



ТЕЗИСЫ ДОКЛАДОВ

ежегодной научной конференции

**Федерального исследовательского центра
«Фундаментальные основы биотехнологии»
Российской академии наук**

03-05 марта 2020

ВЕКОВАЯ ЗАГАДКА ПЛАНКТОМИЦЕТОВ РАЗГАДАНА

Дедыш С.Н., Иванова А.А., Куличевская И.С.

ИНМИ ФИЦ Биотехнологии РАН

Планктомицеты (*Planctomycetes*) – это филогенетическая группа домена *Bacteria*, представители которой населяют широкий круг местообитаний, отличаются сложной организацией клеток и большими геномами, кодирующими во многом неизученный функциональный потенциал. С момента описания первого представителя планктомицетов, некультивируемой пресноводной бактерии *Planctomyces bekefii*, прошло уже около ста лет. Род *Planctomyces* является типовым родом семейства *Planctomycetaceae* и порядка *Planctomycetales*. Как ни парадоксально, но типовой вид этого рода, *P. bekefii*, до сих пор был описан только на основании уникальной морфологии этих бактерий.

Настоящая работа ставила своей целью идентификацию и изучение биологии *P. bekefii* с помощью методов молекулярного анализа нового поколения, таких как высокопроизводительное секвенирование ампликонов гена 16S рРНК, флуоресцентная *in situ* гибридизация и метагеномный анализ. Микроскопический скрининг нескольких десятков пресноводных объектов позволил выявить клетки морфотипа *P. bekefii* в эвтрофном озере Вологодской области.

Селективный отбор этих клеток из образцов воды с помощью клеточного сортера FACS ARIA III с последующим выделением ДНК и амплификацией гена 16S рРНК позволили идентифицировать целевые объекты в качестве представителей семейства *Planctomycetaceae*, обнаруживающих 88–91% сходства последовательностей генов 16S рРНК с ныне охарактеризованными планктомицетами. Корректность идентификации была подтверждена *in situ* гибридизацией целевых клеток с двумя флуоресцентно мечеными зондами, специфичными для полученных последовательностей гена 16S рРНК *P. bekefii*. Собранный в работе метагеном *P. bekefii* характеризует эти планктомицеты как аэробные организмы, специализирующиеся на использовании субстратов белковой природы, а также сульфатированных полисахаридов. Анализ сезонной динамики планктомицетов в озерной воде с помощью секвенирования ампликонов гена 16S рРНК по технологии Illumina MiSeq показал, что пик популяционной численности *P. bekefii* следует за вспышкой развития цианобактерий и микроводорослей, предполагая участие планктомицетов в деструкции клеток фототрофов. Анализ базы данных метагеномов подтвердил широчайшее распространение *P. bekefii* в пресноводных озерах различных континентов, причем большинство сходных последовательностей были получены в период их «цветения». Установление идентичности *P. bekefii* позволяет снять столетнее «инкогнито» этих микроорганизмов и осуществить соответствующую ревизию таксономической структуры *Planctomycetes*.

Исследования выполнены в рамках работ по проекту РФФИ 16-04-00290.

Публикация:

Dedysh S.N., Henke P., Ivanova A.A., Kulichevskaya I.S., Philippov D.A., Meier-Kolthoff J.P., Göker M., Huang S., Overmann J. 100-year-old enigma solved: identification, genomic characterization and biogeography of the yet uncultured *Planctomyces bekefii* // **Environmental Microbiology**. 2020. V. 22 (1). P. 198–211.

**РАЗРАБОТКА ЛЕКАРСТВЕННОГО ПРЕПАРАТА,
АКТИВНОГО В ОТНОШЕНИИ РЯДА ВИРУСОВ,
ВКЛЮЧАЯ КОРОНАВИРУС 2019-NCOV,
НА ОСНОВЕ БЛОКАДЫ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ВИРУСА И КЛЕТКИ ХОЗЯИНА**

Рябова О.Б.¹, Монахова Н.С.¹, Новоселова Е.А.¹, Макаров В.А.¹, Нестеренко В.Г.², Болгарин Р.Н.², Чепур С.В.³, Paeschke R.⁴, Woskoboynik I.⁴, Schmidtke M.⁴, Bogner E.⁵, Ekins S.⁶

¹ ИНБИ ФИЦ Биотехнологии РАН

² ООО Нуармедик

³ Военно-Медицинская Академия,

⁴ Friedrich Schiller University, Jena,

⁵ Charite Hospital, Berlin,

⁶ CCD, Raleigh, USA

Изучена возможность ингибирования вирусной инвазии в клетки организма-хозяина связанная со специфичной блокадой рецепторов гепарансульфата малыми молекулами. Эта возможность *in vitro* исследована для ряда вирусов: вирусов простого герпеса типов 1 и 2, вируса папилломы человека, цитомегаловируса человека, некоторых штаммов ВИЧ, вируса саркомы Рауса, вирусов гепатита В и С и коронавируса. Базируясь на знании о структуре мишени проведен дизайн и осуществлен синтез уникальных диазониадиспироазоалканов, которые специфически связываются с гликоконъюгатами гепарансульфата, что не позволяет вирусу сформировать связь с клеткой организма-хозяина и продолжить жизненный цикл. До настоящего времени в мире не существует препаратов с таким механизмом действия.

Мишенью PDSTP является две сульфатные группы расположенные в соседних сахаридных остатках, так например для GlcA2S-GlcNS6S, GlcA2S-GlcNS3S, IdoA2S-GlcNAc6S, IdoA2S-GlcNH23SS6S, IdoA2S-GlcNS6S, and IdoA2SGlcNS3S наблюдается хорошее электростатическое взаимодействие между отрицательным зарядом на сульфатной группе и положительно заряженными атомами азота PDSTP. Так же показано, что аналогичного рода взаимодействие может происходить и с карбонильной группой октасахарида ΔUA-GlcNSIdoUA2S-GlcNAc-UA2S-GlcNS-IdoUA2S-GlcNH23S, являющимся необходимым участком HS для проникновения HSV-1 в клетку хозяина. Таким образом, PDSTP блокирует ключевые функциональные группы гликоконъюгатов гепарансульфата, предотвращая репликацию вируса и обеспечивая в конечном итоге высокую противовирусную активность.

Высокая эффективность лидирующего соединения PDSTP была показана на различных моделях на животных: энцефалита мышей вызванного HSV-1, офтальмогерпеса кроликов, генетальный герпес морских свинок. Показано, что при лечебно-профилактическом методе введения соединения в дозе 50 мг/кг эффективно защищают животных от развития вирусной инфекции. Безопасность соединения PDSTP была исследована и подтверждена в рамках доклинического изучения по показателям острой и хронической токсичности, канцерогенности, мутагенности, репродуктивной токсичности и аллергенности.

В настоящее время субстанция PDSTP проходит углубленные исследования на предмет возможности ее использования для лечения атипичной пневмонии вызванной коронавирусом 2019-nCoV.

Работа была поддержана грантом МОН.

Публикации:

1. Макаров В.А., Нестеренко В.Г., Болгарин Р.Н., Новоселова Е.А. **RU2015144872**, 2018, Производные пиримидил-ди(диспироалканов) и их противовирусная активность.
2. Новоселова Е.А., Рябова О.Б., Ленева И.А., Макаров В.А. Специфическая противовирусная активность пиримидин-диспиротрипиперазиния в монотерапии и в комбинации с ацикловиром на модели герпесвирусной инфекции // **Хим Фарм Жур.**, 2019, 53, 9, 3-8.
3. Egorova A., Ekins S., Schmidtke M., Makarov V. Back to the Future: Advances in Development of Broad-Spectrum Capsid-Binding Inhibitors of Enteroviruses // **European Journal of Medicinal Chemistry**, 2019, 178,606-622.

МОЛЕКУЛЯРНАЯ ЭКОЛОГИЯ, ТАКСОНОМИЯ И ГЕНОМИКА МАГНИТОТАКТИЧЕСКИХ БАКТЕРИЙ

Козьяева В.В.¹, Узун М.М.^{1,2}, Дзюба М.В.¹, Баслеров Р.В.¹, Патутина Е.О.¹, Сухачева М.В.¹, Колганова Т.В.¹, Груздев Д.С.¹

¹ ИНБ ФИЦ Биотехнологии РАН

² МГУ им. М.В. Ломоносова

Магнитотактические бактерии (МТБ) известны своей уникальной способностью синтезировать внутриклеточные кристаллы магнетита или грейгита, окруженные мембраной, – магнетосомы. Благодаря уникальности свойств бактериальных магнитных наноразмерных частиц и их высокого биотехнологического потенциала изучение МТБ является актуальным (Mathuriya, 2015). В настоящее время разнообразие МТБ недооценено. Кроме этого имеются сложности идентификации МТБ при применении традиционных методов. Разработка новых методов изучения МТБ, и последующее применение методов метагеномики позволит выявить и изучить новые группы МТБ. Последующий анализ полученных данных позволяет не только определить видовой состав МТБ в исследуемом сообществе, но и идентифицировать гены, детерминирующие основные метаболические пути, в том числе синтез магнетосом.

В настоящей работе предложен новый подход к изучению МТБ, в котором сепарация клеток не основана на их таксисе – метод магнитной сепарации на колонках (МТБ-CoSe). Предложена система праймеров на маркерный ген *tamK* МТБ. Комбинацией этих методов было определено разнообразие МТБ в оз. Белое Бордуковское. В результате было обнаружено доминирование МТБ, принадлежащих филуму *Nitrospirae*. Впервые были идентифицированы МТБ семейства *Syntrophaceae*. Определена морфология бактерий новых обнаруженных филогенетических групп и доказана их принадлежность к МТБ.

Был детально изучен некультивируемый пресноводный кокк UR-1. Получен его геном хорошего качества, на основе анализа которого было предложено отнести бактерию к новому виду-кандидату ‘*Ca. Magnetaquicoccus inordinatus*’. Впервые была ассоциирована морфология клеток и магнетосом пресноводного магнитотактического кокка с его геном. На основании филогенетического анализа последовательностей гена 16S рРНК, филогеномного анализа, расчета геномных индексов и анализа метаболизма было предложено выделить 5 семейств в порядке *Magnetococcales*. В семейство ‘*Ca. Magnetaquicoccaceae*’ входит кокк UR-1. В геноме кокка UR-1 были идентифицированы гены формирования магнетосом. По результатам филогенетического анализа магнетосомных и коровых белков магнитотактических кокков впервые был показан горизонтальный перенос магнетосомных генов, хотя ранее предполагали их вертикальное наследование у МТБ порядка *Magnetococcales* (Morillo et al., 2014).

В ходе наших исследований из оз. Белое Бордуковское был выделен в чистую культуру и описан штамм *Magnetospirillum kuznetsovii* LBB-42^T sp. nov. Полученные чистые культуры могут быть использованы в качестве продуцентов магнетосом и для изучения процесса биоминерализации магнетита у МТБ.

Полученные результаты расширяют имеющиеся представления о разнообразии и биологии МТБ и вносят вклад в развитие современного понимания эволюции генов формирования магнетосом.

Публикации

1. Koziaeva VV, Rusakova SA, Slobodova NV, Uzun M, Kolganova TV, Skryabin KG, Grouzdev DS. *Magnetospirillum kuznetsovii* sp. nov., a novel magnetotactic bacterium isolated from a lake in the Moscow region // **Int J Syst Evol Microbiol**. 2019. V. 69. №. 7. P. 1953-1959.
2. Koziaeva V, Dziuba M, Leão P, Uzun M, Krutkina M, Grouzdev D. Genome-Based Metabolic Reconstruction of a Novel Uncultivated Freshwater Magnetotactic coccus «*Ca. Magnetaquicoccus inordinatus*» UR-1, and Proposal of a Candidate Family “*Ca. Magnetaquicoccaceae*” // **Front Microbiol**. 2019. V. 10. P. 2290
3. Koziaeva V.V., Alekseeva L.M., Uzun M. M., Leão P., Sukhacheva M.V., Patutina E.O., Kolganova T.V., Grouzdev D.S. Biodiversity of Magnetotactic Bacteria in the Freshwater Lake Beloe Bordukovskoe, Russia // **Microbiology**. In press.

ФОТОИНАКТИВАЦИЯ ПОКОЯЩИХСЯ ФОРМ *MYCOBACTERIUM SMEGMATIS* ПОСРЕДСТВОМ ИХ ЭНДОГЕННЫХ ПОРФИРИНОВ

Шлеева М.О., Савицкий А.П., Никитушкин В.Д., Соловьев И.Д., Казачкина Н.И., Трутнева К.А., Капрельянц А.С.

ИНБИ ФИЦ Биотехнологии РАН

Возбудитель туберкулеза (ТБ) - *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*) способен в неблагоприятных условиях образовывать покоящиеся формы, которые не только приобретают устойчивость ко всем известным антибактериальным препаратам, но и способны десятилетиями сохранять жизнеспособность в организме человека и переходить в активное состояние, вызывая возобновление болезни. Ранее нами было обнаружено, что быстрорастущий родственник возбудителя ТБ - *Mycobacterium smegmatis* (*Msm*) способен накапливать эндогенно некоторые свободные порфирины, а именно, копропорфирин III и уропорфирин III, а также их метиловые эфиры во время перехода в покоящееся состояние.

Целью данной работы являлось детальное изучение накопления порфиринов при переходе активных *Msm* в покоящееся состояние, а также оценка эффективности фотодинамической инактивации покоящихся микобактерий.

Протеомный анализ *Msm* выявил значительную выраженность ферментов синтеза порфирина (порфибилиногендеаминаза, дегидратаза дельта-аминолевулиновой кислоты, декарбоксилаза уропорфириногена) в покоящихся формах, в отличие от активных микобактерий. Увеличение концентрации метилированных форм копропорфирина в стационарной фазе в клетках *Msm* коррелировало с развитием постепенного подкисления культуры и началом снижения метаболической активности микобактерий, что, в свою очередь, сопровождалось образованием овоидных покоящихся форм. Мы оценили влияние света с разными длинами волн, излучаемого пятью светодиодами на жизнеспособность покоящихся *Msm*. Наибольшая инактивация микобактерий наблюдалась при 395 и 575 нм, что совпадает с основным максимумом спектра поглощения экстрагированных порфиринов (около 400 нм и 550-600 нм). При использовании светодиода 395 нм микобактерии быстро погибали, демонстрируя снижение числа колониеобразующих единиц (КОЕ) с 10^7 до 2×10^4 , однако продолжающееся освещение не приводило к дальнейшему падению КОЕ. Подобное быстрое изменение КОЕ в течение первых пяти минут освещения было обнаружено при использовании лазера 575 нм, однако, в последнем случае наблюдалось дальнейшее медленное снижение КОЕ при более длительном освещении. Метаболически активные клетки *Msm*, полученные из экспоненциальной фазы роста, не были чувствительны к освещению в течение 60 минут.

Это исследование впервые демонстрирует возможность *in vitro* фотоинактивации покоящихся форм микобактерий на примере быстрорастущего родственника возбудителя туберкулеза – *Msm*. Ни накопление порфиринов, ни возможность применения ФДИ на покоящихся формах микроорганизмов, включая микобактерии, ранее не изучались. С другой стороны, современные исследования в этой области в основном направлены на использование экзогенно добавленных фотосенсибилизаторов для проведения ФДИ микобактерий. Обнаруженный нами факт самопроизвольного накопления эндогенных порфиринов при переходе микобактерий в состояние покоя является уникальным и расширяет горизонты применения фотодинамической терапии по отношению к возбудителю туберкулеза.

Публикации:

1. Trutneva K.A, Shleeva MO, Nikitushkin VD, Demina GR, Kaprelyants AS. Protein composition of *Mycobacterium smegmatis* differs significantly between active cells and dormant cells with ovoid morphology // **Front Microbiol.**, 2018; 9:2083.
2. Shleeva M.O., Savitsky A.P., Nikitushkin V.D., Solovyev I.D., Kazachkina N.I., Perevarov V.V., Kaprelyants A.S. Photoinactivation of dormant *Mycobacterium smegmatis* due to its endogenous porphyrins // **Appl Microbiol Biotechnol.** 2019;103 (23-24):9687-9695.
3. Шлеева М.О., Савицкий А.П., Никитушкин В.Д., Соловьев И.Д., Трутнева К.А., Керученко Я.С., Капрельянц А.С. Эффект фотодинамической инактивации в отношении покоящихся и активно растущих форм *Mycobacterium smegmatis*. Прикладная биохимия и микробиология, 2020, Т.56, № 3, с. 1-8.

НОВЫЕ ДАННЫЕ ОБ ЭКОЛОГИИ И БИОРАЗНООБРАЗИИ МЕЗОФИЛЬНЫХ ФОТОТРОФНЫХ *CHLOROFLEXI*

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

¹ ИНМИ ФИЦ Биотехнологии РАН

² ИНБ ФИЦ Биотехнологии РАН

Основной массив данных об особенностях физиологии и местообитаний древней группы аноксигенных фототрофных нитчатых бактерий (АНФБ) приходится на термофильные виды. Хотя первые мезофильные АНФБ были открыты в 1974 году (Горленко, 1974), число описанных мезофильных таксонов до недавнего времени было ограничено. Проведенные нами исследования новых местообитаний (литорали Белого моря, содовых озер, соленых и пресных холодных сульфидных источников) с использованием современных методов детекции показали широкое распространение АНФБ. АНФБ являются обычным компонентом сообществ микробных матов и биопленок и их видовая специфика зависит от типа водоема. За последние 5 лет нашей исследовательской группой обнаружено и выделено в культуры 9 новых фило типов *Chloroflexi*. Исследование геномов новых видов позволило внести существенные изменения в представление о филогенетическом и функциональном разнообразии этой древней группы фототрофов. В частности, среди новых микроорганизмов определились две группы, различающиеся по путям автотрофной фиксации углекислоты: гидроксипропионатному или циклу Кальвина и способностью к азотфиксации. Все мезофильные представители являются строгими анаэробами и сульфидофилами. Между тем у “*Candidatus Viridilinea mediisalina*”, сульфид-хинон-оксидредуктаза отсутствует. В дальнейшем будут продолжены более глубокие исследования собранных геномов, что даст возможность скорректировать существующее представление об эволюции фототрофии и автотрофии у прокариотных микроорганизмов.

Публикации:

1. Горленко В.М., Бурганская Е.И., Брянцева И.А. Фототрофные сообщества высокоминерализованных мезотермальных сульфидных Берикейских источников (Дагестан) // **Микробиология**. 2019. Т. 88 (2). С. 154–164. doi: 10.1134/S0026365619020046
2. Gaisin V.A., Burganskaya E.I., Grouzdev D.S., Ashikhmin A.A., Kostrikina N.A., Bryantseva I.A., Koziyeva V.V., Gorlenko V.M. “*Candidatus Viridilinea mediisalina*”, a novel phototrophic *Chloroflexi* bacterium from a Siberian soda lake // **FEMS Microbiol. Lett.** 2019. V. 366 (5). pii: fnz043. doi: 10.1093/femsle/fnz043
3. Gaisin V.A., Burganskaya E.I., Grouzdev D.S., Osipova N.S., Ashikhmin A.A., Sinetova M.A., Krutkina M.S., Bryantseva I.A., Sukhacheva M.V., Kochetkova T.V., Koziyeva V.V., Kalashnikov A.M., Gorlenko V.M. “*Candidatus Oscillochloris fontis*”: a novel mesophilic phototrophic Chloroflexota bacterium belonging to the ubiquitous *Oscillochloris* genus // **FEMS Microbiol. Lett.** 2019. V. 366 (8). pii: fnz097. doi: 10.1093/femsle/fnz097
4. Burganskaya E.I., Bryantseva I.A., Krutkina M.S., Grouzdev D.S., Gorlenko V.M. Bacterial communities of the microbial mats of Chokrak sulfide springs // **Arch. Microbiol.** 2019. V. 201 (6). P. 795–805. doi: 10.1007/s00203-019-01648-6
5. Бурганская Е.И., Груздев Д.С., Круткина М.С., Горленко В.М. Бактериальные сообщества микробных матов супралиторали Белого моря и отделившихся от моря озер // **Микробиология**. 2019. Т. 88 (5). С. 568–582. doi: 10.1134/S0026365619050033
6. Bryantseva I.A., Tarasov A.L., Kostrikina N.A., Gaisin V.A., Grouzdev D.S., Gorlenko V.M. *Prosthecochloris marina* sp. nov., a new green sulfur bacterium from the coastal zone of the South China Sea // **Arch. Microbiology**. 2019. V. 201(10). P. 1399–1404. doi: 10.1007/s00203-019-01707-y
7. Grouzdev D.S., Burganskaya E.I., Krutkina M.S., Sukhacheva M.V., Gorlenko V.M. Genome sequence of “*Candidatus Viridilinea halotolerans*” Chok-6, isolated from a saline sulfide-rich spring // **Microbiol. Resour. Announc.** 2019. V. 8 (4). e01614-18. Doi: 10.1128/MRA.01614-18.

