

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

23-25 мая 2016

НОВЫЕ МЕТАНОТРОФНЫЕ БАКТЕРИИ ИЗ ХОЛОДНЫХ ЭКОСИСТЕМ

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

ИНМИ, ФИЦ Биотехнологии РАН,

* МГУ им. М.В. Ломоносова

Психрофильные и психротолерантные метанотрофные бактерии, слагающие метановый «фильтр» холодных экосистем, изучены слабо. Лишь ограниченное число этих микроорганизмов были получены в культурах и охарактеризованы. Исследования, представленные в настоящем докладе, ставили своей задачей расширение спектра культур метанотрофных бактерий из холодных наземных экосистем и изучение их характеристик. Первым изученным нами объектом являлись подвижные метанотрофы со спирилло-подобной морфологией клеток, которые были идентифицированы в качестве потенциально нового рода метанотрофов - *Candidatus* «*Methylospira mobilis*» - в пределах семейства *Methylococcaceae*. Это первый известный пример облигатно микроаэрофильных метанотрофов. Экологическое преимущество этих бактерий заключается в возможности быстрого передвижения в полужидких и гетерогенных средах с помощью характерного для спирилл движения по типу «вкручивания клеток» по градиенту доступности метана и способности активного развития в локусах с низкой концентрацией кислорода (озерных и речных осадках, торфе, почвах и проч.). Нуклеотидные последовательности генов *pmoA*, кодирующих мембранную метанмонооксигеназу этих метанотрофов, представляют обособленную группу *pmoA* последовательностей, в составе которой до последнего времени не было культивируемых организмов. Анализ распространения этих бактерий с применением *pmoA*-микрочипов подтвердил, что данная группа метанотрофов типична для северных экосистем. Уникальность этих микроорганизмов позволила опубликовать результаты их исследований в одном из наиболее престижных изданий – *The ISME Journal* (IF 9.3). Вторая работа в рамках этой тематики была посвящена описанию нового вида психротолерантных метанотрофов - *Methylovulum psychrotolerans* sp. nov. Наиболее интересная особенность этих метанотрофов заключается в их способности к активному росту и окислению метана в диапазоне низких температур (вплоть до 2°C). О широком распространении подобных метанотрофов в различных холодных экосистемах, таких как арктические озера, воды тающих ледников и проч., уже не раз сообщалось ранее в работах, выполненных с помощью молекулярных анализов. Полученные и изученные нами изоляты объясняют эти ранее полученные данные молекулярных исследований.

Публикации

1. Danilova O.V., Suzina N.E., Van De Kamp J., Svenning M.M., Bodrossy L., Dedysh S.N. A new cell morphotype among methane oxidizers: a spiral-shaped obligately microaerophilic methanotroph from northern low-oxygen environments// *ISME J.* 2016. In press: doi: 10.1038/ismej.2016.48.
2. Oshkin I.Y., Belova S.E., Danilova O.V., Miroshnikov K.K., Rijpstra W.I.C., Sinninghe Damste J.S., Liesack W., Dedysh S.N. *Methylovulum psychrotolerans* sp. nov., a neutrophilic methanotroph from low-temperature terrestrial environments. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2016. In press: doi: 10.1099/ijsem.0.001046

Исследования выполнены в рамках работ по проекту РФФИ-Норвегия № 14-04-93082 «Микробный метановый фильтр в Арктике: функциональная пластичность и ответ на изменения климата».

ВАКУОЛЬ КАК ИСТОЧНИК ИОНОВ КАЛЬЦИЯ ДЛЯ ОРГАНЕЛЛ СЕКРЕТОРНОГО ПУТИ У ДРОЖЖЕЙ *HANSENULA POLYMORPHA*

Фокина А.В., Каргинов А.В., Тер-Аванесян М.Д., Агафонов М.О.

