенирования [Результаты не опубликованы].

Публикации

1. Gaisin, V. A., Grouzdev, D. S., Namsaraev, Z. B., Sukhacheva, M. V., Gorlenko, V. M., Kuznetsov, B. B. (2016). Biogeography of thermophilic phototrophic bacteria belonging to *Roseiflexus* genus. **FEMS Microbiology Ecology**, 92(3), fiw012. (ИФ - 3,53)
2. Gaisin, V. A., Ivanov, T. M., Kuznetsov, B. B., Gorlenko, V. M., Grouzdev, D. S. (2016). Draft genome sequence of *Chloroflexus* sp. strain isl-2, a thermophilic filamentous anoxygenic phototrophic bacterium isolated from the Strokkur geyser, Iceland. **Genome Announc.** 4(4), e00714-16. (ИФ – нет)
3. Gaisin, V. A., Kalashnikov, A. M., Grouzdev, D. S., Sukhacheva, M. V., Kuznetsov, B. B., Gorlenko, V. M. (2017). *Chloroflexus islandicus* sp. nov., a thermophilic filamentous anoxygenic phototrophic bacterium from geyser Strokkur (Iceland). **IJSEM**, принята в печать (ИФ - 2,439)

ТЕРМОСТАБИЛЬНЫЙ ШАПЕРОН GroEL – ИНСТРУМЕНТ ДЛЯ БИОСИНТЕТИЧЕСКОГО ПОЛУЧЕНИЯ ПОЛИПЕПТИДОВ В ПОЛОСТИ ЧАСТИЦЫ

Юркова М.С.¹, Шарапова², Зенин В.А.¹ и Федоров А.Н.¹

¹ ФИЦ Биотехнологии РАН, ИНБИ, Группа молекулярной биотехнологии

² ООО Тропоген, Москва; текущее место работы Alder Biopharmaceuticals, Seattle

Целью является создание биосинтетического метода получения полипептидов, которые слишком затратно получать химическим синтезом, а также трудно или невозможно экспрессировать в клетках существующими методами. Принцип подхода состоит во включении целевого пептида в полипептидную цепь GroEL таким образом, что пептид оказывается внутри частицы GroEL. При этом пептид, с одной стороны, экранирован от действия клеточных протеаз, с другой стороны, в случае экспрессии токсичных пептидов, их токсичное действие отсутствует. Пептид получают из общей с GroEL полипептидной цепи с помощью химической обработки, специфичной к аминокислотам. Нами сделана система для использования обработки CNBr, специфичной к метионину. В качестве предварительного этапа был сделан вариант GroEL, в котором все остатки метионинов были заменены на другие аминокислоты, и продемонстрирована стабильность таких частиц. Место для включения целевого пептида было выбрано в неструктурированной петле полипептидной цепи GroEL на границе апикального домена таким образом, чтобы целевой пептид мог контактировать с пептид-связывающей поверхностью внутри полости шаперона. По краям целевого пептида вставляются метионины для последующей химической обработки. GroEL с пептидом в составе его полипептидной цепи после экспрессии и очистки обрабатывается CNBr и выделяется целевой пептид. Все применяемые процедуры носят рутинный характер, легко масштабируются и автоматизируются. Преимущества предлагаемого подхода: 1. простота технологии очистки целевого пептида, 2. очистка не зависит от длины целевого пептида и сразу дает высокоочищенный продукт, 3. позволяет получать токсичные, нерастворимые и/или нестабильные пептиды. Возможности метода продемонстрированы при получении с его помощью полифемузина, одного из наиболее сильных антибактериальных пептидов. Пептид, состоящий из 18 аминокислот, был успешно экспрессирован в составе GroEL, выделен и показана его антибактериальная активность. Подход позволяет получать наиболее сложные для производства пептиды в бактериальных клетках. Дальнейшее развитие подхода предполагает возможность получения пептидов, идентичных природным, а также пептидов большего размера и белков.

Публикация

Yurkova M. S., Sharapova O. A., Zenin V. A. And Fedorov A. N. Production of polypeptides as fusions inside GroEL cavity. **Scientific Reports**, принято в печать. (ИФ - 5,228)

ПРОДУКЦИЯ ГУМАНИЗИРОВАННОГО F(ab')₂ ФРАГМЕНТА АНТИТЕЛА ПРОТИВ ВИРУСА БЕШЕНСТВА В ДРОЖЖАХ *PICHTA PASTORIS*

Ягудин Т.А.¹, Клячко Е.В.¹, Зацепин С.С.¹, Морозкина Е.В.¹, Беневоленский С.В.¹, Шемчукова О.Б.², Позднякова Л.П.², Солопова О.Н.², Свешников П.Г.²

ФИЦ Биотехнологии РАН, ИНБИ, Лаборатория оптимизации экспрессии генов

** Всероссийский научный Центр молекулярной диагностики и лечения

Создана система дрожжевой экспрессии рекомбинантных F(ab')₂-фрагментов антител. Получен штамм дрожжей *Pichia pastoris* - продуцент гуманизированных F(ab')₂-фрагментов антитела против вируса бешенства. Исследовано влияние коэкспрессии шаперонов BiP и PDI человека на уровень секреции иммуноглобулинов. Использование Fos и Jun зипперов в составе тяжёлых цепей облегчало димеризацию Fab'-фрагментов, увеличивая долю F(ab')₂-фрагментов в общем пуле секретируемых иммуноглобулинов до 75%.