ГЕНЫ И ФЕРМЕНТЫ ФОСФОРНОГО ОБМЕНА ДРОЖЖЕЙ – ОВЕРЭКСПРЕССИЯ, ХАРАКТЕРИСТИКА, НОВОЕ О РОЛИ В РЕГУЛЯЦИИ УГЛЕРОДНОГО МЕТАБОЛИЗМА

Эльдаров М.А.¹, Андреева Н.А.², Думина М.В.¹, Рязанова Л.П.², Агафонов М.О.¹, Трилисенко Л.В.², Кулаковская Т.В.²

1 ИИБ ФИЦ Биотехнологии РАН

2 ИБФМ им. Г.К. Скрыбина РАН, ФИЦ Пуцинский научный центр биологических исследований РАН

Неорганические полифосфаты (полиФ) распространены во всех царствах живого и играют важную роль в клетке. ПолиФ важны для запасания фосфора и энергии, выживаемости в стрессовых условиях, регуляции клеточной подвижности, вирулентности и пр. У грибов и дрожжей полиФ вовлечены в утилизацию «нетрадиционных» источников углерода, устойчивость к тяжелым металлам, оксидативному и катионному стрессу и т.д.

Мультикомпонентная система метаболизма полиФ у *Saccharomyces cerevisiae* включает четыре полифосфатазы Ppx1, Ppn1, Ddp1 и Ppn2. Для детализации представлений о биохимических свойствах и физиологической роли данных ферментов мы разработали систему оверпродукции, выделения и очистки полифосфатаз и кислой фосфатазы PNO5.

Показано, что рекомбинантные ферменты обладают существенной вариабельностью в таких характеристиках, как соотношение экзо- и эндополифосфатазных активностей, специфичность по отношению к низко- и высокомолекулярным субстратам, в том числе нуклеозид ди-, три и тетрафосфатам, степени зависимости активности от дивалентных ионов, чувствительности к ингибиторам.

Полученные результаты *in vitro* анализа свидетельствуют как о разнице в механизмах действия, так и о различиях в физиологической роли отдельных ферментов, что находит соответствие и в данных *in vivo* анализа нокаутных штаммов.

Для метилотрофных дрожжей *O.parapolymorpha* и *K.pastoris* нами проведено сравнение содержания отдельных фракций полиФ, их субклеточной локализации, полифосфатазной активности и экспрессии генов ферментов фосфорного обмена при росте клеток на глюкозе и метаноле.

Выявлена как тесная взаимосвязь между метаболизмом полиФ и метанола, так и видоспецифические особенности динамики полиФ у метилотрофов.

Публикации

1. Andreeva N, Ledova L, Ryasanova L, Kulakovskaya T, Eldarov M The acid phosphatase Pho5 of *Saccharomyces cerevisiae* is not involved in polyphosphate breakdown // **Folia Microbiol (Praha)** 2019, 64:867–873.
2. Andreeva N, Ledova L, Ryazanova L, Tomashevsky A, Kulakovskaya T, Eldarov M. Ppn2 endopolyphosphatase overexpressed in *Saccharomyces cerevisiae*: comparison with Ppn1, Ppx1, and Ddp1 polyphosphatases // **Biochimie**. 2019, 162, 101–107.
3. Andreeva N, Ryazanova L, Zvonarev A, Trilisenko L, Kulakovskaya T, Eldarov M. Inorganic polyphosphate in methylotrophic yeasts // **Appl Microbiol Biotechnol**. 2018, 102:5235–5244.

НОВЫЙ ФОТОТРАНСФОРМИРУЕМЫЙ ФЛУОРЕСЦЕНТНЫЙ БЕЛОК SAASOTI С УНИКАЛЬНЫМИ ФОТОХИМИЧЕСКИМИ СВОЙСТВАМИ

Соловьев И.Д.^{1,2}, Гавшина А.В.¹, Савицкий А.П.^{1,2}

¹ Химический факультет МГУ им. М.В. Ломоносова

² ИНБИ ФИЦ Биотехнологии РАН

Флуоресцентный белок SAASoti обладает способностью к необратимому переходу из зеленой в красную форму под действием облучающего света $\lambda=400$ нм, а также свойством обратимого фотопереключения в темное состояние для зеленой формы ($\lambda=470$ нм), что расширяет возможности его применения в методах супер-разрешающей микроскопии. Причем оба эти свойства присутствуют в белке дикого типа, в то время как гомологичные бифотохромные белки были получены путем замены определенных аминокислотных остатков ближайшего окружения хромофора. В рамках данной работы была изучена способность красной формы хромофора обратимо переходить в темное состояние.

Полученная «классическим способом» красная форма ($\lambda=400$ нм) не обладает способностью к обратимому переходу в темное состояние, и продолжительное облучение образца красной формы SAASoti светом $\lambda=550$ нм приводит к полной фотодеструкции. Из литературы и собственных экспериментальных данных известно, что при переключении зеленой формы происходит протонирование аминокислотного остатка тирозина в хромофор-образующей триаде, поэтому было предложено получать красную форму из предварительно «выключенной» зеленой формы, так как скорость образования красной формы выше в растворах с более низким значением pH. Последовательное облучение светом $\lambda=470$ нм и $\lambda=400$ нм привело, во-первых, к увеличению скорости образования красной формы, а также к тому, что полученная таким образом красная форма SAASoti приобрела способность к частичному фотопереключению под действием света $\lambda=550$ нм с очень быстрым временем релаксации во флуоресцентное состояние. Данное явление можно объяснить химической модификацией остатков вблизи хромофора, которая происходит на первой стадии при облучении светом $\lambda=470$ нм и, возможно, обуславливает конформационную подвижность хромофора красной формы. Для подтверждения данного предположения был проведен масс-спектрометрический анализ образцов SAASoti до и после облучения светом $\lambda=470$ нм, в результате которого было установлено, что M164 подвергается частичному окислению под действием синего света, как это наблюдали ранее для другого бифотохромного белка IrisFP.

Работа проводилась при поддержке Гранта РФФИ №19-14-00373.

Публикация

Solovyev I. D., Gavshina A. V., Savitsky A. P. Novel phototransformable fluorescent protein SAASoti with unique photochemical properties // **International Journal of Molecular Sciences**. 2019. Vol. 20, no. 14. P. 3399.

СОЧЕТАНИЕ ИЗОТЕРМИЧЕСКОЙ АМПЛИФИКАЦИИ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ С ИММУНОХИМИЧЕСКИМ РАСПОЗНАВАНИЕМ КАК СРЕДСТВО ПОВЫШЕНИЯ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ АНАЛИЗА

Сафенкова И.В., Иванов А.В., Самохвалов А.В., Слущкая Э.С., Жердев А.В., Дзантиев Б.Б.

ИНБИ ФИЦ Биотехнологии РАН

Биохимические методы анализа принято разделять на молекулярно-генетические и иммунохимические. Молекулярно-генетические методы обладают высокой чувствительностью, но проигрывают в специфичности и часто обременены сложным и дорогим инструментарием. При этом для решения многих задач важна высокая чувствительность анализа, достигаемая при сочетании иммунного распознавания и амплификации нуклеиновых кислот. Наиболее эффективную интеграцию подходов обеспечивают изотермические методы амплификации, среди которых особое место занимает рекомбиназная полимеразная амплификация (РПА). Уникальность РПА обусловлена тем, что она реализуется при 37 °С за 10-15 мин. с использованием только одной пары праймеров. Матрицей для амплификации может быть как ДНК, так и РНК при добавлении обратной транскриптазы.

Нами впервые предложено использовать РПА после иммунохимического распознавания антигена на поверхности магнитных наночастиц Magsphere. Анализ разработан на примере сердечной изоформы тропонина Т (сTnT), одного из основных биомаркеров острого инфаркта миокарда. В состав иммунного комплекса антитело – сTnT – антитело вводили сигнальную последовательность ДНК (фрагмент гена eGFP), которую затем амплифицировали методом РПА. Для детекции амплифицированной ДНК использовали флуоресцеиновую метку. Разработанный иммуно-РПА обеспечивал детекцию сTnT с пределом обнаружения 12 пг/мл в течение 2 часов. Полученный предел обнаружения ниже показанного в классическом иммуноферментном анализе (520 пг/мл) и иммуноанализе в сочетании с амплификацией полимеразной цепной реакцией (иммуно-ПЦР) (21 пг/мл) [1].

Еще более многообещающей является комбинация РПА с быстрым одношаговым иммунохроматографическим анализом (ИХА). В этой системе мы использовали обратный порядок. Вначале проводится РПА целевого анализита – нуклеиновой кислоты. В ходе амплификации дцДНК фланкируется зондами – биотином и флуоресцеином (Фл). Полученная проба, содержащая ампликоны, наносится на иммунохроматографическую тест-полоску и в ходе взаимодействий на ней формируются комплексы с участием зондов, связывающих их молекул стрептавидина и антител к Фл и окрашенного маркера – наночастиц золота. Выбор оптимальной длины ампликонов, а также условий проведения РПА и ИХА был проведен на примере фрагментов модельного гена eGFP с длинами от 50 до 300 п.н. [2]. Для выбранных условий осуществлена разработка РПА-ИХА вирусного (Х вирус картофеля, ХВК) и бактериального (*Dickeya solani*) фитопатогенов. Для определения ХВК в качестве мишени был выбран фрагмент гена белка оболочки (gp5) длиной 146 п.н. РПА-ИХА с обратной транскрипцией обеспечивает предел обнаружения 140 пг ХВК на грамм листа картофеля, равный коммерческому ПЦР и в 260 раз превосходящий иммунохроматографические тест-системы. Время анализа – 30 минут [3]. Для специфичного распознавания *D. solani* мы сопоставили 5 пар праймеров, соответствующих разным участкам генома. В результате был выбран SOL-C фрагмент (117 п.н.), позволяющий обнаружить *D. solani* в концентрации от 10⁴ кл. на грамм клубня. Полученная чувствительность соответствовала чувствительности ПЦР с использованием коммерческих наборов. Время амплификации – ~15 минут при 37 °С. Со всеми основными близкородственными видами *Dickeya* и *Pectobacterium* показано отсутствие кросс-реактивности.

Полученные результаты свидетельствуют о перспективности сочетания РПА и иммуноанализа для снижения предела детекции различных практически значимых анализитов.

Публикации

1. Ivanov A.V., Safenkova I.V., Zherdev A.V., Dzantiev B.B. Recombinase polymerase amplification combined with a magnetic nanoparticle-based immunoassay for fluorometric determination of troponin T // **Microchimica Acta**, 2019, 186, 549.
2. Safenkova I.V., Ivanov A.V., Slutskaia E.S., Samokhvalov A.V., Zherdev A.V., Dzantiev B.B. Key significance of DNA-target size in lateral flow assay coupled with recombinase polymerase amplification // **Analytica Chimica Acta**, 2020, 1102, 109-118.
3. Ivanov A.V., Safenkova I.V., Zherdev A.V., Dzantiev B.B. Nucleic acid lateral flow assay with recombinase polymerase amplification: Solutions for highly sensitive detection of RNA virus // **Talanta**, 2020, 210, 120616. ИФ = 4,916.

НОВЫЕ ЭКСТРЕМАЛЬНО ГАЛОФИЛЬНЫЕ И ГАЛОАЛКАЛОФИЛЬНЫЕ АРХЕИ, СПОСОБНЫЕ К РАЗЛОЖЕНИЮ ХИТИНА И ЦЕЛЛЮЛОЗЫ

Сорокин Д.Ю., Ельченинов А.Г., Тошчаков С.В., Хижняк Т.В., Кубланов И.В.

ИНМИ ФИЦ Биотехнологии РАН

Три группы галоархей из гиперщелочных и гиперсоленых озер (Центральная Азия, Египет, Северная Америка и Россия (Кулунда)) были изолированы в чистые культуры с использованием хитина и аморфной целлюлозы в качестве субстрата для роста. Культуры из щелочных местообитаний, названные AArcht, были разделены на две группы: группа 1, одиннадцать изолятов из сильнощелочных содовых озер и группа 2, которая содержит один изолят, из щелочного гиперсоленого Searles Lake. Галофильная эвриархея, штамм HArce11^T, была обогащена и выделена в чистую культуру из поверхностных рассолов и отложений гиперсоленых озер Кулундинской степи (Алтайский край, Россия). Колонии хитиновых натроноархей были пигментированы красным и окружены большими зонами гидролиза хитина. Колонии HArce11^T имеют бледно-оранжевый цвет и образуют большие зоны гидролиза целлюлозы. Щелочные изоляты – облигатные аэробные сахаролитические археи, использующие хитин и хитозан (менее активно) в качестве единственных полимеров, а также несколько гексоз в качестве источника углерода и энергии. Галофильный изолят является облигатным аэробным гетеротрофом, способен к росту только с тремя субстратами: различными формами нерастворимой целлюлозы, ксилана и целлобиозы. Изоляты основной группы 1 обязательно алкалофилы, в то время как штамм группы 2 (AArcht-S1^T) – алкалотолерант.

Анализ генов *rRNA* и *rpoB* показал, что штамм HArce11^T образует отдельную линию в семействе *Haloarculaceae*, порядок *Halobacteriales*, с родами *Halorhabdus* и *Halopricus* в качестве ближайших родственников. На основе уникальных фено- и генотипических свойств штамм HArce11^T классифицируется в новый род и вид *Halococcoides cellulosivorans* gen. nov., sp. nov.

На основе их уникальных фенотипических свойств и отличной филогении облигатные алкалофильные изоляты AArcht (группа 1) с идентичным фенотипом классифицированы в новый род и вид *Natrarchaeobius chitinivorans* gen. nov., sp. nov., со штаммом AArch4^T в качестве типового (JCM 32476^T = UNIQEM U966^T), в то время как факультативный алкалофильный штамм AArch-S1^T (группа 2) описан как новый вид *Natrarchaeobius halalkaliphilus* sp. nov. (JCM 32477^T = UNIQEM U969^T).

Публикации:

- Sorokin D.Y., Elcheninov A.G., Toshchakov S.V., Bale N.J., Sinninghe Damste J.S., Khijniak T.V., Kublanov I.V. *Natrarchaeobius chitinivorans* gen. nov., sp. nov., and *Natrarchaeobius halalkaliphilus* sp. nov., alkaliphilic, chitin-utilizing haloarchaea from hypersaline alkaline lakes // **Syst. Appl. Microbiol.** 2019. V. 42. P. 309–318. doi: 10.1016/j.syapm.2019.01.001
- Sorokin D.Y., Khijniak T.V., Elcheninov A.G., Toshchakov S.V., Kostrikina N.A., Bale N.J., Sinninghe Damste J.S. and Kublanov I.V. *Halococcoides cellulosivorans* gen. nov., sp. nov., an extremely halophilic cellulose-utilizing haloarchaeon from hypersaline lakes // **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.** 2019. V. 69. P. 1327–1335. doi: 10.1099/ijsem.0.003312

КОНДЕНСАЦИЯ БЕЛКОВ В ОТВЕТ НА ГИПЕРОСМОТИЧЕСКИЙ ШОК - НОВАЯ ГИПОТЕЗА О СТРУКТУРЕ ЦИТОПЛАЗМЫ

Александров А.И.^{1,2}, Гросфельд Э.В.^{1,3}, Дергалева А.А.¹, Кушниров В.В.¹, Чупров-Неточин Р.Н.⁴,
Тюрин-Кузьмин П.А.⁵, Киреев И.И.², Тер-Аванесян М.Д.¹, Леонов С.В.⁴, Агафонов М.В.¹

¹ ИНБИ ФИЦ Биотехнологии РАН

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

³ Каф. молекулярной и клеточной биологии, Московский Физико-Технический Институт (Государственный Университет)

⁴ Каф. биологической и медицинской физики, Московский Физико-Технический Институт (Государственный Университет)

⁵ Кафедра биохимии и молекулярной медицины, факультет фундаментальной медицины, МГУ

Различные стрессы могут приводить к агрегации белков, и одним из таких стрессов является гиперосмотический шок. Формирование и разборка агрегатов обычно является относительно медленным процессом. В данной работе мы описывали новый, мгновенный ответ клетки на гиперосмотический шок, в ходе которого шапероны и другие белки образуют многочисленные скопления со свойствами, не характерными для классических агрегатов. Эти скопления появлялись / исчезали через несколько секунд после начала / удаления шокового воздействия, и при этом их возникновения четко совпадало с изменением объема клеток. С помощью полногеномного поиска, мы обнаружили, что подобные скопления могут образовывать шапероны, метаболические ферменты, компоненты Р-телец и амилоидогенные белки. Большинство из этих белков способны формировать макромолекулярные комплексы, и для некоторых из них нахождение в составе этих комплексов было необходимым условием для формирования скоплений. Полногеномный поиск не смог идентифицировать гены, отсутствие которых препятствовало образованию скоплений шаперона Hsp70. Морфология скоплений, изученная с помощью микроскопии сверхвысокого разрешения, показала, указывает на то, что скопления сжаты между другими объектами. Основываясь на наших результатах, мы предлагаем новую модель строения цитозоля, как совокупности множества гелеобразных областей, плавающих в «сети» жидкого раствора. Эта сеть уменьшается в объеме в ответ на гиперосмос и образует небольшие карманы между гелеобразными областями. Также в ходе работы был создан метод для микроскопического анализа большого числа образцов без использования автоматизированного оборудования.

Публикации:

1. Alexandrov, A.I., Grosfeld, E.V., Dergalev, A.A., Kushnirov, V.V., Chuprov-Netochin, R.N., Tyurin-Kuzmin, P.A., Kireev, I.I., Ter-Avanesyan, M.D., Leonov, S.V., Agaphonov, M/O. Analysis of novel hyperosmotic shock response suggests 'beads in liquid' cytosol structure // **Biol. Open**, **8**, bio044529 (2019).
2. Alexandrov, A. I. & Dergalev, A. A. Increasing throughput of manual microscopy of cell suspensions using solid medium pads // **MethodsX**, **6**, 329–332 (2019).

ИЗУЧЕНИЕ РОЛИ ВЕЩЕСТВ, ВЫДЕЛЯЕМЫХ СКЕЛЕТНОЙ МЫШЦЕЙ, В ИНДУКЦИИ РЕГЕНЕРАТИВНЫХ И ПАТОЛОГИЧЕСКИХ ПРОЦЕССОВ

Фуралёв В.А., Кравченко И.В., Попов В.О.