ИНБИ, ФИЦ Биотехнологии РАН

Процессы, протекающие в органеллах секреторного пути, требуют наличия Ca^{2+} . Принято считать, что ионы кальция попадают в секреторные органеллы дрожжей с помощью Ca^{2+} , Mn^{2+} -АТФазы аппарата Гольджи Pmr1. С использованием в качестве модельного объекта дрожжей *H. polymorpha* мы выявили три различных процесса в клетке, нарушение которых усиливает проявления нехватки Ca^{2+} в секреторном пути, вызванные инактивацией Pmr1 (*pmr1-Δ*). В частности, такой эффект был обнаружен при дефекте белкового комплекса COP1 (мутация *ret1-27*), обеспечивающего везикулярный транспорт между секреторными органеллами, при инактивации вакуолярной Ca^{2+} -АТФазы Pmc1, а также при инактивации компонента белкового комплекса, отвечающего за транспорт между вакуолью и органеллами секреторного пути, Vps35 (*vps35-Δ*). Вакуоль дрожжей является главным резервуаром для накопления и утилизации кальция в клетке. Нарушение вакуолярной Ca^{2+} -АТФазы Pmc1 снижает концентрацию Ca^{2+} в этой органелле и повышает её в цитозоле. Поэтому усиление фенотипических проявлений мутации *pmr1-Δ* при инактивации этой ионной помпы свидетельствовало о доставке Ca^{2+} в секреторные органеллы из вакуолярного пула. Аналогичный эффект мутаций *vps35-Δ* и *ret1-27* указывал на то, что эта доставка осуществляется транспортными везикулами. Характер влияния этих мутаций на морфологию вакуоли, а также на транспорт и созревание вакуолярного белка карбоксипептидазы Y, указывал на то, что они могут затрагивать разные этапы пути доставки кальция из вакуоли в секреторные органеллы. В совокупности наши данные указывают на наличие в клетке ранее неизвестного, независимого от АТФазы Pmr1, пути доставки Ca^{2+} в органеллы секреторного пути.

Публикация

1. Fokina AV, Chechenova MB, Karginov AV, Ter-Avanesyan MD, Agaphonov MO (2015) Genetic Evidence for the Role of the Vacuole in Supplying Secretory Organelles with Ca^{2+} in *Hansenula polymorpha*. *PLoS ONE* 10(12): e0145915. doi:10.1371/journal.pone.0145915.

СИСТЕМНАЯ БИОЛОГИЯ РАСТЕНИЙ

Кочиева Е.З., Слугина М.А., Щенникова А.В., Шульга О.А., Камионская А.М., Скрыбин К.Г.

ИНБ, ФИЦ Биотехнологии РАН

В углеводном метаболизме растений участвует не менее 40 белков. Известны механизмы работы данных белков, но недостаточно сведений о кодирующих их генах: не описан их полиморфизм и аллельные варианты, не изучено возможное влияние мутаций на функции белков и устойчивость к абиотическим факторам.

Предметом исследования стали гены метаболизма сахарозы и крахмала, для которых помимо участия в сахарозном обмене наиболее ярко показана связь со стрессоустойчивостью: сахарозсинтаза *Sus2* и кислая вакуолярная инвертаза *Pain-1*, кислая апопластическая инвертаза *Lin7*, а также альфа-глюкан фосфорилаза *Stp23*.

Целью работы стала идентификация, анализ полиморфизма и паттернов экспрессии полноразмерных генов *Sus2*, *Pain-1*, *Lin7* и *Stp23* у представителей различных видов рода *Solanum*.

Нами клонированы, секвенированы и проанализированы первичные нуклеотидные последовательности данных генов у 10 видов диких и культивируемых видов *Solanum*. Описан экзон-интронный состав новых генов-гомологов, уровни межвидового и внутривидового полиморфизма, выявлены как единичные нуклеотидные замены, так и индели, среди которых есть как видоспецифичные, так и характерные для групп видов. Были выявлены аминокислотные замены, среди которых были и радикальные, которые потенциально могут приводить к образованию иной конформации белка.