Публикации

1. Ягудин Т.А., Клячко Е.В., Зацепин С.С., Морозкина Е.В., Беневоленский С.В., Шемчукова О.Б., Позднякова Л.П., Солопова О.Н., Свешников П.Г. Продукция гуманизированного F(ab')₂ фрагмента антитела против вируса бешенства в дрожжах *Pichia pastoris*. **Прикладная биохимия и микробиология**. (2016) 52(4), 370-376. (ИФ - 0,671)
2. Свешников П.Г., Ягудин Т.А., Морозкина Е.В., Клячко Е.В., Зацепин С.С., Беневоленский С.В., Шемчукова О.Б., Позднякова Л.П., Солопова О.Н. Получение гуманизированного Fab фрагмента нейтрализующего антитела против вируса бешенства. **Вестник Московского университета. (2010) Серия 2: Химия**. 51(3), 185-190. (ИФ – нет)

Патент РФ №2440412 от 20.01.2012. Беневоленский С.В., Зацепин С.С., Клячко Е.В., Морозкина Е.В., Позднякова Л.П., Свешников П.Г., Солопова О.Н., Шемчукова О.Б., Ягудин Т.А. "Гуманизированные антигенсвязывающие фрагменты (Fab) против вируса бешенства, изолированный фрагмент ДНК, кодирующий Fab против вируса бешенства, клетка дрожжей, трансформированная фрагментом ДНК, и способ получения Fab против вируса бешенства с использованием дрожжей".

АКТИВНЫЙ В ШИРОКОМ ДИАПАЗОНЕ УСЛОВИЙ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ НОВЫЙ ФИЛОТИП *ECOSI* АНАММОКС-БАКТЕРИИ *CANDIDATUS 'JETTENIA ASIATICA'*

Бочкова Е.А.¹, Литти Ю.В.¹, Новиков А.А.³, Бескорвайный А.В.³, Кузнецов Б.Б.²,
Ножевникова А.Н.¹

¹ ФИЦ Биотехнологии РАН, ИНМИ, Лаборатория микробиологии антропогенных мест обитания

² ФИЦ Биотехнологии РАН, ИНБ

³ РГУ нефти и газа им. И.И. Губкина

В результате длительного, более 5 лет, культивирования на минеральной среде при постепенном увеличении концентрации субстратов роста (NH_4^+ и NO_2^-) и температуре 30-31⁰С в лабораторном вертикальном проточном up-flow реакторе с иммобилизацией микробной биомассы, получена монокультура анаммокс-бактерии *Candidatus 'Jettenia asiatica'* филотип *ecosi* (98% сходства с ранее описанным видом *Candidatus 'Jettenia asiatica'*). Реактор был инокулирован активным илом из денитрификатора одной из станций очистки хозяйственно-бытовых сточных вод «Экос-БХ», построенных для строителей объектов Зимней Олимпиады 2014 г. Отличительной особенностью филотипа *ecosi* является способность расти в широком диапазоне концентраций азотных субстратов (аммония и нитрита) и рН. Клетки нового филотипа имеют типичную для анаммокс-бактерий морфологию и ультраструктуру с отчетливо выделяющейся анамоксосомой, не расходятся после деления, имеют тенденцию к агрегированию и прикреплённому росту и формированию сферических биоплёнок в осадке и на волокнах ершей и плоских обрастаний с неровной поверхностью на стенках реактора. В мембранах клеток анаммокс-бактерий биореактора выявлены гопаноиды и ладдеральные липиды, которые являются одним из основных маркеров этой группы микроорганизмов. Время удвоения биомассы физиологически активных анаммокс-бактерий составляет около 13 суток, что соответствует данным для этого вида. Особенностью филотипа *ecosi* является стабильная активность в широком диапазоне концентраций субстратов от 0,02 до 5,6 г N/л и рН от 7,2 до 8,8, что имеет широкие перспективы для использования в биотехнологии очистки сточных вод как с высокой, так и с низкой концентрацией азотсодержащих загрязняющих веществ. Спутники анаммокс-бактерии представлены, в основном, бактериями филумов *Chloroflexi*, *Proteobacteria*, *Chlorobi* и тонкими нитчатými формами неопределенного филума.