ИНБИ ФИЦ Биотехнологии РАН

Скелетная мышца, рассматривавшаяся ранее как чисто механический орган, выделяет в процессе своей работы множество биологически активных веществ. Исследование их участия в регенерации мышцы, в развитии её рабочей гипертрофии, а также в индукции различных патологических процессов, является важнейшей проблемой современной биохимии, имеющей не только теоретическое, но и прикладное значение. В нашей лаборатории проводятся систематические исследования, посвященные участию веществ, выделяемых скелетной мышцей, в её регенерации и развитии функциональной гипертрофии. Однако до сих пор оставалась неизученной роль низкомолекулярных веществ в развитии функциональной гипертрофии мышцы – в частности, иона K^+ , стойкое повышение концентрации которого в интерстициальной жидкости мышцы при её длительном сокращении было показано. Также осталось неизученным возможное участие секретируемых мышцей цитокинов в развитии симптомов сахарного диабета.

В ходе работы нами впервые в мире было установлено, что хлорид калия стимулирует экспрессию в миоцитах и миотубах механо-зависимого фактора роста (МФР) и инсулиноподобного фактора роста 1 (ИФР-1). Стимуляция наблюдалась как на уровне мРНК, так и на уровне белка. Статистически достоверная стимуляция наблюдалась уже при 8 – 9 мМ концентрации иона K^+ , что соответствует физиологическим условиям интенсивной мышечной нагрузки. При изучении механизма индукции ростовых факторов было выявлено, что эффект инкубации с хлоридом калия полностью снимался ингибитором Ca^{2+} -каналов всех типов хлоридом кадмия, а также ингибитором HCN-каналов ZD7288, но не снимался ингибитором Ca^{2+} -каналов L-типа нифедипином, а также $Ca_v3.2$ -каналов хлоридом никеля. Было обнаружено, что инкубация с хлоридом калия в физиологических концентрациях стимулирует также и пролиферацию миоцитов. Таким образом, в результате выполненной работы был выявлен новый механизм, обеспечивающий развитие функциональной гипертрофии мышцы после интенсивной физической нагрузки.

В ходе работы нами также впервые в мире было обнаружено, что гликированный альбумин индуцирует в мышечных клетках экспрессию таких воспалительных цитокинов, как $TNF\alpha$, $IL-1\beta$, $IL-6$ и $CCL-2$. Стимуляция наблюдалась как на уровне мРНК, так и на уровне белка. Стимуляция полностью подавлялась блокатором рецептора RAGE FPS-ZM1, что доказывает специфичность обнаруженного нами эффекта. Стимуляция экспрессии воспалительных цитокинов была более выраженной при повышенной концентрации глюкозы, что соответствует условиям сахарного диабета. Стимуляция экспрессии наблюдалась также и при концентрациях гликированных групп, соответствующих физиологическим. Было показано, что среда, кондиционированная клетками после инкубации с гликированным альбумином, снижает ответ на инсулин у дифференцированных миотуб. Полученные результаты позволили установить, что при сахарном диабете скелетная мышца отнюдь не является пассивной мишенью действия патологических факторов, но сама принимает участие в развитии системного патологического процесса на уровне всего организма.

Публикации:

1. Kravchenko IV, Furalyov VA, Popov VO. Potassium chloride released from contracting skeletal muscle may stimulate development of its hypertrophy // **Biochemistry and Biophysics Reports**. 2019; v. 18: 100627.
2. Kravchenko IV, Furalyov VA, Popov VO. Glycated albumin stimulates expression of inflammatory cytokines in muscle cells // **Cytokine**. 2020; v. 128: 154991.

МНОЖЕСТВЕННОЕ ВЫРАВНИВАНИЕ ЭУКАРИОТИЧЕСКИХ ПРОМОТОРНЫХ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ И ПОИСК ПОТЕНЦИАЛЬНЫХ СДВИГОВ РАМКИ СЧИТЫВАНИЯ В CDS

Пугачева В.М.¹, Суворова Ю.М.¹, Френкель Ф.Е.¹, Коротков Е.В.^{1,2}

¹ ИИБ ФИЦ Биотехнологии РАН

² Национальный Исследовательский Ядерный Университет «МИФИ», Москва, Россия

Разработка алгоритмов множественного выравнивания нуклеотидных и аминокислотных последовательностей является одной из центральных задач биоинформатики. Мы разработали новый математический метод для создания множественного выравнивания для сильно различающихся нуклеотидных последовательностей (MAVDS). Под сильно различающимися последовательностями будем понимать последовательности, накопившие более 2.5 случайных замен (х) на один нуклеотид относительно друг друга. MAVDS позволяет строить статистически значимые выравнивания для х в интервале от 2.5 до 4.4. Мы показали, что ранее разработанные алгоритмы могут строить статистически значимые множественные выравнивания до $x < 2.4$.

MAVDS был применен для решения двух задач. К первой задаче относится поиск потенциальных мутаций посредством сдвига рамки считывания в *cds*. В результате удалось обнаружить неожиданно большое количество потенциальных сдвигов рамки считывания в последовательностях *cds* из генома *A.thaliana*, которое составило 9930 при уровне ошибок первого и второго рода приблизительно в 12% и 30%. Это составляет примерно 21% от всех известных *cds* из этого генома. Аналогичные результаты были получены и для геномов *C.elegans*, *D.melanogaster*, *H.sapiens*, *R.norvegicus*, *X.tropicalis*. Ко второй задаче относится построение множественного выравнивания и классификация промоторных последовательностей из генома *A.thaliana* (-499+100). Ранее статистически значимое множественное выравнивание промоторов не было создано всеми разработанными методами, так как для них $x=3.6$. Всего было получено 16 статистически достоверных классов промоторных последовательностей с размерами классов от 8000 до 100 промоторов из генома *A.thaliana*. В работе показано, что многие районы промоторных последовательностей от -499 до +1 являются сильно консервативными. Участки от +1 до +70 вносят большой вклад в создание множественного выравнивания промоторов.

Публикации:

1. A.Nor, E.Korotkov Search of Fuzzy Periods in the Works of Poetry of Different Authors // **Advances in Fuzzy Systems**, Volume 2018, Article ID 4028417, 10 pages <https://doi.org/10.1155/2018/4028417>
2. Suvorova, Y.M., Korotkova, M.A., Skryabin, K.G., Korotkov, E.V. Search for potential reading frameshifts in *cds* from *Arabidopsis thaliana* and other genomes // **DNA Research**, v.26, 157-170, 2019. DOI: 10.1093/dnares/dsy046.
3. Suvorova, Y.M., Pugacheva, V.M., Korotkov, E.V. A Database of Potential Reading Frame Shifts in Coding Sequences from Different Eukaryotic Genomes // **Biophysics (Russian Federation)**, v.64, 339-349, 2019. DOI: 10.1134/S0006350919030217.
4. Korotkov, E.V., Korotkova, M.A. Developing mathematical method for multi alignment of DNA sequences with weak similarity // **Journal of Physics: Conf. Series**, V. 1205 (2019) 012025 IOP Publishing, doi:10.1088/1742-6596/1205/1/012025.
5. Suvorova Yu.M. and Korotkov E.V. New Method for Potential Fusions Detection in Protein-Coding Sequences // **Journal of Computational Biology**. 2019. 2019 Nov;26(11):1253-1261 DOI: 10.1089/cmb.2019.0122.

ТЕРМОСТАБИЛЬНОСТЬ ТРИМЕРОВ И МОНОМЕРОВ ФОТОСИСТЕМЫ I ЦИАНОБАКТЕРИИ *ARTHROSPIRA PLATENSIS*

Болычевцева Ю.В., Терехова И.В., Шубин В.В., Юрина Н.П.

ИНБИ ФИЦ Биотехнологии РАН

Исследование функционирования фотосинтетического аппарата цианобактерий включает как фундаментальные, так и прикладные проблемы. Одна из фундаментальных проблем – роль каротиноидов в организации и функционировании фотосистем. Прикладная проблема заключается в попытке создать искусственные системы, способные превращать энергию солнца в энергию химических связей водорода или генерировать фототок, так как солнечная энергия – самый легкодоступный вид возобновляемой энергии. Эти проблемы тесно взаимосвязаны. Поскольку фотосистема I (ФС I) цианобактерий часто используется для создания альтернативных источников энергии, представляет интерес изучение устойчивости пигментного аппарата тримеров и мономеров ФС I к различным условиям среды, например, к изменению температуры. В связи с этим были изучены изменения спектров кругового дихроизма пигментов антенны и кинетики фотоокисления первичного донора электронов (P700) у тримерных и мономерных комплексов ФС I из *Arthrospira platensis* после их инкубации при повышенных температурах. Показано, что 10%-ное падение амплитуды сигналов кругового дихроизма антенного хлорофилла наблюдалось после нагревания мономеров до 60°, а тримеров до 70°C. Тепловое нарушение пространственной организации антенного хлорофилла коррелировало с уменьшением концентрации фотоактивного P700. Падение начальной скорости фотоокисления P700, наблюдавшееся уже после 40°C как для мономеров, так и для тримеров ФС I, происходило параллельно со снижением интенсивности полосы кругового дихроизма каротиноидов тримеров, но не мономеров, что, по-видимому, обусловлено различием каротиноидного состава этих комплексов. Вероятно, изменение кинетики фотоокисления P700 комплексов фотосистемы I при 40–60°C связано не с нарушением процесса миграции энергии на реакционный центр, а с изменением состояния акцепторной части, в частности вторичного акцептора – филлохинона.

Публикации:

1. Болычевцева Ю. В., Терехова И. В., Шубин В. В., Юрина Н. П. Термостабильность мономеров и тримеров фотосистемы I цианобактерии *Arthrospira platensis* // **Прикладная биохимия и микробиология**, 2019, том 55, № 3, с. 286-292.
2. Zlenko D.V., Elanskaya I.V., Lukashev E.P., Bolychevtseva Y.V., Suzina N.E., Pojidaeva E.S., Kononova I.A., Loktyushkin A.V., Stadnichuk I.N. Role of the PB-loop in ApcE and Phycobilisome Core Function in Cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 // **ВВА**, 2019, 1860, 155-166.
3. Шарапова Л.С., Акулинка Д.В., Болычевцева Ю.В., Еланская И.В., Юрина Н.П. Изучение локализации низкомолекулярных стресс-индуцируемых белков, защищающих фотосинтетический аппарат от фотодеструкции // **Прикладная биохимия и микробиология**, 2019, т. 55, № 1, 69-76.

СОСТАВ И МНОГООБРАЗИЕ ФУНКЦИЙ МАТРИКСА МИКРОБНЫХ БИОПЛЕНОК. АНТИ- И ПРОБИОПЛЕНОЧНЫЕ АГЕНТЫ

Плакунов В.К.¹, Журина М.В.¹, Ганнесен А.В.¹, Мартьянов С.В.¹, Фейоле М.², Николаев Ю.А.¹

¹ ИНМИ ФИЦ Биотехнологии РАН

² Лаб. микробиологии, сигналов и микроокружения LMSM EA4312 Университета Руана

Предложена классификация антибиопленочных агентов, основанная на избирательности их воздействия на процессы формирования микробных биопленок. На примере биопленок представителя микробиоты кожи человека *Cutibacterium acnes* разработан метод изолирования внеклеточного полимерного матрикса (ВПМ) и определен состав его биохимических компонентов. Получены бинарные биопленки, включающие грамположительные бактерии *Micrococcus thailandicus* НВ и *Kocuria rhizophila* 4А-2Ж, а также грамотрицательные бактерии *Escherichia coli* К-12 и штамм ET12567 pRAG56, содержащий в составе плазмиды фермент аминокликозидфосфотрансферазу, инактивирующую канамицин. Продемонстрирован защитный эффект менее чувствительных к антибиотикам грамотрицательных бактерий в отношении более чувствительных грамположительных. Разработан новый кинетический метод избирательного выявления метаболически активных грамположительных бактерий в составе бинарных биопленок с *E. coli*, основанный на различиях в скорости восстановления акцептора электронов 3-(4,5-диметил-тиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолий бромида (МТТ). Наличие защитного эффекта подтверждено несколькими методами (динамика восстановления МТТ, денситометрическая оценка скорости окрашивания биопленок, подсчет числа КОЕ). Получено прямое доказательство защитной роли ВПМ при действии антибиотика азитромицина на бинарную биопленку, включающую штамм WT *Chromobacterium violaceum* ATCC 31532 с полноценным ВПМ, и мутантный биосенсорный штамм *C. violaceum* CV026 с нарушенным синтезом ВПМ.

В рамках междисциплинарного проекта РФФИ 18-29-05048 разработан экспресс-метод, позволяющий в несколько раз ускорить оценку защитного действия катионных биоцидов на биокоррозию полиэтилена мультивидовыми микробными биопленками. Изучена роль ВПМ в процессе биокоррозии. В рамках проекта РФФИ 19-74-10071 проводятся исследования воздействия регуляторных гуморальных факторов на моновидовые и мультивиодовые биопленки микроорганизмов-представителей микробиоты кожи человека.

Публикации:

1. Gannesen A.V., Zdrovenko E.L., Botchkova E.A., Hardouin J., Massier S., Kopitsyn D.S., Gorbachevskii M.V., Kadykova A.A., Shashkov A.S., Zhurina M.V., Netrusov A.I., Knirel Y.A., Plakunov V.K., Feuilloley M.G.J. Composition of the biofilm matrix of *Cutibacterium acnes* acneic strain RT5 // **Front. Microbiol.** 2019. V. 10:1284. doi: 10.3389/fmicb.2019.01284.

Плакунов В.К., Николаев Ю.А., Ганнесен А.В., Чемаева Д.С., Журина М.В. Новый подход к выявлению защитной роли *Escherichia coli* в отношении грамположительных бактерий при действии антибиотиков на бинарные биопленки // **Микробиология.** 2019. Т. 88. № 3. С. 288-296.

Журина М.В., Николаев Ю.А., Плакунов В.К. Роль внеклеточного полимерного матрикса в защитном эффекте при действии антибиотика азитромицина на *Chromobacterium violaceum* // **Микробиология.** 2019. Т. 88. № 4. С. 497-500.

Плакунов В.К., Журина М.В., Ганнесен А.В., Мартьянов С.В., Николаев Ю.А. Антибиопленочные агенты: неоднозначность терминологии и стратегия поиска // **Микробиология.** 2019. Т. 88. № 6. С. 705-709.

В ПОИСКАХ ГЕНОВ, КОНТРОЛИРУЮЩИХ НАКОПЛЕНИЕ АСКОРБИНОВОЙ КИСЛОТЫ В ПЛОДАХ ТОМАТА

Слугина М.А., Тяпкина Д.Ю., Щенникова А.В., Кочиева Е.З.

ИНБ ФИЦ Биотехнологии РАН

В растениях одним из наиболее важных антиоксидантов является L-аскорбиновая кислота (АК). Известно четыре пути биосинтеза АК, но контролирующие их гены малоизучены. В настоящей работе впервые клонированы, секвенированы и охарактеризованы полноразмерные нуклеотидные последовательности гомологов ключевых генов L-галактозного пути биосинтеза и рециркуляции АК – *VTC2*, *GME*, *GMP*, *DHAR1* у 11 образцов дикорастущих и культивируемых видов томата (*Solanum section Lycopersicon*), различающихся содержанием витамина С в плодах. Определена их экспрессия в листьях, корнях, цветках, а также в динамике созревания плодов у сортов и дикорастущих видов томата.

Методом ВЭЖХ было определено количественное содержание АК на 4-х стадиях развития плода (завязавшийся плод, растущий плод, бланжевый плод, плод в биологической спелости) у 11 видов и 21 сорта томата. Содержание АК в плодах дикорастущих видов было в 1.24 раза ниже среднего значения у исследованных сортов *S. lycopersicum*. Анализ сортов томата выявил сорта с содержанием АК, в 2 раза превышающим средние значения.

У идентифицированных гомологов *VTC2*, *GME*, *GMP*, *DHAR1* описан полиморфизм нуклеотидных и соответствующих аминокислотных последовательностей и определены экзон-интронная структура и структурные и функциональные домены и мотивы. В отличие от последовательностей гомологов *VTC2*, *GME*, *GMP*, *DHAR1* дикорастущих видов томата, в составе которых выявлены SNPs и индели, последовательности генов у всех анализируемых сортов томата овощного были инвариантны. Полученные последовательности были использованы для анализа филогении представителей *Solanum*, результатом которого стало характерное разделение секции *Lycopersicon*, свидетельствующее о направлении эволюции томата от зеленоплодных перекрестноопыляемых видов к красноплодным самоопыляемым.

Проведенный РВ-ПЦР-анализ экспрессии генов показал, что у всех исследуемых образцов томата уровень транскрипции генов L-галактозного пути *VTC2*, *GME*, *GMP*, *DHAR1* в листьях и цветках максимален, тогда как в плодах он существенно ниже. Сопоставление данных ВЭЖХ по содержанию АК в созревшем плоде с уровнем экспрессии *VTC2*, *GME* и *GMP* не выявило достоверных корреляций. РВ-ПЦР-анализ исследуемых генов в динамике развития плода показал, что у красноплодных видов томата и сортов *S. lycopersicum* экспрессия *DHAR1* уменьшается по мере роста плода и накопления АК в клетках. Таким образом, ни для одного из тестируемых генов, которые, как считалось, оказывают ключевое влияние на биосинтез АК в листьях, не обнаружено корреляций, связанных с определением содержания витамина С в плодах томата. Таким образом, получены данные, свидетельствующие о том, что биосинтез АК в плодах томата отличается от биосинтеза АК в листьях. Предполагается наличие в плодах путей метаболизма АК, альтернативных L-галактозному пути, который является основным путем биосинтеза АК в листьях.

Полученные результаты представлены на трех конференциях (устный и два стендовых доклада) и опубликованы (две статьи в российских журналах).

Работа выполнена при поддержке РФФИ (№ 18-316-00033) и Министерства науки и высшего образования РФ.

Публикации:

1. Тяпкина Д.Ю., Кочиева Е.З., Слугина М.А. Идентификация и анализ вариабельности генов-гомологов биосинтеза L-аскорбиновой кислоты *VTC2* у видов томата (*Solanum* секция *Lycopersicon*) // Доклады Академии наук. 2018, Т. 483, № 6, стр. 374-378. doi: 10.1134/S1607672918060212.
2. Тяпкина Д.Ю., Кочиева Е.З., Слугина М.А. Накопление витамина С в сочных плодах: биосинтез и рециркуляция, гены и ферменты // Вавиловский журнал генетики и селекции. 2019;23(3):270-280 <https://doi.org/10.18699/VJ19.492>

ВЗАИМОСВЯЗИ МЕЖДУ МИКРОСКОПИЧЕСКИМИ РАССЧИТЫВАЕМЫМИ ВЕЛИЧИНАМИ И ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНО НАБЛЮДАЕМЫМИ СВОЙСТВАМИ В БИОМОЛЕКУЛЯРНЫХ СИСТЕМАХ

Хренова М.Г.^{1,2}, Кривицкая А.В.^{1,3}, Левина Е.О.^{1,3}, Цирельсон В.Г.³, Немухин А.В.^{2,4}

¹ ИНБИ ФИЦ Биотехнологии РАН

² МГУ имени М.В. Ломоносова, химический факультет

³ РХТУ имени Д.И. Менделеева

⁴ ИБХФ имени Н.М. Эмануэля РАН

Современные методы молекулярного моделирования позволяют корректно описывать химические реакции и фотохимические процессы. Следующим закономерным шагом является микроскопическая интерпретация наблюдаемых свойств и разработка способов управления ими. В докладе представлены результаты молекулярного моделирования, полученные для двух различных объектов: хромофора зеленого флуоресцентного белка и бактериального фермента L1 металло- β -лактамазы. Для них был проведен поиск ключевых микроскопических свойств, определяющих экспериментально наблюдаемые величины. Для хромофора зеленого флуоресцентного белка, находящегося в стэкинге с органическими ароматическими молекулами, показано, что изменение электронной плотности в результате электронного перехода $S_{0^{\text{min}}}-S_1$ определяет величину смещения полосы поглощения относительно системы без стэкинг-взаимодействий. Для ферментативной реакции в активном центре L1 металло- β -лактамазы показано, что скорость гидролиза цефалоспориновых соединений зависит от силы водородной связи, образующейся в ходе лимитирующей стадии реакции. Важность полученных результатов в том, что предлагаемый подход позволяет рассчитывать выбранные микроскопические параметры с более высокой точностью, чем величины, напрямую сопоставимые с экспериментальными значениями. Это является шагом к более точному прогнозированию новых соединений и биомакромолекул с заданными свойствами.