Также впервые определены уровни экспрессии данных генов углеводного метаболизма в максимальном количестве различных органов растения и на различных этапах бутонизации и созревания плодов.

Показано, что исследуемые гены углеводного метаболизма представляют собой прекрасный инструмент для определения филогении и эволюции представителей *Solanum* подсемейства *Lycopersicum*. Предложена схема возможной эволюции данных генов-гомологов у представителей *Solanum*.

Публикации

1. М.А. Слугина, Е.А. Снегирь, Н.Н. Рыжова, Е.З. Кочиева “Структура и полиморфизм фрагмента локуса *Pain-1*, кодирующего вакуолярную инвертазу видов *Solanum*” Молекулярная биология, 2013, Том. 47, N. 2, стр. 215–221.
2. М.А. Слугина, И.А. Храпалова, Н. Н. Рыжова, Е. З. Кочиева, академик К.Г. Скрыбин “Полиморфизм гена инвертазы *Pain-1* у представителей рода *Solanum*” - Доклады Академии Наук, 2014. Том. 454, N. 1, стр. 1–3.
3. М.А. Слугина, К.В. Борис, А.А. Какимжанова, Е. З. Кочиева “Внутривидовой полиморфизм генов сахарозсинтазы картофеля сортов российской и казахстанской селекции” - Генетика, 2014, том 50, №6, с. 1-6.
4. М.А. Слугина, Е.З. Кочиева «Вариабельность фрагмента кислой вакуолярной инвертазы *Pain-1* у сортов картофеля» - Вавиловский журнал генетики и селекции, 2014, том 18, №4/1.
5. Заявка на патент: «Способ количественного определения геномной ДНК картофеля в растительном сырье и в продуктах, получаемых на его основе, в том числе при количественной идентификации ГМО, с использованием высокоспецифичного ДНК-маркера».

ТРАНСАМИНАЗА РАЗВЕТВЛЕННЫХ АМИНОКИСЛОТ ИЗ АРХЕИ *THERMOPROTEUS UZONIENSIS*: АНАЛИЗ НЕОБЫЧНОЙ СУБСТРАТНОЙ СПЕЦИФИЧНОСТИ, СВЯЗЬ СТРУКТУРЫ И ФУНКЦИИ

Безсуднова Е.Ю.¹, Стеханова Т.Н.¹, Суплатов Д.А.², Марданов А.В.³, Ракитин А.Л.¹, Николаева А.Ю.^{1,4}, Бойко К.М.^{1,4}, Бонч-Осмоловская Е.А.⁵, Равин Н.В.³, Попов В.О.^{1,4}

¹ ИНБИ, ФИЦ Биотехнологии РАН

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

³ ИНБ, ФИЦ Биотехнологии РАН

⁴ КК НБИКС-Т, НИЦ “Курчатовский институт”

⁵ ИНМИ, ФИЦ Биотехнологии РАН

Впервые проведена структурно-функциональная характеристика трансаминазы разветвленных аминокислот из архей. Трансаминазы разветвленных аминокислот или ВСАТs (branched-chain amino acid aminotransferases) являются ключевыми ферментами метаболизма аминокислот в бактериях и эукариотах, где катализируют обратимый перенос аминогруппы с природных субстратов, L-Leu, L-Val, L-Ile, на α -кетоглутарат. ВСАТs обнаружены во всех аннотированных геномах архей, однако архейные трансаминазы пока еще недостаточно изучены, так же как и метаболизм аминокислот в археях. Объектом данного исследования является рекомбинантная трансаминаза, продукт экспрессии гена TUZN_1299 из генома археи *Thermoproteus uzoniensis*. Охарактеризованная трансаминаза отличается высокой термостабильностью (активна до 95 °С) и необычной специфичностью к положительно заряженным аминокислотам (L-орнитину, L-лизину, L-аргинину и L-гистидину). Фермент активен с природными и неприродными разветвленными L-аминокислотами, но неактивен с типичным для трансаминаз аминокислотным акцептором – α -кетоглутаратом.