Публикации

1. Ножевникова А.Н., Зубов М.Г., Литти Ю.В., Куликов Н.И., Зубов Г.М., Некрасова В.К., Бочкова Е.А. Эффективная ресурсосберегающая биотехнология очистки хозяйственно-бытовых сточных вод с перспективой повторного использования очищенной воды и обработанных осадков // **Актуальная биотехнология**. 2016. №3 (18). С. 86-91. (ИФ – нет)
2. Botchkova E.A., Plakunov V.K., Nozhevnikova A.N. Dynamics of biofilm formation on microscopic slides submerged in an anammox bioreactor // **Microbiology**, 2015. V. 84. № 3. P. 456-460. (ИФ - 0,796)
3. Nozhevnikova A.N., Litty Yu.V., Zubov M.G. Biotechnology of wastewater treatment with the effective removal of nitrogen due to the participation of anammox-bacteria, developed for the 2014 Winter Olympics in Sochi // **Ecological Engineering and Environment Protection**, 2015. № 2. P. 24-29. (ИФ – нет)

ХАРАКТЕРИСТИКА МИКРОБНОГО СООБЩЕСТВА ЗАПАДНОСИБИРСКОГО ГЛУБИННОГО ТЕРМАЛЬНОГО ВОДОНОСНОГО ГОРИЗОНТА ПО РЕЗУЛЬТАТАМ ПЯТИЛЕТНЕГО МОНИТОРИНГА

Гаврилов С.Н.¹, Франк Ю.А.², Кадников В.В.³, Бэнкс Д.⁴, Герасимчук А.Л.², Подосокорская О.А.¹, Меркель А.Ю.¹, Черных Н.А.¹, Марданов А.В.³, Равин Н.В.³, Карначук О.В.², Бонч-Осмоловская Е.А.¹

¹ ФИЦ Биотехнологии РАН, ИНБ, Отдел биологии экстремофилов / Лаборатория разнообразия и экологии экстремофильных микроорганизмов

² Кафедра физиологии растений и биотехнологии, Томский государственный университет,

³ ФИЦ Биотехнологии РАН, ИНБ

⁴ Glasgow and Holymoor Consultancy Ltd., Университет Глазго, Честерфилд, Великобритания

Задачей работы была комплексная характеристика микробного сообщества глубинного подземного водоносного горизонта, вскрытого нефтепоисковой скважиной ЗР глубиной 2,7 км, достигающей палеозойского фундамента Западно-Сибирского нефтегазоносного бассейна в Парабельском районе Томской области. Глубинная вода из скважины самоизливается с температурой 50°C, её химический состав варьирует, но в ней стабильно присутствуют ацетат, пропионат, следовые количества углеводов и растворённый метан в высоких (вплоть до насыщения) концентрациях. На изливе скважины при температурах 45-50°C активно развиваются микробные маты. Нами был проведён пятилетний мониторинг филогенетического разнообразия прокариот термальной воды и микробных обрастаний скважины с помощью анализа совокупности фрагментов генов 16S рРНК. Мы выявили несколько доминирующих фило типов, постоянно присутствующих в воде скважины, и вариабельную часть микробного сообщества, характеризующуюся широким разнообразием, которая периодически выносятся из скважины на поверхность. Основными планктонными компонентами термальной воды оказались *Desulfovibrio thermocuniculi* и представители *Methanothermobacter* spp. Состав минорной (вариабельной) части сообщества оказался непостоянен, его молекулярно-биологический анализ не выявил чётких закономерностей изменения микробного разнообразия, прослеживалось только доминирование некультивируемых фирмикут. Для выделения прокариот, составляющих вариабельную часть сообщества, были поставлены накопительные культуры с термальной водой и сложными органическими субстратами. ПЦР-ДГГЭ-анализ этих культур выявил фило типы, относящиеся к некультивируемым фирмикутам, а также к филумам *Chloroflexi* и *Ignavibacteriae*. Накопительные культуры, полученные в непрерывном режиме из термальной воды с ацетатом в качестве источника углерода содержали *Hydrogenophilus thermoluteolus*, который был ранее детектирован в микробных матах, развивающихся на изливе скважины. В целом, результаты культуральных исследований позволили предположить, что вариабельная часть сообщества скважины ЗР представлена органотрофами-гидролитиками, осуществляющими деградацию захороненных биополимеров в глубинном водоносном горизонте, тогда как постоянные планктонные компоненты этого сообщества разлагают продукты сбраживания биополимеров до метана и CO₂, вероятно, используя межвидовой перенос водорода. Случайный смыв минорных компонентов сообщества, способных к аэробному дыханию или толерантных к кислороду, с минералов, выстилающих водоносный горизонт, приводит к развитию микробных матов на изливе термальной воды, где растворённые остаточные продукты сбраживания биополимеров окисляются в аэробных процессах. Длительный мониторинг состава микробного сообщества с применением молекулярных и культуральных методов позволил выявить стабильную и вариабельную части исследуемого микробного сообщества и оценить их экологическую роль.

Публикация

Frank YA, Kadnikov VV, Gavrilov SN, et al. Stable and Variable Parts of Microbial Community in Siberian Deep Subsurface Thermal Aquifer System Revealed in a Long-Term Monitoring Study. **Frontiers in Microbiology**. 2016. 7:2101. (ИФ - 4,165)