Публикации:

1. M.G. Khrenova, A.V. Krivitskaya, V.G. Tsirelson. The QM/MM-QTAIM approach reveals the nature of the different reactivity of cephalosporins in the active site of L1 metallo- β -lactamase // **New J. Chem.**, 2019. V. 43. P. 7329–7338.
2. M.G. Khrenova, A.V. Nemukhin, V.G. Tsirelson. Origin of the π -stacking induced shifts in absorption spectral bands of the green fluorescent protein chromophore // **Chem. Phys.**, 2019. V. 522. P. 32–38.
3. E.O. Levina, M.G. Khrenova, A.A. Astakhov, V.G. Tsirelson. Revealing electronic features governing hydrolysis of cephalosporins in the active site of the L1 metallo- β -lactamase // **RSC Advances**. 2020 (в печати).

ЧЕРНАЯ ЛЬВИНКА КАК НОВЫЙ ИСТОЧНИК ХИТОЗАНА И ЕГО СОЕДИНЕНИЙ

Хайрова А.Ш., Лопатин С.А., Варламов В.П.

ИНБ, ФИЦ Биотехнологии РАН

Хитин является вторым по распространенности полисахаридом на земле после целлюлозы. Хитозан, производное хитина, получают в результате реакции деацетилирования. Благодаря своим исключительным биологическим свойствам, хитозан привлек широкое внимание исследователей во всем мире и может использоваться во многих областях промышленности и биомедицины. Поскольку спектр применения хитина и хитозана расширяется, поиск новых источников этих биополимеров остается актуальной задачей. Одним из них могут быть насекомые, где хитин составляет до 50% экзоскелета.

В настоящее время активно развивается технология по экологически безопасной переработке органических отходов с помощью личинок черной львинки *Hermetia illucens*. Это дает возможность максимально эффективно использовать продовольственные потери и пищевые отходы, возвращая в рацион сельскохозяйственных животных и птиц необходимый кормовой белок.

Помимо кормового белка и биогумуса насекомое (в различных стадиях онтогенеза) является источником сырья для получения хитина, его производного хитозана и меланиновых комплексов. На более ранних стадиях развития (личинка) можно получать чистый хитин и хитозан, в то время как на более поздних стадиях (кутикула куколки, подмор) - хитин/хитозан-меланиновые комплексы.

Таким образом, в этой работе были впервые получены и охарактеризованы хитозан, хитин- и хитозан-меланиновые комплексы из *H. illucens*. Хитозан-меланиновые комплексы были разделены на две фракции: растворимую при нейтральных и кислых рН и нерастворимую в этих условиях. Известно, что меланин растворим в щелочных значениях рН и соответствующие полученные комплексы позволяют получать меланиновые соединения, растворимые при кислых рН. Были подобраны оптимальные условия для удаления примесей из хитин содержащего сырья. Ожидается, что благодаря синергетическому эффекту хитозан-меланиновые комплексы могут иметь более высокую биологическую активность по сравнению с чистыми хитином и хитозаном и являются перспективными объектами для дальнейшего изучения.

Публикации:

1. Хайрова А.Ш., Лопатин С.А., Сеницына О.А., Сеницын А.П., Варламов В.П. Получение хитина из черной львинки *Hermetia illucens* путем прямой экстракции // **Известия Уфимского научного центра РАН**. 2018. №3(2). С. 84-88.
2. Khayrova A., Lopatin S., Varlamov V. Black Soldier Fly *Hermetia illucens* as a Novel Source of Chitin and Chitosan // **International Journal of Sciences**. 2019. №8(4). P. 81-86.
3. Лопатин С.А., Хайрова А.Ш., Варламов В.П., Соколов И.В. Способ получения хитина из личинок черной львинки *Hermetia illucens* // **Патент РФ** №2680691, Бюл. № 6, 2019.
4. Лопатин С.А., Хайрова А.Ш., Варламов В.П., Соколов И.В. Способ получения ковалентно-связанного хитозан-меланинового комплекса из мухи черная львинка *Hermetia illucens*. // **Заявка на патент РФ** (рег. номер 2019144495).

СТРУКТУРА ПРИОНА ДРОЖЖЕЙ SUP35: ДВА ТИПА, ЧЕТЫРЕ ЭЛЕМЕНТА, МНОГО ВАРИАНТОВ

Дергалева А.А., Александров А.И., Иванников Р.И., Тер-Аванесян М.Д., Кушниров В.В.

ФИЦ Биотехнологии РАН

Прион дрожжей [*PSI+*], образованный белком Sup35 (eRF3), имеет несколько структурных вариантов, различающихся по выраженности нонсенс-супрессорного фенотипа. Прионная структура Sup35 и ее вариация охарактеризованы слабо. Мы картировали амилоидные ядра Sup35 из 26 изолятов [*PSI+*] различного происхождения путем расщепления протеиназой К и масс-спектрометрической идентификации устойчивых пептидов. Во всех вариантах [*PSI+*] аминокислотные остатки Sup35 2-32 были полностью устойчивы к протеиназе, а область до остатка 72 была частично устойчивой. Устойчивые к протеиназе К структуры также были обнаружены в областях 73-124, 125-153 и 154-221, но их присутствие различалось у изолятов [*PSI+*]. В области 2-72 наблюдались два типа структуры, которые всегда коррелировали с «сильным» и «слабым» [*PSI+*] нонсенс-супрессорными фенотипами. Кроме того, все [*PSI+*] со «слабой» структурой излечивались с помощью мультикопийного гена *HSP104* и не были токсичными в сочетании с мультикопийным *SUP35*. [*PSI+*] с «сильной» структурой проявлял противоположные свойства, будучи устойчивым к мультикопийному *HSP104* и летальным при мультикопийном *SUP35*. Таким образом, прионные ядра Sup35 могут содержать до четырех отдельных элементов. Варианты [*PSI+*] можно разделить на два класса, надежно различаемых исходя из структуры первого элемента и описанных тестов.

Публикация:

Dergalev, A.A., Alexandrov A.I., Ivannikov, R.I., Ter-Avanesyan, M.D., Kushnirov, V.V. Yeast Sup35 Prion Structure: Two Types, Four Parts, Many Variants // *Int J Mol Sci.*; **20**, pii: E2633 (2019).

МИКРОБНАЯ ЭКОСИСТЕМА МЕРОМИКТИЧЕСКОГО ОЗЕРА ТРЁХЦВЕТНОЕ, ОТДЕЛИВШЕГОСЯ ОТ БЕЛОГО МОРЯ

Летаров А.В.^{1,2}, Саввичев А.С.¹, Летарова М.А.¹, Лунина О.Н.¹, Бабенко В.В.³, Болдырева Д.И.³, Краснова Е.Д.²

¹ ИИМИ ФИЦ Биотехнологии РАН

² Биологический факультет МГУ им. М.В. Ломоносова

³ ФНКЦ Физико-химической медицины ФМБА России

Озеро Трехцветное – это небольшой стратифицированный водоем, отделившийся от Кандалакшского залива Белого моря. Существующий в толще озера галоклин препятствует конвекции, что приводит к возникновению анаэробных условий и накоплению в мнимомolimнионе сероводорода. Диффузионный ток сероводорода, полностью перехватывается на глубине около 1.9–2.0 м высокоплотным сообществом слоя биофильтра. В этом слое преобладают зеленые серные бактерии (ЗСБ), достигающие концентрации более 10^8 клеток мл⁻¹, при интенсивности аноксигенного фотосинтеза до 210 мкмоль С л⁻¹. По данным метагеномики доминирующим видом ЗСБ в биофильтре оз. Трехцветное является *Chlorobium phaeovibrioides*, при этом практически вся биомасса доминирующего вида представлена единственным штаммом. Культуральными методами был обнаружен также минорный коричнево-окрашенный штамм *Chl. phaeovibrioides*. Доминирующая популяция ЗСБ испытывает существенное давление фаговой инфекции, о чем свидетельствует адаптация CRISPR касет к одному из обнаруженных в метагеноме вирусных генотипов, а также большое число противовирусных систем, обнаруженных в геноме этого штамма. Секвенирование геномов зеленого и коричнево-окрашенного изолятов ЗСБ обнаружило, что эти близкородственные изоляты существенно отличаются по организации геномов. При этом доминирующий зеленый штамм имеет две кольцевые и одну линейную плазмиды, а также несет 8 различных антивирусных систем, которые отсутствуют у коричневого изолята.

Таким образом, основной вклад в поток энергии в водной колонне оз. Трехцветное вносят процессы цикла серы. Высокая интенсивность потока H₂S способствует развитию высокоплотного сообщества ЗСБ, в котором, несмотря на существенное давление фаговой инфекции, наблюдается доминирование единственного штамма *Chl. phaeovibrioides*.

Публикации:

1. Savvichev A.S., Babenko V.V., Lunina O.N., Letarova M.A., Boldyreva D.I., Veslopolova E.F., Demidenko N.A., Kokryatskaya N.M., Krasnova E.D., Gaisin V.A., Kostryukova E.S., Gorlenko V.M., Letarov A.V. Sharp water column stratification with an extremely dense microbial population in a small meromictic lake, Trekhtzvetnoe // **Environ. Microbiol.** 2018. V. 20. P. 3784-3797. doi: 10.1111/1462-2920.14384.
1. Boldyreva D.I., Babenko V.V., Kanygina A.V., Lunina O.N., Letarova M.A., Kostryukova E.S., Savvichev A.S., Gorlenko V.M., Letarov A.V. Genome Sequences of a Green-Colored *Chlorobium phaeovibrioides* Strain Containing Two Plasmids and a Closely Related Plasmid-Free Brown-Colored Strain // **Microbiol. Resour. Announc.** 2020. pii: e01172-19. doi: 10.1128/MRA.01172-19.

ФЕРМЕНТАТИВНОЕ ПОЛУЧЕНИЕ ЭЛЕКТРОПРОВОДЯЩИХ СОПОЛИМЕРОВ АНИЛИНА С ФУНКЦИОНАЛЬНЫМИ ГРУППАМИ

Хлупова М.Е.¹, Морозова О.В.¹, Шумакович Г.П.¹, Васильева И.С.¹, Зайцева Е.А.², Ярополов А.И.¹

¹ ИНБИ ФИЦ биотехнологии РАН

² Химический факультет МГУ им. М.В.Ломоносова

Лакказы-медиаторные системы (ЛМС) интенсивно используются как для деградации различных ксенобиотиков, так и для синтеза новых соединений. ЛМС на основе высоко редокс-потенциальной грибной лакказы *Trametes hirsuta* и редокс-медиатора гидроксibenзотриазола была использована для сополимеризации анилина и 2-аминофэнетилового спирта на «мягкой» матрице поли(2-акриламидо-2-метил-1-пропансульфокислоте) (ПАМПС). Атмосферный кислород являлся терминальным окислителем. В результате биокаталитической реакции был получен электропроводящий интерполимерный комплекс сополимер/ПАМПС, имеющий в своем составе реакционноспособные альдегидные группы, к которым было ковалентно «пришито» модельное физиологически активное соединение – 3,4-дигидрокси-L-фенилаланин. Исследованы физико-химические характеристики полученного интерполимерного комплекса.

Публикация:

Khlopova M., Morozova O., Shumakovich G., Vasil'eva I., Zaitseva E., Yaropolov A. One-pot catalytic synthesis of aniline-copolymer-containing reactive aldehyde groups using a laccase-mediator system // **ChemistrySelect**, 2019, 4 (35), 10517-10519

МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЕ И БИОГЕОХИМИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ВОДОЕМОВ ВОРОНОК ГАЗОВЫХ ВЫБРОСОВ ПОЛУОСТРОВА ЯМАЛ

Саввичев А.¹, Кадников В.², Лейбман М.³, Дворников Ю.³, Каллистова А.¹, Равин Н.², Хомутов А.³, Пименов Н.¹

¹ИНМИ ФИЦ Биотехнологии РАН

²ИНБ ФИЦ Биотехнологии РАН

³Институт криосферы Земли СО РАН, г. Тюмень

Газоэмиссионные кратеры (ГЭК), они же «воронки газового выброса», известные на полуострове Ямал, активно изучаются исследователями самого широкого профиля. Интерес к ГЭК связан, прежде всего, с необходимостью прогноза их появления. После взрыва воронки ГЭК постепенно заполняются атмосферными и тальными водами. Водная толща ГЭК пополняется органическим веществом аллохтонного и автохтонного генезиса. Мы полагаем, что микробная активность и микробное разнообразие могут быть показателями, позволяющими отличать озера ГЭК от озер иного генезиса.

Настоящая работа направлена на сравнение активности и разнообразия микробные сообщества в молодых озерах ГЭК и зрелых фоновых озерах Центрального Ямала. В результате проведенных исследований было показано, что озера ГЭК отличались от фоновых медленными темпами анаэробных процессов (метаногенез, восстановление сульфатов), а также низким содержанием и разнообразием архей (преимущественно метаногенов) в составе всего микробного сообщества. Интенсивность микробной сульфатредукции была явно выше в донных отложениях фоновых озер. Микроорганизмы, окисляющие метан (аэробные и анаэробные метанотрофы), были сходными во всех изученных озерах и представлены *Methylobacter* и ANME 2d; скорости окисления метана также были близкими. Актинобактерии, Bacteroidetes, Betaproteobacteria и Acidobacteria преобладали в обоих типах озер. Можно сделать вывод, что очень медленное течение анаэробных микробных процессов указывает на длительное (возможно, на протяжении многих тысячелетий) превращение вновь образованных водоемов (т.е. озер ГЭК) в настоящие озера. Это может относиться не только к озерам ГЭК, но и к вновь образованным термокарстовым озерам.

Публикация:

Savvichev A., Leibman M., Kadnikov V., Kallistova A., Pimenov N., Ravin N.; Dvornikov Y.; Khomutov A. Microbiological Study of Yamal Lakes: A Key to Understanding the Evolution of Gas Emission Craters // **Geosciences**. 2018. V. 8. N. 12. P. 478–496. <https://doi.org/10.3390/geosciences8120478>.

УГЛЕВОДНЫЙ И ЛИПИДНЫЙ СПЕКТРЫ ЭКСТРЕМОФИЛЬНЫХ ДРОЖЖЕЙ *YARROWIA LIPOLYTICA* В УСЛОВИЯХ ТЕМПЕРАТУРНОГО И pH-СТРЕССА

Секова В.Ю.¹, Дергачева Д.И.¹, Терешина В.М.², Гесслер Н.Н.¹, Исакова Е.П.¹, Дерябина Ю.И.¹

¹ ИНБИ ФИЦ биотехнологии РАН

² ИНМИ ФИЦ биотехнологии РАН

Микроорганизмы адаптируются к широкому спектру экологических факторов, используя различные механизмы. Высокая приспособительная способность низших эукариот – дрожжей – эффективно существовать при экстремальных значениях pH окружающей среды и высоких температурах хорошо известна, однако, механизм этой адаптации до конца не раскрыт. В представленном исследовании мы изучали динамику липидного и углеводного профилей дрожжевых клеток экстремофильного штамма *Yarrowia lipolytica* W29 при различных условиях культивирования. Результаты показали, что клетки, выращенные при различных значениях pH и оптимальной температуре, содержали маннит в качестве основного цитозольного сахароспирта. Повышенная температура (+38°C) приводила к увеличению общего количества цитозольных углеводов в 2-3 раза при одновременной замене маннита на трегалозу. Липидный состав в клетках при оптимальной температуре изменялся незначительно при любом протестированном pH. Повышение температуры вызывало некоторое снижение уровня запасных и мембранных липидов, а также заметные изменения в их составе и степени ненасыщенности жирных кислот. Было показано, что состав жирных кислот некоторых мембранных фосфолипидов значительно варьирует при изменении значений pH и температуры. Представленные данные доказывают ключевую роль и гибкость углеводного и липидного состава *Y. lipolytica* W29 в адаптации к неблагоприятным условиям окружающей среды.

Публикации:

1. Секова В.Ю., Исакова Е.П., Дерябина Ю.И., Дергачева Д.И., Терешина В. М. Углеводный спектр экстремофильных дрожжей *Yarrowia lipolytica* в условиях pH-стресса // **Микробиология**, 2018, Том 87, №2, стр. 125-135.
2. Sekova V.Y., Dergacheva D.I., Isakova E.P., Gessler N.N., Tereshina V.M., Deryabina Y.I. Soluble Sugar and Lipid Readjustments in the *Yarrowia lipolytica* Yeast at Various Temperatures and pH // **Metabolites**. 2019; 9(12).

ФИКСАЦИЯ АЗОТА ФОТОТРОФНЫМИ СООБЩЕСТВАМИ СОДОВЫХ ОЗЁР КУЛУНДИНСКОЙ СТЕПИ

Самылина О.С.¹, Намсараев З.Б.², Турова Т.П.¹, Груздев Д.С.³, Сорокин Д.Ю.¹

¹ИНМИ ФИЦ Биотехнологии РАН

²НИЦ Курчатовский институт

³ИНБ ФИЦ Биотехнологии РАН

Озёра Кулундинской степи (Алтайский край) – единственный пример гиперсолёных содовых озёр на территории России. Для них характерен переменный гидрологический режим с высокоамплитудными циклическими колебаниями физико-химических параметров при незначительных колебаниях рН. Доступность азота является одним из важнейших факторов, лимитирующих продуктивность экосистем, но diaзотрофный сегмент цикла азота в содовых условиях до сих пор остается малоизученным, в особенности, его аэробная часть. Целью наших многолетних (2008–2016 гг.) исследований было изучение *in situ* закономерностей фиксации азота фототрофными сообществами различных содовых озёр Кулундинской степи.

В результате было установлено, что фототрофные сообщества исследуемых озёр фиксируют молекулярный азот в широком диапазоне солёности (25–400 г/л), и показано, что солёность является основным фактором, влияющим на разнообразие и активность diaзотрофов в этих сообществах. С использованием микроскопических и молекулярно-биологических методов установлено, что фототрофные diaзотрофы в исследованных сообществах представлены различными цианобактериями и пурпурными серными бактериями *Ectothiorhodospira* sp. Среди diaзотрофных цианобактерий выявлены гетероцистные (*Nodularia harveyana*, *Nodularia spumigena*), нитчатые негетероцистные (*Geitlerinema* sp., *Nodosilinea* sp.) и одноклеточные (*Euhalothece* sp.). Сообщества с гетероцистными цианобактериями развивались при солёности до 60 г/л и фиксировали азот как днём, так и ночью. Сообщества с негетероцистными цианобактериями фиксировали азот в светлое время суток при солёностях 55–100 г/л, но при 100 г/л скорость процесса существенно снижалась. При солёности 160–210 г/л сообщества хоть и встречались, но находились в угнетённом состоянии, и фиксацию азота осуществляли гетеротрофные микроорганизмы в тёмное время суток. При максимальных засолениях (выше 350 г/л) между кристаллами выпадающей в осадок троны развивались сообщества с доминированием одноклеточных экстремофильных цианобактерий *Euhalothece* sp., и фиксация азота проявлялась вновь в светлое время суток.

Светозависимый характер фиксации азота и разнообразие *nifH*-генов в широком диапазоне солёности указывают на важную роль цианобактерий в этом процессе. Вклад аноксигенных пурпурных серных бактерий *Ectothiorhodospira* sp. остаётся неясным, несмотря на широкое распространение этих бактерий во всем исследованном диапазоне солёности.

Публикации:

1. Namsaraev Z., Samylyna O., Sukhacheva M., Borisenko G., Sorokin D., Tourova T. Effect of salinity on diazotrophic activity and microbial composition of phototrophic communities from Bitter-1 soda lake (Kulunda Steppe, Russia) // **Extremophiles**. 2018. V. 22. № 4. P. 651–663.
2. Samylyna O.S., Namsaraev Z.B., Grouzdev D.S., Slobodova N.V., Zelenev V.V., Borisenko G.V., Sorokin D.Y. The patterns of nitrogen fixation in haloalkaliphilic phototrophic communities of Kulunda Steppe soda lakes (Altai, Russia) // **FEMS Microbiol. Ecol.** 2019. V. 95. Iss. 11. fiz174.

СРАВНИТЕЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ СТРУКТУРНЫХ И ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ СВОЙСТВ РАЗЛИЧНЫХ ИЗОФОРМ ТРОПОМИОЗИНА СКЕЛЕТНЫХ МЫШЦ ЧЕЛОВЕКА

Левицкий Д.И.¹, Матюшенко А.М.¹, Щепкин Д.В.², Копылова Г.В.², Клейменов С.Ю.^{1,3}, Бершицкий С.Ю.²

¹ ИНБИ ФИЦ биотехнологии РАН, Москва

² Институт иммунологии и физиологии УрО РАН, Екатеринбург;

³ Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, Москва, Россия

Актин-связывающий белок тропомиозин (Трп) представляет собой двойную α -спираль (coiled-coil) и играет ключевую роль в регуляции сокращения скелетных и сердечных мышц. Изоформы Трп α (Трп 1.1) и γ (Трп 3.12) экспрессируются в быстрых и медленных скелетных мышцах человека, соответственно, тогда как β -Трп (Трп 2.2) экспрессируется как в быстрых, так и в медленных мышцах. В результате они могут образовывать как $\alpha\alpha$ - и $\gamma\gamma$ -гомомеры димерных молекул Трп ($\beta\beta$ -гомомеры нестабильны и потому встречаются крайне редко), так и $\alpha\beta$ - и $\gamma\beta$ -гетеродимеры. Свойства $\alpha\alpha$ -гомомеров Трп хорошо изучены, тогда как почти ничего не известно о свойствах $\gamma\gamma$ -гомомеров и $\gamma\beta$ -гетеродимеров. Методом дифференциальной сканирующей калориметрии (ДСК) мы показали, что термостабильность $\gamma\gamma$ -гомомеров Трп гораздо выше, чем у $\alpha\alpha$ -гомомеров, а $\beta\beta$ -Трп – самые нестабильные гомодимеры Трп. При этом показано, что стабильность $\gamma\beta$ -гетеродимеров Трп гораздо ниже, чем у $\gamma\gamma$ -гомомеров, а тепловая денатурация $\alpha\beta$ -гетеродимеров Трп во многом напоминает денатурацию $\alpha\alpha$ -гомомеров Трп [1]. Методом искусственной подвижной системы (*in vitro* motility assay) показано, что скорость скольжения регулируемых тонких филаментов, содержащих $\gamma\gamma$ -гомомеры или $\gamma\beta$ -гетеродимеры Трп, по поверхности с иммобилизованным быстрым или медленным миозином значительно ниже, чем у филаментов, содержащих $\alpha\alpha$ -гомомеры, $\beta\beta$ -гомомеры или $\alpha\beta$ -гетеродимеры Трп [2]. Таким образом, нам впервые удалось показать, что структурные и функциональные свойства $\gamma\gamma$ -гомомеров и $\gamma\beta$ -гетеродимеров Трп существенно отличаются от свойств как $\alpha\alpha$ - и $\beta\beta$ -гомомеров Трп, так и $\alpha\beta$ -гетеродимеров Трп. На основании этих данных сделано заключение, что γ -цепь Трп является одним из важных факторов, определяющих свойства медленных скелетных мышц.

Работа выполнена при поддержке Российского Научного Фонда (грант № 16-14-10199).

Публикации:

1. Matyushenko A.M., Kleymenov S.Y., Susorov D.S., Levitsky D.I. “Thermal unfolding of homodimers and heterodimers of different skeletal muscle isoforms of tropomyosin” // **Biophysical Chemistry**, 2018, Vol. 243, No. 1, p. 1–7.
2. Matyushenko A.M., Shchepkin D.V., Galina V. Kopylova G.V., Bershitsky S.Y., Levitsky D.I. “Unique functional properties of slow skeletal muscle tropomyosin” // **Biochimie** (in press).

НОВЫЕ СЕКРЕТЫ ГЕНОМА *OPISTHORCHIS FELINEUS*

Ершов Н.И.¹, Мордвинов В.А.¹, Прохорчук Е.Б.¹, Пахарукова М.Ю.^{1,2}, Гунбин К.В.¹, Устьянцев К.¹, Генаев М.А.¹, Блинов А.Г.¹, Мазур А.М.³, Булыгина Е.⁶, Цыганкова С.⁶, Храмеева Е.⁷, Чеканов Н.³, Фан Г.^{4,5}, Сяо Ф.⁴, Чанг Х.⁴, Чу Ч.⁴, Янг Х.⁴, Соловьев В.⁸, Ли С.М.⁴, Лу Ш.⁴, Афонников Д.А.^{1,2} и Скрябин К.Г.¹

¹ ИЦиГ СО РАН, Новосибирск

² НГУ, Новосибирск.

³ ИНБ ФИЦ Биотехнологии РАН.

⁴ НИИ биологических наук ВГИ-Шэньчжэнь, Китай, Шэньчжэнь, промышленная зона Бэйшань

⁵ Государственная ключевая лаборатория исследований качества в китайской медицине, Институт китайских медицинских наук, Университет Макао, Макао, Китай.

⁶ НИЦ «Курчатовский институт»

⁷ ЗАО «Геноаналитика»

⁸ Корпорация Softberry, 116 Радио Сёкл, офис 400, д. Моунт Киско, Нью-Йорк.

На территории Сибири остро стоит проблема хронического заболевания описторхозом. Три вида эпидемиологически важных печеночных сосальщиков отряда описторховых представлены *Opisthorchis felineus*, *O. viverrini*, и *Clonorchis sinensis*. Предполагается, что все они обладают схожим свойством вызывать заболевания печени у организма-хозяина, несмотря на то, что их популяции отличаются по экогеографии индивидуальных обитателей, предпочтительному организму-хозяину и популяционной структуре. Отсутствие генома и транскриптома *O. felineus* не позволяло построить сравнительную молекулярно-биологическую модель этого отряда и идентифицировать процессы, связанные с взаимодействием «паразит-хозяин» для предсказания генов, которые вовлечены в патогенез печеночных сосальщиков, и для эффективного предотвращения и контроля заболевания.

В данной работе мы представили первую сборку генома *O. felineus* и репертуар его генов, сопроводив их сравнительным анализом с геномами *O. viverrini* и *Clonorchis sinensis*. Были обнаружены и значительно высокая степень гетерозиготности при секвенировании индивидуальных организмов *O. felineus*, и значительное генетическое разнообразие смешанных образцов. Это указывает, что потенциал популяции *O. felineus* к быстрому адаптационному ответу выше, чем у популяций *O. viverrini* and *C. sinensis*. Мы показали, что все три вида характеризуются более интенсивным вовлечением транс-сплайсинга при процессинге РНК, по сравнению с другими трематодами.

Все выявленные особенности структурной организации генома очень важны для правильного описания генов и их продуктов у паразитических организмов. Это следует иметь в виду и в фундаментальных исследованиях, и в прикладных в связи с эпидемиологической важностью печеночного сосальщика. Дальнейший сравнительный анализ печеночных сосальщиков и неканцерогенных плоских червей позволит сформулировать хорошо обоснованную гипотезу о механизмах, лежащих в основе холангиокарцином, вызванных описторхозом и клонорхозом, и установить специфические механизмы этих заболеваний.

Публикация%

New insights from *Opisthorchis felineus* genome: update on genomics of the epidemiologically important liver flukes. Ershov NI, Mordvinov VA, Prokhortchouk EB, Pakharukova MY, Gunbin KV, Ustyantsev K, Genaev MA, Blinov AG, Mazur A, Boulygina E, Tsygankova S, Khrameeva E, Chekanov N, Fan G, Xiao A, Zhang H, Xu X, Yang H, Solovyev V, Lee SM, Liu X, Afonnikov DA, Skryabin KG // **BMC Genomics**. 2019 May 22;20(1):399. <https://bmcgenomics.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12864-019-5752-8> doi: 10.1186/s12864-019-5752-8.

ЦЕЛЛЮЛАЗЫ *PENICILLIUM VERRUCULOSUM*: УВЕЛИЧЕНИЕ ТЕМПЕРАТУРНОЙ И ОПЕРАЦИОННОЙ СТАБИЛЬНОСТИ С ПОМОЩЬЮ МЕТОДОВ РАЦИОНАЛЬНОГО ДИЗАЙНА

Доценко А.С.¹, Рожкова А.М.^{1,2}, Зоров И.Н.^{1,2}, Гусаков А.В.², Синицын А.П.^{1,2}

¹ ИНБИ ФИЦ биотехнологии РАН, Москва

² МГУ имени М.В. Ломоносова, Химический факультет

Возобновляемые непищевые источники лигноцеллюлозного сырья являются возможным ресурсом для получения коммерчески востребованных органических спиртов и кислот, алканов, алкенов, фуранов, диолов и множества других органических соединений, которые далее используются в химической промышленности, производстве биотоплива и биополимеров.

Процессы биоконверсии лигноцеллюлозного сырья включают стадии предобработки, ферментативного гидролиза полисахаридов до технических сахаров, трансформации сахаров в различные органические соединения и последующего производства полимеров и топлива. Одним из способов увеличения эффективности биоконверсии является улучшение эффективности стадии ферментативного гидролиза в результате увеличения температурной и операционной стабильности используемых ферментов.

Комплекс целлюлаз, продуцируемый мицелиальным грибом *Penicillium verruculosum*, обладает высокой гидролитической способностью и используется в промышленных процессах гидролиза лигноцеллюлозного сырья. Основными ферментами комплекса являются целлобиогидролаза I и эндоглюканаза II, поэтому целью данной работы было осуществление рационального дизайна этих ферментов для увеличения температурной и операционной стабильности.

Рациональный дизайн для увеличения температурной и операционной стабильности был основан на двух подходах: 1) анализ подвижности аминокислотных остатков в структуре ферментов и осуществление сайт-направленного мутагенеза с целью увеличения жесткости белковой глобулы, 2) анализ пространственной структуры ферментов и осуществление сайт-направленного мутагенеза с целью модификации свойств поверхности белковой глобулы. Применение данных подходов позволило увеличить термостабильность в 2-4 раза при температуре 60-80 °С и операционную стабильность в 1,2-1,3 раза при температуре 50 °С.

Публикации:

1. Anna S. Dotsenko, Subrata Pramanik, Alexander V. Gusakov, Aleksandra M. Rozhkova, Ivan N. Zorov, Arkady P. Sinitsyn, Mehdi D. Davari, Ulrich Schwaneberg. Critical effect of proline on thermostability of endoglucanase II from *Penicillium verruculosum* // **Biochemical Engineering Journal**, 2019, 152, 107395, doi.org/10.1016/j.bej.2019.107395.
2. Bashirova A., Pramanik S., Volkov P., Rozhkova A., Nemashkalov V., Zorov I., Gusakov A., Sinitsyn A., Schwaneberg U., Davari M. Disulfide bond engineering of an endoglucanase from *Penicillium verruculosum* to improve its thermostability // **International Journal of Molecular Science**, 2019, 20, 1602, doi.org/10.3390/ijms20071602.
3. Anna S. Dotsenko, Aleksandra M. Rozhkova, Ivan N. Zorov, Arkady P. Sinitsyn. Protein surface engineering of endoglucanase *Penicillium verruculosum* for improvement in thermostability and stability in the presence of 1-butyl-3-methylimidazolium chloride ionic liquid // **Bioresource Technology**, 2020, 296, 122370, doi.org/10.1016/j.biortech.2019.122370.

ФУНКЦИОНАЛЬНОЕ И ФИЛОГЕНЕТИЧЕСКОЕ РАЗНООБРАЗИЕ МИКРООРГАНИЗМОВ В МЕСТОРОЖДЕНИЯХ ТЯЖЕЛОЙ НЕФТИ КАК ОСНОВА ДЛЯ СОЗДАНИЯ БИОТЕХНОЛОГИИ УВЕЛИЧЕНИЯ НЕФТЕИЗВЛЕЧЕНИЯ

Соколова Д.Ш.¹, Бабич Т.Л.¹, Семёнова Е.М.¹, Груздев Д.С.², Биджиева С.Х.¹, Ершов А.П.¹, Сердюков Д.В.¹, Волков Д.С.³, Бугаев К.А.³, Хисаметдинов М.Р.⁴, Борзенков И.А.¹, Назина Т.Н.¹

¹ ИНМИ ФИЦ Биотехнологии РАН

² ИНБ ФИЦ Биотехнологии РАН

³ ООО «РИТЭК»

⁴ Татарский научно-исследовательский и проектный институт нефти, Бугульма

Геологические запасы тяжелой и высоковязкой нефти в России достигают 6–7 млрд. тонн. Их извлечение требует применения дорогостоящих технологий, что увеличивает себестоимость добычи. Биологическое воздействие на тяжёлую нефть может представлять альтернативный подход для повышения нефтеотдачи. В настоящее время информация о микроорганизмах месторождений тяжелой нефти остается фрагментарной. Целью работы является изучение состава микробного сообщества на месторождениях тяжелой нефти России, оценка возможности применения на этих месторождениях микробных технологий увеличения нефтеизвлечения, и проведение пилотных испытаний этих методов на нефтяном месторождении. В ходе работы исследованы физико-химические условия и микробное разнообразие пластовых вод месторождений тяжелой нефти (РН). Показано, что заводняемые нефтяные пласты Чернозёрского, Южно-Сунчелеевского и Северо-Богемского нефтяных месторождений содержат малочисленное микробное сообщество, численность микроорганизмов в заводняемых пластах Восточно-Анзирского и Черёмуховского месторождений достигала 10^6 кл/мл. Скорости процессов сульфатредукции и метаногенеза были низки. С использованием метода высокопроизводительного секвенирования V3-V4 региона гена 16S рНК исследовано микробное разнообразие представителей доменов *Bacteria* и *Archaea* в Ромашкинском, Архангельском и Черемушкинском месторождениях нефти. Микроорганизмы, выделенные из нефтяных пластов, включали аэробные органотрофные бактерии (*Gordonia amicalis*, *Rhodococcus erythropolis* и другие), образующие поверхностно-активные вещества при росте на углеводородах нефти, и анаэробные бродильные бактерии, образующие летучие кислоты и спирты из сахаросодержащих субстратов. С использованием керновых моделей нефтяного пласта и культур нефтеокисляющих и бродильных бактерий было получено 48 и 28% дополнительной нефти, соответственно, по сравнению с заводнением. Микробиологический метод увеличения нефтеотдачи, основанный на интродукции в пласт углеводородокисляющих бактерий, окислителя в виде раствора H_2O_2 и солей азота и фосфора, был опробован на Черёмуховском месторождении, что позволило получить более 1140 т дополнительной тяжелой нефти.

Исследование выполнено при поддержке РНФ (грант № 16-14-00028).

Публикации:

1. Назина Т.Н., Соколова Д.Ш., Бабич Т.Л., Семёнова Е.М., Ершов А.П., Биджиева С.Х., Борзенков И.А., Полтараус А.Б., Хисаметдинов М.Р., Турова Т.П. Микроорганизмы низкотемпературных месторождений тяжелой нефти (Россия) и возможность их применения для вытеснения нефти // **Микробиология**. 2017. Т. 86. № 6. С. 748-761.
2. Nazina T., Sokolova D., Grouzdev D., Semenova E., Babich T., Bidzhieva S., Serdukov D., Volkov D., Bugaev K., Ershov A., Khisametdinov M., Borzenkov I. The Potential Application of Microorganisms for Sustainable Petroleum Recovery from Heavy Oil Reservoirs // **Sustainability**. 2020, 12, 15.
3. Борзенков И.А., Соколова Д.Ш., Бабич Т.Л., Ершов А.П., Назина Т.Н., Хисаметдинов М.Р. Штамм *Gordonia amicalis*, способный к генерации непосредственно в нефтяном пласте нефтевытесняющего агента – биоПАВ и снижающий содержание сероорганических соединений нефти. **Патент** № 2673747, 29.11.2018.

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ФИТОГОРМОНОВ – ИНДОЛИЛУКСУСНОЙ И АБСЦИЗОВОЙ КИСЛОТ ПРИ ПРОРАСТАНИИ СЕМЯН ЗЛАКОВ

Арабова Л.И.¹, Чумикина Л.В.¹, Колпакова В.В.², Топунов А.Ф.¹

¹ ИНБИ ФИЦ Биотехнологии РАН

² ВНИИ крахмалопродуктов – филиал ФГБНУ «ФНЦ пищевых систем им. В.М. Горбатова» РАН

Изучена динамика изменения содержания фитогормонов – индолил-3-уксусной (ИУК) и абсцизовой кислот (АБК) на ранних стадиях прорастания семян пшеницы, ржи и тритикале (гибрид ржи и пшеницы), при нормальной температуре (22°C) и коротком тепловом шоке (40°C в течение 4 часов).

Показано, что действие повышенных температур на зародыши семян в разные периоды набухания и прорастания вызывало перестройку всей гормональной системы организма, при этом эффект отличался у разных злаков. Обнаружены изменения в соотношении ИУК и АБК в зародышах пшеницы и тритикале при тепловом шоке, связанные с саморегуляцией и переходом гормонов из активного состояния в неактивное. Было выявлено, что процессы, предшествующие прорастанию и активному росту проростка, отличались по чувствительности к температуре. Семя на начальной стадии видимого прорастания было более чувствительно к тепловому шоку по сравнению с физическим набуханием и активным ростом проростка. Показано, что при коротком тепловом шоке характер изменения соотношения гормонов в зародышах пшеницы и тритикале был сходен с контролем, но отличался по амплитуде. Установлена зависимость ростовых процессов от соотношения ИУК/АБК при коротком тепловом шоке.

Выявленные особенности взаимодействия фитогормонов в семенах злаков на ранних стадиях развития могут быть использованы при селекции зерновых культур для повышения их адаптационного потенциала.

Публикации:

1. Чумикина Л.В., Арабова Л.И., Колпакова В.В., Топунов А.Ф. Роль фитогормонов в регуляции устойчивости семян пшеницы, ржи и тритикале к действию повышенных температур при прорастании // **Прикладная биохимия и микробиология**. 2019. Т. 55. № 1. С.77-85. DOI: 10.1134/S0555109919010045
2. Колпакова В.В., Чумикина Л.В., Арабова Л.И. Модификация функциональных свойств белковых концентратов из белого и коричневого риса // **Вестник Воронежского государственного университета инженерных технологий**. 2019. Т. 81. № 1. С. 181-189. DOI: 10.20914/2310-1202-2019-1-181-189
3. Kolpakova V.V., Chumikina L.V., Arabova L.I., Topunov A.F. Physico-chemical properties and structural features of native and modified protein concentrates from white and brown rice // **Foods and Raw Materials**. 2020. V. 8. № 2. (принята в печать.)

ОЧИСТКА ИЛОВЫХ ВОД МЕТАНТЕНКОВ ОТ АЗОТА В СИСТЕМЕ РЕАКТОРОВ АНАММОКС-ЧАСТИЧНОЙ НИТРИФИКАЦИИ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ НОВОЙ АНАММОКС-БАКТЕРИИ “*CANDIDATUS JETTENIA ECOSI*”

Литти Ю.В.¹, Ножевникова А.Н.¹, Бочкова Е.А.¹, Вишнякова А.В.¹, Ермошин А.А.¹, Марданов А.В.¹, Белецкий А.В.¹, Равин Н.В.¹, Груздев Д.С.¹, Бочкарева Е.С.¹, Кузнецов Б.Б.¹, Бескоровайный А.В.², Новиков А.А.²

¹ ИНМИ ФИЦ Биотехнологии РАН

² ИНБ ФИЦ Биотехнологии РАН

³ РГУ нефти и газа (НИУ) имени И.М. Губкина

Иловые воды метантенков – специфические сточные воды с высоким содержанием аммонийного азота. Для очистки иловых вод высоконагруженного термофильного метантенка использовали двухреакторную систему очистки: (1) анаммокс и (2) частичной нитрификации с иммобилизацией биомассы на ершовом носителе и рециклом очищаемой воды. Реактор частичной нитрификации был инокулирован активным илом Курьяновских очистных сооружений (г. Москва), а анаммокс-реактор – постоянно культивируемой и имеющейся в наличии в лаборатории анаммокс-биомассой с преобладанием новой анаммокс-бактерии “*Candidatus Jettenia ecosi*”. Анаммокс-биомасса была активна в широком диапазоне концентраций азотных субстратов (0,02–0,8 г N/л), способна переносить микроаэрофильные условия и, помимо анаммокс-планктомицетов, включала также нитрификаторов первой и второй ступени, денитрификаторов, бродильщиков и метаногенов, что отражало сложность процессов в ее микробном сообществе. Об эффективности очистки иловой воды метантенка судили по изменению концентраций соединений азота и ХПК в исходной и очищенной иловой воде, а также относительной численности основных групп микроорганизмов, участвующих в удалении из нее азота. Максимальная представленность анаммокс-бактерий и нитрификаторов первой ступени наблюдалась при концентрации 150 мг N-NH₄/л и ХПК до 600 мг O₂/л в исходной среде. Эффективность очистки иловой воды от азота при этом составляла 75–90%. В анаммокс-реакторе наблюдалось активное развитие анаммокс-бактерий и нитрификаторов первой ступени, при практическом отсутствии нитрификаторов второй ступени. Обнаружено, что повышенное содержание органических веществ в иловой воде обуславливает существенное снижение степени очистки иловой воды, что объясняется снижением относительной численности анаммокс-бактерий и нитрификаторов первой ступени р. *Nitrosomonas* в реакторе частичной нитрификации и, напротив, увеличением численности нитрификаторов второй ступени р. *Nitrospira*. Представленность основных групп микроорганизмов, участвующих в удалении азота была больше в биопленках, нежели в свободноплавающем иле (флоккулах и гранулах). По мере увеличения нагрузки размеры гранул и флокул не менялись, но менялся цвет с серо-красного на более темный.

Публикации:

Бочкова Е.А., Литти Ю.В., Новиков А.А., Груздев Д.С., Бочкарева Е.С., Бескоровайный А.В., Кузнецов Б.Б., Ножевникова А.Н. Описание нового вида анаммокс-бактерии “*Candidatus Jettenia ecosi*” // **Микробиология**. 2018. Т. 87. № 6. С. 659–671. doi: 10.1134/S0026365618060058

Mardanov A.V., Beletsky A.V., Ravin N.V., Botchkova E.A., Litt Y.V., Nozhevnikova A.N. Genome of a novel bacterium “*Candidatus Jettenia ecosi*” reconstructed from the metagenome of an anammox bioreactor // **Front. Microbiol.** 2019. V. 10. Art. 2442. doi: 10.3389/fmicb.2019.02442

Вишнякова А.В., Литти Ю.В., Бочкова Е.А., Ермошин А.А., Ножевникова А.Н. Изменение относительной численности микробных групп, участвующих в удалении азота в системе реакторов анаммокс-частичной нитрификации при увеличении нагрузки по аммонийному азоту и ХПК // **Микробиология**. 2020. Т. 89. № 2 (в печати).

ИЗУЧЕНИЕ ГЕНЕТИЧЕСКИХ АСПЕКТОВ МИНИАТЮРИЗАЦИИ НА ПРИМЕРЕ ПАРАЗИТИЧЕСКОГО НАЕЗДНИКА *MEGAPHRAGMA AMALPHITANUM* (HYMENOPTERA: TRICHOGRAMMATIDAE)

Шарко Ф.С.¹, Недолужко А.В.³, Лё Брендон М.⁴, Цыганкова С.В.², Булыгина Е.С.², Расторгуев С.М.², Соколов А.С.¹, Родригес Ф.⁴, Мазур А.М.¹, Полилов А.А.⁵, Бентон Р.⁶, Евгеньев М.Б.⁷, Архипова И.Р.⁴, Прохорчук Е.Б.^{1,5}, Скрябин К.Г.^{1,2,5}

¹ ИНБ, ФИЦ Биотехнологии РАН

² НИЦ Курчатовский Институт

³ Северный Университет, Факультет Бионаук и Аквакультуры, Норвегия.

⁴ Josephine Bay Paul Центр сравнительной молекулярной биологии и эволюции, Морская биологическая Лаборатория, США

⁵ МГУ им. М.В.Ломоносова, биологический факультет

⁶ Лозаннский Университет, Центр Интегративной геномики, Факультет биологии и медицины Швейцария

⁷ Институт молекулярной биологии им. В.А.Энгельгардта РАН

Миниатюризация организмов – одно из наиболее интересных эволюционных явлений. Это весьма распространенный процесс, широко представленный у многоклеточных организмов. Миниатюризация приводит к значительному сокращению размеров организма и упрощению ряда систем и органов без потери жизнеспособности. В ходе этого процесса не только изменяется общий размер организма, но и уменьшаются размеры клеток, составляющих его, а также меняется структура генома и отдельных генов. Данная работа посвящена уточнению влияния миниатюризации организма на размер и функционирование генома.

Паразитический наездник *Megaphragma amalphitanum* считается одним из мельчайших насекомых, описанных к настоящему времени, и потому представляет значительный интерес в качестве объекта для изучения генетических аспектов уменьшения размеров организмов в процессе эволюции. Секвенирование полного генома и его последующая аннотация, а также сборка транскриптома позволяют понять, насколько меняется генетический материал таких организмов при миниатюризации по сравнению с другими насекомыми.

Основные результаты:

1. Разработана программа mitoSpider, позволяющая проводить сбор генов, участков генома из открытых баз данных (например, NCBI).

2. Описано 5 генов, отсутствующих в геноме *Megaphragma amalphitanum* по сравнению с ближайшими, более крупными перепончатокрылыми сородичами, среди них – ген, кодирующий центросомин. Мы предполагаем, что отсутствие этого гена связано с обнаруженным ранее отсутствием клеточного ядра в нейронах у этого вида.

3. Показано, что драматическое уменьшение размеров организма не приводит к значительным изменениям в геноме. Дальнейшие исследования в данном направлении позволят найти генетические «ключи» к данному процессу.

Публикации

Sharko F.S., Nedoluzhko A.V., Lê Brandon M., Tsygankova S.V., Boulygina E.S., Rastorguev S.M., Sokolov A.S., Rodriguez F., Mazur A.M., Polilov A.A., Benton R., Evgen'ev M.B., Arkhipova I.R., Prokhortchouk E.B., Skryabin K.G.. A partial genome assembly of the miniature parasitoid wasp, *Megaphragma amalphitanum* // **PLoS ONE**, 14(12), 2019, e0226485

ОСМОЛИТЫ И МЕМБРАННЫЕ ЛИПИДЫ В АДАПТИВНОМ ОТВЕТЕ МИКРОМИЦЕТОВ НА ДЕЙСТВИЕ СТРЕССОРОВ

Януцевич Е.А.¹, Данилова О.А.¹, Козлова М.В.², Камзолкина О.В.³, Терёшина В.М.¹

¹ ИНМИ ФИЦ Биотехнологии РАН

² Государственный океанографический институт имени Н.Н.Зубова

³ МГУ имени М.В.Ломоносова

В комплексном ответе микромицетов на стрессорные воздействия ключевым звеном является защита мембран и макромолекул клетки. Для этого используются осмолитная система и изменения состава мембранных липидов. У микромицетов осмолиты представлены цитопротекторными соединениями – трегалозой и полиолами. Ранее мы исследовали действие индивидуальных стрессоров, что позволило поставить новую задачу: исследовать ответ на комбинированное действие стрессоров. Другим подходом является исследование адаптационных механизмов у экстремофилов.

Целью настоящей работы было исследование состава осмолитов и мембранных липидов у *Aspergillus niger* в условиях комбинированного действия теплового (ТШ) и осмотического (ОШ) шоков и у алкалофила *Sodiomyces alkalinus* в процессе развития.

Для создания комбинированного воздействия *A. niger* выращивали в глубоководной культуре до стадии трофофазы и затем воздействовали ОШ (0.5 М NaCl), ТШ (40–41°C) или их комбинацией в течение 3 ч. На примере мезофильного гриба *A. niger* впервые было показано, что комбинированное действие теплового и осмотического шоков вызывало неаддитивный ответ. В составе осмолитов наблюдался характерный для ответа на тепловой шок рост уровня трегалозы, при этом, в отличие от ответа на осмотический шок, резко снижался уровень глицерина, а также возникал новый эффект – рост уровня маннита. Напротив, в составе мембранных липидов комбинированное действие шоков вызывало изменения, характерные для индивидуальных ТШ и ОШ, – двукратное повышение доли фосфатидных кислот (ФК).

Ранее нами было впервые обнаружено большое количество трегалозы в мицелии и ФК в составе мембранных липидов облигатного алкалофила *S. tronii*, и было высказано предположение о значении этих соединений для алкалофилии. Для подтверждения этой гипотезы был исследован состав осмолитов и мембранных липидов на различных стадиях развития другого алкалофила – *S. alkalinus*. Для получения мицелия и плодовых тел гриб выращивали в поверхностной культуре на чашках Петри с целлофановыми дисками в оптимальных температурных условиях в течение 3.5 и 16 сут. Количество углеводов и полиолов молодого и зрелого мицелия *S. alkalinus* достигало 9–11% от сухой массы, доминирующими были маннит и трегалоза. В плодовых телах наблюдалось двукратное повышение содержания трегалозы на фоне существенного снижения уровня маннита, в результате чего трегалоза преобладала (70–75% от суммы). В профиле мембранных липидов молодого и зрелого мицелия доминировали фосфатидилхолины (ФХ), ФК и стеринны, тогда как в плодовых телах в результате резкого снижения доли ФК – только ФХ и стеринны.

Таким образом, трегалоза и ФК не только выполняют защитную функцию при ответе на стрессорные воздействия у мезофильного *A. niger*, но и имеют ключевое значение для алкалофилии микромицетов на стадии активного роста.

Публикации:

1. Ianutsevich E.A., Tereshina V.M. Combinatorial impact of osmotic and heat shocks on the composition of membrane lipids and osmolytes in *Aspergillus niger* // **Microbiology (SGM)**. 2019. V. 165. № 5. P. 554–562. doi:10.1099/mic.0.000796
2. Kozlova M.V., Ianutsevich E.A., Danilova O.A., Kamzolkina O.V., Tereshina V.M. Lipids and soluble carbohydrates in the mycelium and ascospores of alkaliphilic fungus *Sodiomyces alkalinus* // **Extremophiles**. 2019. V. 23. № 4. P. 487–494. doi:10.1007/s00792-019-01100-z

МЕТАБОЛОМИКА РЕАКТИВАЦИИ ПОКОЯЩИХСЯ ФОРМ *MYCOBACTERIUM SMEGMATIS*

Никитушкин В.Д., Демина Г.Р., Шлеева М.О., Капрельянц А.С

ИНМИ ФИЦ Биотехнологии РАН

В ходе настоящего исследования проведен мониторинг изменения метаболических процессов (методом метаболомного профайлинга) при переходе клеток *Mycobacterium smegmatis* (*Mycolicibacterium smegmatis*) из состояния покоя (dormancy) в активное состояние.

Клетки *M. smegmatis* являются модельным микроорганизмом, отражающим основные физиологические особенности процессов реактивации покоящихся форм *Mycobacterium tuberculosis*, являющегося патогеном, способным персестировать длительное время в организме носителя и спонтанно реактивироваться при ослаблении защитных сил организма хозяина (иммунодефицит, диабет и т.д).

Разработанная в лаборатории методика получения покоящихся клеток, а также тщательно изученная процедура реактивации использовались для исследования изменения величины мембранного потенциала (МП) бактериальных клеток. Поскольку связь между величиной МП и жизнеспособностью очевидна, соответственно изменение данной величины, позволяет качественно установить наличие протекания биохимических процессов, а также позволяет установить момент активации метаболизма.

На основании экспериментов, полученных в ходе изучения процесса реактивации, были отобраны три временные точки 0 ч (покоящиеся клетки), 10 ч (реактивирующиеся клетки - выход МП на плато), 26 ч (активные клетки), которые подвергли метаболомному профайлингу методом LC-QTOF/MS. Детектируемые ВЭЖХ метаболиты были аннотированы в соответствии с их точной массой, а также временем выхода. Получаемые метаболические профили были далее проанализированы методами хемометрики и биоинформатики. В процессе профайлинга было обнаружено 707 метаболитов. При этом, наиболее значимые изменения профилей наблюдались в промежуток между 10 и 26 часами с момента начала реактивации. 77 метаболитов демонстрировали статистически-значимое изменение в промежутке 0-26 часов с глобальной величиной $p < 0.05$. Так например, многие липиды продемонстрировали низкие концентрации в состоянии покоя и их концентрация увеличивается в процессе реактивации (напр. PI(36:1) и PI(P-16:0/15:1(9Z))). Однако, большинство метаболитов, концентрации которых изменяются статистически значимо расходуются в процессе реактивации - к таким метаболитам относятся: лактат, глюкоза, пальмитат и т.д. Лишь небольшое количество метаболитов демонстрирует достаточно интересный процесс увеличения концентрации к 10 часам с момента начала реактивации, с последующим уменьшением их концентрации к 26 часам (фосфатидилглицерин, ганодеровая кислота и т.д.).

Таким образом, несмотря на длительное хранение в состоянии покоя, клетки *M. smegmatis* сохраняют большое количество метаболитов из разных метаболических процессов. В ходе реактивации происходит постепенная сборка метаболических путей.

Публикация:

Nikitushkin V.D., Trenkamp S., Demina G.R., Shleeva M.O., Kaprelyants A.S. Metabolic profiling of dormant *Mycolicibacterium smegmatis* cells' reactivation reveals a gradual assembly of metabolic processes // **Metabolomics**. Accepted: 22 Jan 2020. DOI: 10.1007/s11306-020-1645-8.

ОСОБЕННОСТИ СТРУКТУРЫ И ЭВОЛЮЦИИ ПЛАСТИДНЫХ ГЕНОМОВ ПАРАЗИТИЧЕСКИХ И ХИЩНЫХ РАСТЕНИЙ

Груздев Е.В., Белецкий А.В., Кадников В.В., Марданов А.В., Равин Н.В.

ИНБ, ФИЦ Биотехнологии РАН

Целью работы было изучение особенностей структурно-функциональной организации и эволюции хлоропластных (пластидных) геномов хищных и паразитических растений. Эти 2 группы в меньшей степени зависимы от фотосинтеза, что приводит к снижению селективного давления на эффективное функционирование фотосинтетического аппарата и влияет на структуру пластидного генома.

Хищные растения способны захватывать и переваривать мелких животных в качестве источника дополнительных питательных веществ, что позволяет им расти в местах обитания с низким содержанием нутриентов. Мы просеквенировали пластидные геномы 2-х хищных растений отряда *Caryophyllales*, *Drosera rotundifolia* и *Nepenthes ventrata*. Пластом *D. rotundifolia* содержит большое число повторов, его структура сильно перестроена относительно типичной для цветковых растений. В нем отсутствуют гены NAD(P)H-дегидрогеназы, гены *ycf1* и *ycf2*, а также 3 существенных гена тРНК. Потеря генов и появление перестроек может свидетельствовать о пониженном эволюционном давлении на хлоропластный геном, как и в случае с паразитическими растениями. В некоторых генах, кодирующих белки и тРНК, наблюдаются потери интронов, а также сокращение числа сайтов редактирования РНК. В пластидном геноме *D. rotundifolia* с помощью RNA-seq были идентифицированы только 6 сайтов редактирования РНК, а в большинстве потенциальных сайтов редактирования консервативные аминокислоты уже кодируются на уровне ДНК. Напротив, пластидный геном *N. ventrata* имеет типичную для цветковых растений структуру и набор генов. Единственной особенностью данного пластома является утрата функциональности гена *ccsA*, продукт которого задействован в синтезе цитохрома C.

Определена полная нуклеотидная последовательность пластидного генома нефотосинтезирующего паразитического растения *Diphelypaea coccinea*. Этот геном имеет длину всего 66616 нт, содержит 4 гена рРНК, 25 генов тРНК и 25 белок-кодирующих генов. Пластом характеризуется большим числом перестроек, по сравнению со стандартной структурой пластома цветковых растений. В нем отсутствуют гены NADH дегидрогеназы, гены фотосинтетического аппарата, АТФ синтазы и РНК полимеразы, а также 5 консервативных генов тРНК. В некоторых генах потеряны интроны. Сравнение характера изменений структуры и генного состава пластидного генома *D. coccinea* с ранее просеквенированными нами пластидным геномом паразитического растения *Monotropa hypopitys* и другими пластомами растений-паразитов показывает, что, несмотря на независимое происхождение, пластидные геномы этих растений имеют ряд схожих особенностей, таких как редукция генома, структурные перестройки, накопление мутаций и утрата генов фотосинтетического аппарата. Сравнение организации пластидных геномов паразитических и хищных растений показало, что *N. ventrata* и *D. rotundifolia* могут представлять различные стадии эволюции пластидных геномов хищных растений, напоминая события у паразитических растений при переходе от автотрофности к гетеротрофному образу жизни.

Публикации

Gruzdev EV, Kadnikov VV, Beletsky AV, Kochieva EZ, Mardanov AV, Skryabin KG, Ravin NV. (2019) Plastid genomes of carnivorous plants *Drosera rotundifolia* and *Nepenthes × ventrata* reveal evolutionary patterns resembling those observed in parasitic plants // **International Journal of Molecular Sciences**, 20: 4107.

Gruzdev EV, Kadnikov VV, Beletsky AV, Mardanov AV, Ravin NV. (2019) Extensive plastome reduction and loss of photosynthesis genes in *Diphelypaea coccinea*, a holoparasitic plant of the family Orobanchaceae // **Peer Journal**, 7: e7830.

ИНЖЕНЕРИЯ ОКСИДАЗЫ D-АМИНОКИСЛОТ ИЗ ДРОЖЖЕЙ *TRIGONOPSIS VARIABILIS* С УЛУЧШЕННЫМИ СВОЙСТВАМИ ДЛЯ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ В БИОТЕХНОЛОГИИ

Атрошенко Д.Л.¹, Шеломов М.Д.², Савин С.С.^{1,2}, Пометун А.А.¹, Тишков В.И.^{1,2}

¹ ИНБИ ФИЦ Биотехнологии РАН

² Химический факультет МГУ имени М.В. Ломоносова

Оксидаза D-аминокислот (ДААО, КФ 1.4.3.3) относится к классу FAD-содержащих оксидоредуктаз. Фермент играет важную роль в метаболизме микроорганизмов и регуляции нервной деятельности у позвоночных. Фермент широко используется на практике. Наиболее крупнотоннажным процессом (около 10 тыс. тонн в год) является биокаталитическое получение из цефалоспориноидов 7-аминоцефалоспориновой кислоты – прекурсора для производства полусинтетических цефалоспоринов различных поколений. Помимо этого, ДААО активно применяется в аналитической биотехнологии, хиральной синтезе, получении α -кетокислот и имеет большое потенциальное значение для создания систем диагностики и мониторинга ряда (в первую очередь нейродегенеративных) заболеваний.

В процессе получения 7-АЦК из цефалоспориноидов используется ДААО из дрожжей *Trigonopsis variabilis* (*TvDAAO*). Однако нативный фермент требует как каталитической активности с цефалоспорином С, так и значительного повышения температурной и особенно операционной (химической стабильности), поскольку в ходе реакции в качестве промежуточного продукта образуется пероксид водорода. Для комплексного улучшения всех параметров использовали метод рационального дизайна. В ходе выполнения данной работы были проведены систематические исследования о роли ряда остатков метионина и цистеина *TvDAAO* в температурной и химической стабильностях фермента. Разработана и оптимизирована методика определения стабильности *TvDAAO* к действию пероксида водорода. Определена важность отдельных остатков цистеина в инактивации *TvDAAO* пероксидом водорода. Получены мутантные ферменты с точечными и несколькими (3-6) аминокислотными заменами, лучшие из которых по сравнению с *TvDAAO* дикого типа обладали в 4-5 раз более высокой каталитической константой в реакции окисления цефалоспориноидов С, в 15-30 раз более высокой температурной стабильностью и в 5-10 раз более высокой стабильностью к действию H_2O_2 .

Публикации:

- Atroshenko D.L., Shelomov M.D., Zarubina S.A., Golubev I.V., Savin S.S., Tishkov V.I. Multipoint *TvDAAO* mutants for cephalosporin C bioconversion // **International Journal of Molecular Sciences**, 2019, v.20, p.4412-4412.
- Atroshenko D.L., Pomietun A.A., Savin S.S., Tishkov V.I. Determination of the kinetic parameters of a wild-type D-amino acid oxidase from yeast and its mutant forms in a reaction of cephalosporin C oxidation // **Moscow University Chemistry Bulletin**, 2019, v. 74, No. 4, p. 169–172.
- Tishkov V.I., Pomietun A.A., Stepashkina A.V., Fedorchuk V.V., Zarubina S.A., Kargov I.S., Atroshenko D.L., Parshin P.D., Kovalevski R.P., Boiko K.M., Eldarov M.A., D'Oronzo E., Facheris S., Secundo F., Savin S.S. Rational design of practically important enzymes // **Moscow University Chemistry Bulletin**, 2018, v.73, №1, p.1-6.
- Atroshenko D.**, Shelomov M., Zhgun A., Avdanina D., Eldarov M., Pomietun A., Chubar T., Savin S., Tishkov V. Preparation and characterization of wild-type and mutant D-amino acid oxidases from *Hansenula polymorpha* and *Trigonopsis variabilis* // **FEBS Open Bio**, 2018, v.8, Suppl. S1, p.190-190.

АДАПТАЦИОННЫЙ ПОТЕНЦИАЛ МЕТАНОТРОФА-СПИРИЛЛЫ *METHYLOSPIRA MOBILIS*, ВЫЯВЛЕННЫЙ НА ОСНОВЕ АНАЛИЗА ПОЛНОЙ ГЕНОМНОЙ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ

Ошкин И.Ю., Мирошников К.К., Данилова О.В., Дедыш С.Н.

ИНМИ ФИЦ Биотехнологии РАН

Аэробные метанотрофные бактерии обладают уникальной способностью использовать метан в качестве единственного источника углерода и энергии. *Candidatus Methylospira mobilis* был описан недавно как первый метанотрофный микроорганизм со спиралевидной формой клеток, которая позволяет быстро передвигаться в гетерогенных средах, таких как торф, озерные осадки, почвы и т.д. Этот уникальный микроорганизм находился в тесной ассоциации с неметанотрофными спутниками, а все попытки выделения его в чистой культуре долгое время оставались без результата. Чистая культура *Methylospira mobilis* Shm1 была получена в настоящей работе, что сделало возможным получение полной геномной последовательности этого микроорганизма. Исследование, представленное в настоящем докладе, ставило своей задачей определение ключевых экофизиологических характеристик *Methylospira mobilis* Shm1 на основе геномного анализа.

В геноме размером 4.7 млн. п.о. было обнаружено 4800 открытых рамок считывания. Гены C1-метаболизма были высоко сходны с таковыми у неподвижного, умеренно термофильного метанотрофа *Methylococcus capsulatus* Bath, являющегося близким филогенетическим родственником *Methylospira mobilis* Shm1. В геномах обоих микроорганизмов присутствуют гены оксидаз как с высоким, так и с низким сродством к кислороду, что позволяет им существовать в широком диапазоне концентраций O₂. Однако общий пул генов сенсорных систем у *Methylospira mobilis* Shm1 значительно превосходит таковой у *Methylococcus capsulatus* Bath. Помимо этого, в геноме *Methylospira mobilis* Shm1 имеется полный набор генов подвижности, гены двух типов нитрогеназ (Fe-Mo, V-Fe), а также большое число инсерционных последовательностей. Все вместе это определяет высокую степень адаптации *Methylospira mobilis* к существованию в условиях гетерогенных, обводненных экосистем с низким содержанием кислорода и доступного азота.

Работа поддержана Министерством науки и высшего образования РФ, а также FEMS Research and Training Grant FEMS-GO-2018-125.

Публикация:

Oshkin I.Y., Miroshnikov K.K., Danilova O.V., Hakobyan A., Liesack W., Dedysh S.N. Thriving in wetlands: Ecophysiology of the spiral-shaped methanotroph *Methylospira mobilis* as revealed by the complete genome sequence // **Microorganisms**. 2019. doi: 10.3390/microorganisms7120683.

СОЗДАНИЕ СИСТЕМ ПОЛУЧЕНИЯ И ОЧИСТКИ РЕКОМБИНАНТНЫХ ФЕРМЕНТОВ, ФОСФОЛИПАЗЫ А2 И ХИМОЗИНА, В МЕТИЛОТРОФНЫХ ДРОЖЖАХ *Komagataella phaffii* ДЛЯ ПИЩЕВОЙ ПРОМЫШЛЕННОСТИ

Филькин С.Ю.¹, Чертова Н.В.¹, Зенин В.А.¹, Зацепин С.С.¹, Вавилова Е.А.¹, Бытяк Д.С.², Эльдаров М.А.³, Липкин А.В.¹, Федоров А.Н.¹.

¹ ИНБИ ФИЦ Биотехнологии РАН

² Инновационный центр «Бирюч», Белгородская область.

³ ИНБИ ФИЦ Биотехнологии РАН

Фосфолипаза А2 применяется для эмульгации яичного желтка, далее используемого в пищевых производствах. Химозин - аспартатная эндопептидаза, специфичная к к-казеину молока, является ключевым ферментом в сыроделии. В настоящее время в пищевом производстве используются рекомбинантные формы этих и других ферментов, имеется потребность в создании эффективных технологий их получения на основе единой экспрессионной платформы *Komagataella phaffii* (*Pichia pastoris*).

Получены эффективные рекомбинантные штаммы метилотрофных дрожжей *Komagataella phaffii*, продуцирующие функционально-активные ферменты: секреторную фосфолипазу А2 (ФЛА2) из *Streptomyces violaceoruber* и химозин из *Bos taurus*. Отработаны методы культивирования штаммов продуцентов, а также выделения и очистки целевых рекомбинантных ферментов. Для функционально-активной фосфолипазы А2 разработан метод получения и очистки до концентрации в 3 мг/мл (14000 ед. /мл) с выходом 74%. Проведена физико-химическая характеристика фосфолипазы А2. Получены данные по влиянию различных двухвалентных катионов на температурную стабильность ФЛА2, важные для определения оптимальных условий стабильности фермента. Для рекомбинантного химозина разработан метод получения и очистки до концентрации 4мг/мл (1000 ИМСУ/мл) с выходом 68%. Полученные ферменты соответствуют требованиям к коммерческим препаратам. В результате проведенной работы разработаны масштабируемые технологии получения и очистки рекомбинантного химозина и рекомбинантной ФЛА2 для использования в пищевом и агропромышленном производстве.

Результаты получены при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации в рамках выполнения работ по соглашению от 31.05.2018 г. № 14.607.21.0207 (УИН RFMEFI60718X0207), ФЦП «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2014 – 2020 годы».

Публикации:

1. Филькин, С.Ю., Чертова, Н.В., Зенин, В.А., Липкин, А.В., Садыхов, Э.Г., Фёдоров, А.Н. (2019) Разработка масштабируемого метода выделения и очистки рекомбинантной секреторной фосфолипазы А2 при экспрессии в метилотрофных дрожжах *Pichia pastoris* // **Прикладная Биохимия и Микробиология**, 55, 578–585.
2. Филькин, С.Ю., Липкин, А. В., Фёдоров, А.Н. (2020) Суперсемейство фосфолипаз: структура, функции и применение в биотехнологии // **Успехи биологической химии**, 60, 369–410.
3. Filkin, S.Y., Chertova, N.V., Zenin, V.A., Lipkin, A.V., Sichev, A.A., Bityak, D.S., Sadykhov, E.G., Popov, V.O., and Fedorov, A.N. (2020) Expression, purification and biophysical characterization of recombinant *Streptomyces violaceoruber* phospholipase PLA2 overproduced in *Pichia pastoris* // **Prep. Biochem. Biotechnol.** 1–7.

ФАКТОРЫ ТРАНСКРИПЦИИ *MHYFIL1* И *MHYFIL3* ОПРЕДЕЛЯЮТ АСИММЕТРИЧНОЕ РАЗВИТИЕ ОРГАНОВ ПОДЪЕЛЬНИКА

Щенникова А.В., Камионская А.М., Нежданова А.В., Фомченко (Гаврилова) К.С., Филюшин М.А., Кочиева Е.З., Скрябин К.Г.

ИНБ ФИЦ Биотехнологии РАН

Проведён структурно-филогенетический анализ *YABBY*-генов подбельника *MhyFIL1* и *MhyFIL3*. Охарактеризованы основные консервативные домены и мотивы кодируемых ими факторов транскрипции. Подтверждена принадлежность генов к «вегетативной» кладе *YABBY3/FIL*. Проведена оценка влияния гетерологичной эктопической экспрессии генов *MhyFIL1* и *MhyFIL3* на фенотип трансгенных растений табака *Nicotiana tabacum*. Оба типа растений, *35S::MhyFIL1* и *35S::MhyFIL3*, формировали листья, более узкие, чем в норме, и скрученные за счёт изменённой идентичности клеток адаксиальной поверхности. Также изменилась архитектура надземной части и корневой системы растений, включая абберрантный филлотаксис и подавление развития апикальных меристем побега и корня. Часть растений *35S::MhyFIL1* и *35S::MhyFIL3* погибала ещё на стадии формирования первых листьев, часть не цвела, остальные имели сильно увеличенный период вегетации и при цветении формировали меньше цветков, чем в норме. Цветки не имели видимых отличий от контроля, за исключением цветоножек, которые стали ломкими, что приводило к опадению цветков. Полученные данные говорят о том, что гены подбельника *MhyFIL1/3* сохранили функции, характерные для «вегетативных» генов *YABBY* высших растений. Таким образом, на активность факторов транскрипции *FIL*-группы *M. hypopitys* не повлияли изменения, связанные с эволюционным переходом подбельника к гетеротрофии, сопровождающимся потерей способности формировать листья.

Публикации

А.В. Щенникова, А.М. Камионская, А.В. Нежданова, К.С. Гаврилова, М.А. Филюшин, Е.З. Кочиева, К.Г. Скрябин. Факторы транскрипции *MhyFIL1* и *MhyFIL3* (*Monotropa hypopitys*) определяют асимметричное развитие боковых органов надземной части растения // **Вавиловский журнал генетики и селекции**. 2019. Т. 23. № 4. С. 405-411. DOI 10.18699/VJ19.509

СОЗДАНИЕ ФОТОАКТИВНОГО ОРАНЖЕВОГО КАРОТИНОИДНОГО БЕЛКА С РЕДОКС-КОНТРОЛИРУЕМОЙ СТРУКТУРНОЙ ДИНАМИКОЙ И ФОТОЗАЩИТНОЙ ФУНКЦИЕЙ

Слонимский Ю.Б.^{1,2}, Максимов Е.Г.^{1,2}, Молденхауэр М.³, Фридрих Т.³, Случанко Н.Н.^{1,2}

¹ ИНБИ ФИЦ Биотехнологии РАН

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

³ Технический Университет Берлина

Оранжевый каротиноидный белок (ОСР) играет центральную роль в механизме фотозащиты цианобактерий при избыточной освещенности. Под воздействием интенсивного света водорастворимый двухдоменный белок ОСР способен к обратимой фотоактивации, при которой его структура драматически изменяется. В фотоактивированном состоянии (ОСР^R) белок связывается со светособирающими антеннами цианобактерий (фикобилисомами) и препятствует переносу энергии на реакционные центры фотосистем, осуществляя таким образом фотозащитное действие. В своем основном состоянии (ОСР^O) белок связывает молекулу каротиноида внутри полости, образуемой N- и C-концевыми доменами. Оба домена соединены линкером, образуют междоменный интерфейс и дополнительно стабилизированы взаимодействием короткой N-концевой α -спирали (NTE) с C-доменом. Фотоактивация ОСР сопровождается изменением спектральных свойств каротиноида, перемещением каротиноида в N-домен, отделением NTE от C-домена и полным расхождением доменов. Фотоцикл и активность ОСР регулируются белком FRP, который ускоряет обратную конверсию ОСР^R в ОСР^O. Было показано, что ОСР переходит в состояние ОСР^R через несколько промежуточных стадий, характеризующихся спектром поглощения ОСР^R, но компактной структурой ОСР^O, однако последовательность и количество таких промежуточных стадий остается предметом споров. Для исследования промежуточной стадии фотоактивации ОСР мы использовали уникальную мутантную форму ОСР, в которой его NTE ковалентно связана дисульфидным мостиком с C-доменом (ОСР^{СС}). Фиксация NTE, существенно ограничивающая подвижность доменов ОСР относительно друг друга, не препятствовала его фотоактивации, но нарушала взаимодействие с фикобилисомами и FRP. Восстановление дисульфидного мостика в ОСР^{СС} возвращало функциональную активность ОСР, подтверждая необходимость полного расхождения доменов для связывания с фикобилисомами. Наше исследование подтверждает существование ОСР^R-подобного промежуточного состояния в фотоцикле ОСР и показывает принципиальную возможность разобщения спектральных и структурных изменений ОСР, необходимых для его функционирования, открывая новый способ контроля активности ОСР через изменение редокс-статуса клетки.

Публикации:

1. Y. Slonimskiy, E. Maksimov, L. Evgeny, M. Moldenhauer, T. Friedrich and N. Sluchanko, Engineering the photoactive orange carotenoid protein with redox-controllable structural dynamics and photoprotective function // **Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.**, 2020, in press.
2. Y. Slonimskiy, E. Maksimov, N. Sluchanko, Fluorescence recovery protein: a powerful yet underexplored regulator of photoprotection in cyanobacteria // **Photochem Photobiol Sci.**, 2020, under review
3. Y. Slonimskiy, F. Muzzopappa, E. Maksimov, A. Wilson, T. Friedrich, D. Kirilovsky and N. Sluchanko, Light-controlled carotenoid transfer between water-soluble proteins related to cyanobacterial photoprotection, // **FEBS J.**, 2019, 286, 1908–1924.
4. E. Maksimov, I Yaroshevich, G. Tsoraev, N. Sluchanko, E. Slutsкая, O. Shamborant, T. Bobik, T. Friedrich and A. Stepanov, A genetically encoded fluorescent temperature sensor derived from the photoactive Orange Carotenoid Protein // **Sci. Rep.**, 2019, 9, 8937.
5. Pishchalnikov RY, Yaroshevich IA, Slastnikova TA, Ashikhmin AA, Stepanov AV, Slutsкая EA, Friedrich T, Sluchanko NN, Maksimov EG. Structural peculiarities of keto-carotenoids in water-soluble proteins revealed by simulation of linear absorption // **Phys Chem Chem Phys.** 2019 21:25707-25719.
6. Maksimov EG, Li WJ, Protasova EA, Friedrich T, Ge B, Qin S, Sluchanko NN. Hybrid coupling of R-phycoerythrin and the orange carotenoid protein supports the FRET-based mechanism of cyanobacterial photoprotection // **Biochem Biophys Res Commun.** 2019 ;516:699-704.
7. Sluchanko NN, Slonimskiy YB, Shirshin EA, Moldenhauer M, Friedrich T, Maksimov EG. OCP-FRP protein complex topologies suggest a mechanism for controlling high light tolerance in cyanobacteria // **Nat Commun.** 2018;9:3869.
8. Slonimskiy YB, Maksimov EG, Lukashev EP, Moldenhauer M, Jeffries CM, Svergun DI, Friedrich T, Sluchanko NN. Functional interaction of low-homology FRPs from different cyanobacteria with Synechocystis OCP // **Biochim Biophys Acta Bioenerg.** 2018;1859:382-393

НОВЫЕ МЕТАБОЛИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА БАКТЕРИЙ ФИЛУМА *DEFERRIBACTERES*, ВЫЯВЛЕННЫЕ НА ОСНОВАНИИ АНАЛИЗА ПОЛНЫХ ГЕНОМОВ

Слободкин А.И., Слободкина Г.Б., Кубланов И.В., Тошчаков С.В., Бонч-Осмоловская Е.А.

ИНМИ ФИЦ Биотехнологии РАН

Пути углеродного и энергетического метаболизма у бактерий, относящихся к филуму *Deferribacteres* малоисследованы. Анализ полного генома термофильного хемолитоавтотрофного анаэроба *Deferribacter autotrophicus* выявил несколько интересных метаболических характеристик. Геномные данные позволяют предположить, что ассимиляция CO_2 у этого организма осуществляется через недавно предложенный обратимый цикл трикарбоновых кислот («гоТСА cycle»). Мы предсказали и экспериментально доказали способность *D. autotrophicus* расти за счет окисления оксида углерода. Окисление CO происходило только с нитратом в качестве акцептора электронов, который восстанавливался до аммония. Ферменты использования окиси углерода, представлены анаэробной $[\text{Ni}, \text{Fe}]$ -содержащей CO -дегидрогеназой, кодируемой в кластере генов *rcoM-cooS-cooC-cooF-FNOR*. Это первое свидетельство метаболизма окиси углерода у представителей филума *Deferribacteres*. Геном *D. autotrophicus* содержит гены нитрат-восстанавливающего комплекса Nap типа. Однако восстановление полученного нитрита в аммоний происходит по неканоническому пути и, вероятно, связано с участием гидроксилламин-оксидоредуктазы (Нао) и гидроксилламин редуктазы (Нсп). Биохимическая система восстановления трёхвалентного железа у *D. autotrophicus* остается невыясненной. Геном содержит 17 генов, кодирующих предполагаемые мультигеновые цитохромы *c*-типа и гены «е-пилина», некоторые из которых, вероятно, участвуют в восстановлении $\text{Fe}(\text{III})$. Восстановление элементной серы у *D. autotrophicus* происходит при участии молибдоптерин-содержащих ферментов Psr/Phs-типа, кодируемых в трех генных кластерах *psrABC*. Сравнительный геномный анализ показывает, что гоТСА цикл фиксации CO_2 и аммонификация с использованием Нао может происходить и у других членов филума *Deferribacteres*.

Публикация:

Slobodkin A., Slobodkina G., Allieux M., Alain K., Jebbar M., Shadrin V., Kublanov I., Toshchakov S., Bonch-Osmolovskaya E. Genomic insights into the carbon and energy metabolism of a thermophilic deep-sea bacterium *Deferribacter autotrophicus* revealed new metabolic traits in the phylum *Deferribacteres* // **Genes**. 2019. V. 10. 849. doi:10.3390/genes10110849.

ГЕНЕРАЦИЯ СИНГЛЕТНОГО КИСЛОРОДА КОРОТКОЖИВУЩИМИ ТРИПЛЕТНЫМИ СОСТОЯНИЯМИ ХЛОРОФИЛЛА *a* И ЕГО МЕДЬСОДЕРЖАЩИМИ ПРОИЗВОДНЫМИ

Козлов А.С.¹, Бендикис А.С.¹, Красновский А.А.¹, Худяева И.С.², Пылина Я.И.², Белых Д.В.²

¹ ИНБИ ФИЦ Биотехнологии РАН

² Коми научный центр Уральского отделения РАН, г. Сыктывкар;

Ранее в работах нашей лаборатории было показано, что миллисекундные триплетные состояния хлорофилла, которые обнаруживаются по их фосфоресценции при 77 К, могут быть главным источником синглетного кислорода и причиной фотодеструкции пигментов в фотосинтетических системах при насыщающих фотосинтез интенсивностях освещения. В последнее время нами был разработан метод определения синглетного кислорода, генерируемого хлорофиллом *a* в хлоропластах и их фрагментах, основанный на применении классической ловушки синглетного кислорода – 1,3-дифенилизобензофурана (ДФИБФ) и *n*-додецил- β -*D*-мальтозида – детергента, применяемого при выделении фрагментов хлоропластов. Сравнение скоростей фотовыцветания хлорофилла *a* и генерации им синглетного кислорода, определяемой с помощью химической ловушки, в растворах и в изолированных хлоропластах показало, что оба эти параметра в растворах в 10-100 раз больше (в зависимости от условий), чем в хлоропластах, тогда как квантовый выход миллисекундных триплетных состояний изолированного хлорофилла почти на три порядка больше, чем в хлоропластах. В связи с этим можно предположить, что в образовании синглетного кислорода в фотосинтетическом аппарате могут дополнительно участвовать триплетные состояния пигментов с субмиллисекундным (менее 1 мс) временем жизни. С целью моделирования мы исследовали медные комплексы производных хлорофилла *a*, которые были предоставлены группой Д.В. Белых (Институт химии и Институт биологии Коми научного центра Уральского отделения РАН). Выбор этих соединений был обусловлен тем, что они характеризуются очень высоким квантовым выходом и малым (субмикросекундным) временем жизни триплетного состояния. По этой причине до недавних пор их считали неспособными к генерации синглетного кислорода. С помощью субмикросекундного лазерного спектрометра, собранного в нашей лаборатории, было обнаружено, что триплетные состояния медных комплексов при комнатной температуре излучают ИК фосфоресценцию с максимумом при 960 нм со временем жизни около 0,2-0,4 мкс. Тем не менее, данные пигменты достоверно образуют синглетный кислород при фотовозбуждении как в органической, так и в водной среде, хотя соответствующие квантовые выходы в несколько раз ниже, чем у хлорофилла *a* и у безметалльных аналогов. Таким образом, мы показали, что даже субмикросекундные триплетные состояния пигментов действительно могут быть источником синглетного кислорода. Кроме того, нами было обнаружено, что медные комплексы производных хлорофилла *a* при световом возбуждении способны вызывать гибель раковых клеток HeLa. Это обстоятельство с учетом очень низкой темновой токсичности медных комплексов, установленной лабораторией Д.В. Белых, позволяет рассматривать эти пигменты как потенциальные фотосенсибилизаторы для применения в фотодинамической терапии (ФДТ).

Публикация:

Belykh D.V., Kozlov A.S., Pylina Y.I., Khudyaeva I.S., Benditkis A.S., Krasnovsky A.A. Copper complexes of chlorin derivatives of chlorophyll *a* as potential photosensitizers for medical purposes // **Macroheterocycles**. 2019. vol. 12. No 1. pp. 68-74.

5'-НЕТРАНСЛИРУЕМЫЙ УЧАСТОК ДНК РАЗМЕРОМ 2,5 Т.П.О. ИЗ ОБЛАСТИ ГЕНА EEF1A1 ЯВЛЯЕТСЯ НЕОБХОДИМЫМ И ДОСТАТОЧНЫМ ДЛЯ СОХРАНЕНИЯ ПРОДУКТИВНОСТИ СТАБИЛЬНО ТРАНСФИЦИРОВАННЫХ КЛЕТОК СНО ПРИ ИХ КУЛЬТИВАЦИИ В НЕСЕЛЕКТИВНЫХ УСЛОВИЯХ В ТЕЧЕНИЕ 60 ДНЕЙ

Синегубова М.В., Орлова Н.А., Ковнир С.В., Воробьев И.И.

ИНБ ФИЦ Биотехнологии РАН

Ранее нами было установлено, что в векторных плаزمиде семейства p1.1, содержащих конкатемер фрагментов терминального концевой повтора вируса Эпштейн-Бара, 5'- и 3'-нетранслируемые области гена EEF1A1 китайского хомячка, сайт внутреннего связывания рибосом вируса энцефаломиокардита, ген дигидрофолатредуктазы мыши, а также участок ДНК, необходимый для поддержания плазмиды в *E. coli*, вся 3'-нетранскрибируемая область ДНК, окружающая ген EEF1A1 китайского хомячка, может быть удалена без потери уровня экспрессии целевого гена и стабильности этого уровня при продолжительном культивировании клеток в неселективной среде. Утверждение не соответствовало данным, ранее опубликованным для исходного вектора pDEF38, полученного на основе гена EEF1A1. Было предположено, что размер векторов семейства p1.1 м. б. существенно уменьшен за счет дальнейшего удаления нетранскрибируемой ДНК, предшествующей области корового промотора гена EEF1A1.

Получены генетические конструкции с делетированной 5'-областью в 3-х вариантах (кодовые названия TR1, TR2 и TR3 перечислены в порядке увеличения размера). Исследования потенциального уровня экспрессии фармацевтически значимых белков при помощи этих векторов производились после трансфекции данных конструкций с геном зеленого флуоресцентного белка (GFP) в клетки яичника китайского хомячка (СНО), нокаутных по гену дигидрофолатредуктазы (линия DG44). В ходе амплификации при помощи селекционного агента метотрексата (MTX) изучали динамику роста клеток и уровень экспрессии модельного белка GFP по отношению к общему белку, синтезируемому клеткой. При оценке уровня экспрессии GFP установлено, что скорость амплификации статистически достоверно отличается от контроля (ARD – полноразмерный вариант в 5'-области) для конструкций TR1 и TR2. При этом уровень экспрессии GFP при повышении концентрации MTX с 200 нМ до 2 мкМ увеличился для всех конструкций, в среднем с 0,5% до 4%, и не снизился существенно после 70-дневной культивации в отсутствие MTX. Однако при исследовании постоянства экспрессии целевого белка стабильно трансфицированных, но не амплифицированных культур замечено падение доли внутриклеточного GFP для максимально укороченного варианта TR1 спустя 2 месяца культивации. При оценке копийности гена вставки в геноме методом ПЦР-РВ установлено, что для всех 4-х конструкций, включая контроль ARD, копийность гена GFP увеличивается при амплификации и не уменьшается в течение двухмесячного культивирования в отсутствие селекционного давления.

Таким образом, установлено, что делеция в плазмиде семейства p1.1 размером около 2,5 т.п.о. из области 5'-нетранслируемого участка гена EEF1A1 не влияет на уровень экспрессии целевого белка. Данный вариант векторной плазмиды TR2 планируется в дальнейшем использовать для получения фармацевтически значимых белков в культуре клеток млекопитающих.

Публикация:

Nadezhda A. Orlova, Sergey V. Kovnir, Yulia A. Khodak, Mikhail A. Polzиков, Victoria A. Nikitina, Konstantin G. Skryabin, Ivan I. Vorobiev High-level expression of biologically active human follicle stimulating hormone in the Chinese hamster ovary cell line by a pair of tricistronic and monocistronic vectors // **PLOS**, published: July 5, 2019 <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0219434>

ВЛИЯНИЕ КАЧЕСТВА МЕДНО-ЦИНКОВЫХ КОНЦЕНТРАТОВ НА ЭФФЕКТИВНОСТЬ ИХ БИОГИДРОМЕТАЛЛУРГИЧЕСКОЙ ПЕРЕРАБОТКИ

Фомченко Н.В., Муравьев М.И.

ИНМИ ФИЦ Биотехнологии РАН

Истощение запасов богатых сульфидных полиметаллических руд, как следствие, необходимость вовлечения в переработку сложных руд, а также отсутствие эффективной технологии переработки получаемых из них сульфидных концентратов являются актуальными проблемами. Целью настоящей работы было определение влияния соотношений между содержанием меди и цинка в концентратах на эффективности их переработки.

Исследовано биовыщелачивание сульфидных медно-цинковых концентратов с различным содержанием меди и цинка с применением мезофильной и умеренно термофильной ассоциаций ацидофильных хемолитотрофных микроорганизмов. Установлено, что средние скорости выщелачивания меди прямо пропорционально зависят от ее содержания в выщелачиваемом продукте. Скорость выщелачивания цинка зависит не только от его содержания, но и от соотношения между медью и цинком в сульфидных продуктах. Исследован процесс высокотемпературного выщелачивания биораствором медного и медно-цинковых концентратов с различным содержанием сульфидных минералов. Показано, что эффективно выщелачиваются те концентраты, содержание меди в которых выше содержания цинка и при этом превышает 10%. Из таких концентратов можно получить кондиционный медный концентрат при низком содержании в нем цинка, а также растворы сульфатов цветных металлов, из которых они могут быть выделены в товарной форме. Показано, что осадок ярозита, полученный в процессе удаления избытка железа из биораствора, содержит небольшое количество цветных металлов и поэтому являлся относительно инертным при его хранении. Отход содержал значительно меньше цветных металлов, чем отходы других отраслей промышленности, связанных с переработкой подобного сырья.

Следует отметить, что все имеющиеся способы разделения медных и цинковых минералов, например, селективная флотация, не обеспечивают таких высоких показателей снижения содержания цинка и повышения содержания меди в концентратах по сравнению с предлагаемой технологией. Дальнейшее развитие исследований в этом направлении может быть использовано для повышения эффективности биогидрометаллургической переработки полиметаллических упорных сульфидных руд и концентратов.

Публикации:

1. Fomchenko N.V., Muravyov M.I. Two-step biohydrometallurgical technology of copper-zinc concentrate processing as an opportunity to reduce negative impacts on the environment // **Journal of Environmental Management**. 2018. V. 226. P. 270–277.
2. Muravyov M.I., Fomchenko N.V. Biohydrometallurgical treatment of old flotation tailings of sulfide ores containing non-ferrous metals and gold // **Minerals Engineering**. 2018. V. 122. P. 267–276.
3. Фомченко Н.В., Муравьев М.И., Меламуд В.С. Биорегенерация выщелачивающих растворов в двухстадийном процессе переработки медно-цинкового концентрата // **Прикладная биохимия и микробиология**. 2018. Т. 54. № 4. С. 416–420.
4. Fomchenko N.V., Muravyov M.I. Effect of sulfide mineral content in copper-zinc concentrates on the rate of leaching of non-ferrous metals by biogenic ferric iron // **Hydrometallurgy**. 2019. V. 185. P. 82–87.
5. Фомченко Н.В., Муравьев М.И. Анализ качества отходов в двухстадийной биогидрометаллургической технологии переработки медно-цинкового концентрата // **Прикладная биохимия и микробиология**. 2019. Т. 55. № 1. С. 64–68.
6. Fomchenko N., Uvarovaa T., Muravyov M. Effect of mineral composition of sulfidic polymetallic concentrates on nonferrous metals bioleaching // **Minerals Engineering**. 2019. V. 138. P. 1-6. Doi: 10.1016/j.mineng.2019.04.026

ЛИГНОЦЕЛЛЮЛОЛИТИЧЕСКИЙ КОМПЛЕКС ДЕРЕВОРАЗРУШАЮЩИХ БАЗИДИОМИЦЕТОВ ПОРЯДКА POLYPORALES: ПЕРВИЧНЫЕ VS ВТОРИЧНЫЕ КСИЛОТРОФЫ

Глазунова О.А.¹, Моисеенко К.В.¹, Шахова Н.В.², Васина Д.В.¹, Савинова О.С.¹, Псурцева Н.В.², Федорова Т.В.¹

¹ ИНБИ ФИЦ Биотехнологии РАН

² Ботанический институт им. В.Л. Комарова РАН

Мицелиальные грибы обладают мощным потенциалом к разложению растительных, в том числе древесных субстратов, и тем самым являются необходимыми элементами углеродного цикла Земли, генерации гуминового составляющего почвы и формирования ее тонкой структуры. Деворазрушающие грибы, принадлежащие к отряду Basidiomycota, уникальны по своей способности разрушать компоненты клеточных стенок ксилемы. Экология деворазрушающих грибов напрямую связана с видом поражаемой ими древесины. В природных экосистемах базидиальные грибы белой гнили встречаются на неразрушенной, частично разрушенной и погребенной древесине, а также корнях. В зависимости от типа и состояния колонизируемого субстрата (разрушенная или неразрушенная древесина, древесина в почве) процессы роста гриба и утилизации лигнина, целлюлозы и гемицеллюлоз существенно различаются. Деструкция древесных субстратов является комплексным процессом, эффективность которого определяется действием ферментативных систем грибов и напрямую зависит от их качественного и количественного состава.

В работе секвенированы на платформе Illumina HiSeq 2500 и аннотированы геномы деворазрушающих грибов белой гнили порядка Polyporales: *Trametes hirsuta* – представителя первичных раневых сапротрофов и активного деструктора древесины с высоким деградационным потенциалом; *Steccherinum ochraceum* – представителя вторичных сапротрофов, предпочитающих заселять частично разрушенную древесину.

Наши геномные данные показали, что *T.hirsuta* и *S.ochraceum* обладают широким репертуаром ферментативных механизмов для разложения лигноцеллюлозного материала. Сравнительный анализ геномов и секретомов данных базидиомицетов продемонстрировал генетические и ферментативные механизмы, регулирующие адаптацию *T.hirsuta* и *S.ochraceum* к росту на древесине разной степени деструкции. Так в геноме *S.ochraceum*, по сравнению с *T.hirsuta*, суммарно обнаружено меньшее количество генов, кодирующих белки семейства гликозил-гидролаз (GH), в то время как генов белков некоторых семейств AA из CAZy обнаружено значительно большее количество (например, таких как AA3, AA7, AA6 и AA1_1). Поскольку семейство AA7 содержит глюкоолигосахаридоксидазы, участвующие в деградации частично гидролизованного биополимера целлюлозы, а семейства AA6 и AA1_1 содержат 1,4-бензохинонредуктазы и лакказы, которые участвуют в детоксикации различных ароматических соединений, образующихся в результате деструкции лигнина – это можно рассматривать как отражение субстратных предпочтений *S.ochraceum* по отношению к уже частично разрушенной древесине. Данные биохимических тестов и анализ экзопротеомов подтвердили данные геномных исследований.

Представленные в работе данные являются базой для дальнейших исследований, направленных на понимание различных аспектов деградации лигноцеллюлозы грибами белой гнили.

Публикации:

1. Moiseenko K.V., Glazunova O.A., Shakhova N.V., Savinova O.S., Vasina D.V., Tyazhelova T.V., Psurtseva N.V., Fedorova T.V. Fungal Adaptation to the Advanced Stages of Wood Decomposition: Insights from the *Steccherinum ochraceum* // **Microorganisms** (2019), Vol. 7, 527; doi:10.3390/microorganisms7110527 (IF 4.167).
2. Savinova O.S., Moiseenko K.V., Vavilova E.A., Chulkin A.M., Fedorova T.V., Tyazhelova T.V., Vasina D.V. Evolutionary relationships between the laccase genes of Polyporales: orthology-based classification of laccase isozymes and functional insight from *Trametes hirsuta* // **Front. Microbiol.** (2019), 10:152, 1-14. doi: 10.3389/fmicb.2019.00152 (IF 4.259).
3. Glazunova O.A., Moiseenko K.V., Kamenihina I.A., Isaykina T.U., Yaropolov A.I., Fedorova T.V. Laccases with Variable Properties from Different Strains of *Steccherinum ochraceum*: Does Glycosylation Matter? // **Int. J. Mol. Sci.** (2019), 20, 2008, 1-9; doi:10.3390/ijms20082008 (IF 4.183).

ФУНКЦИОНИРОВАНИЕ III ФОРМЫ РУБИСКО В ТРАНСАЛЬДОЛАЗНОМ ВАРИАНТЕ ЦИКЛА КАЛЬВИНА У ТЕРМОФИЛЬНЫХ ПРОКАРИОТ

Фролов Е.Н.¹, Кубланов И.В.¹, Тошчаков С.В.¹, Лунёв А.А.², Пименов Н.В.¹, Бонч-Осмоловская Е.А.^{1,3}, Черных Н.А.¹, Лебединский А.В.¹

¹ ИНИИ ФИЦ биотехнологии РАН

² Институт живых систем, Балтийский федеральный университет им. И. Канта

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

В ходе нашего недавнего исследования диссимиляционной сульфатредукции в кислых термальных источниках была выделена и охарактеризована новая автотрофная сульфатредуцирующая бактерия *Thermodesulfobium acidiphilum* 3127-1^T, являющаяся вторым видом единственного рода глубокой филогенетической линии уровня филума. В процессе характеристики *T. acidiphilum* был отсекален и собран в кольцо его геном. Анализ генома показал присутствие 3 генных кластеров, которые включали в себя все необходимые гены для ферментов цикла Кальвина кроме седогептулоза-1,7-бисфосфатазы и седогептулоза-1,7-бисфосфатаальдозазы. В тоже время было показано присутствие двух генов трансальдозаз. Помимо этого, филогенетический анализ ключевого белка цикла Кальвина - РубисКО - выявил, что РубисКО из *T. acidiphilum* 3127-1^T совместно с гомологами из *T. narugense* Na82^T, *Ammonifex degensii* KC4^T и *Ammonifex thiophilus* SR^T образуют отдельный кластер у основания всей ветви III формы РубисКО, для которой ранее не была показана карбоксилирующая активность. Исходя из вышесказанного, мы предположили функционирование III формы РубисКО в трансальдозазном варианте цикла Кальвина для фиксации углекислого газа в *T. acidiphilum* 3127-1^T. Результаты, полученные в ходе последующих биохимических и протеомных исследований, подтвердили нашу гипотезу. Таким образом, впервые было показано функционирование III формы РубисКО при автотрофном росте, а также впервые представлены доказательства существования трансальдозазного варианта цикла Кальвина.

Публикация:

Frolov E.N., Kublanov I.V., Toshchakov S.V., Lunev E.A., Pimenov N.V., Bonch-Osmolovskaya E.A., Lebedinsky A.V., Chernyh N.A. Form III RubisCO-mediated transaldolase variant of the Calvin cycle in a chemolithoautotrophic bacterium // **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**. 2019. V. 116 (37). P. 18638-18646. doi: 10.1073/pnas.1904225116.