Структура ВСАТ из *T. uzoniensis* решена с разрешением 2.0 Å. Фермент относится к типу фолд IV PLP-связывающих ферментов. Анализ субстрат связывающих карманов в трансаминазе выявил некоторые различия в организации активного центра архейной ВСАТ и типичной ВСАТ из *E.coli*, активной с α -кетоглутаратом. Моделирование L-орнитина в активном центре трансаминазы выявило центр связывания для положительно заряженной боковой группы субстрата (сближенные остатки двух глутаматов), который, однако не препятствует связыванию α -кетоглутарата. Плохое связывание α -кетоглутарата, по-видимому, является следствием замен консервативных остатков в большом субстрат связывающем кармане. Гомологичные трансаминазы обнаружены только в археях порядка *Thermoproteales*.

Работа поддержана грантом РФФИ № 14-24-00172 и грантом ERA-IB “THERMOGENE”.

Публикация

1. Boyko KM, Stekhanova TN, Nikolaeva AY, Mardanov AV, Rakitin AL, Ravin NV, Bezsudnova EYu & Popov VO (2016) First structure of archaeal branched-chain amino acid aminotransferase from *Thermoproteus uzoniensis* specific for L-amino acids and R-amines. *Extremophiles* 20, 215-225.

РЕГУЛЯЦИЯ ФОРМИРОВАНИЯ МИКРОБНЫХ БИОПЛЕНОК КАК ПЕРСПЕКТИВНОЕ НАПРАВЛЕНИЕ МИКРОБИОЛОГИИ, БИОТЕХНОЛОГИИ И МЕДИЦИНЫ

В.К.Плакунов¹, М.В.Журина¹, А.В.Ганнесен¹, С.А.Мартьянов¹, Г.И.Эль-Регистан¹,
Э.Л.Здоровенко², А.С.Шашков², Ю.А.Книрель², М.А.Веселова³, И.А.Хмель³.

¹ ИНМИ, ФИЦ Биотехнологии РАН

² Институт органической химии им. Н.Д.Зелинского РАН

³ Институт молекулярной генетики РАН

Исследование микробных биопленок проводили методами метабомики с применением современных микробиологических, биохимических и физико-химических подходов. Совместно с сотрудниками Института органической химии РАН с помощью C^{13} ЯМР обнаружены существенные различия структуры липополисахаридов наружной мембраны планктонных клеток *P. chlororaphis* и клеток, входящих в матрикс биопленки. В частности, степень 6-О-ацетилирования галактозного остатка у планктонных клеток составляет 60% , а у клеток, входящих в состав биопленки, только 10%. Этим может объясняться слабое взаимодействие биопленочных бактерий с иммунными системами макроорганизма даже после разрушения матрикса биопленок. Совместно с сотрудниками Института молекулярной генетики РАН с использованием нефтеокисляющих бактерий, а также специфических мутантов модельных сапротрофных бактерий с повреждениями глобальных регуляторных систем («quorum sensing»; RpoS-зависимых систем; двухкомпонентной системы GacA-GacS; системы оперона *phz*) установлена важная роль системы «quorum sensing» в синтезе матрикса биопленок, а также в эффекте стимуляции формирования биопленок субингибиторными концентрациями антибиотиков (явление, имеющее важное значение для химиотерапии и биотехнологии). Поиск антибиопленочных агентов показал, что представитель класса алкилоксибензолов (АОБ) обладает способностью примерно в равной степени подавлять рост как планктонных культур, так и биопленок изученных штаммов сапротрофных бактерий. При совместном действии азитромицина и АОБ в некоторых случаях наблюдается аддитивный ингибиторный эффект. Все это позволяет рассматривать АОБ как перспективное «антибиопленочное» средство.

Публикации

1. Zhurina M.V., Gannesen A.V. , Zdrovenko E.L. , Plakunov V.K. Composition and functions of the extracellular polymer matrix of bacterial biofilms. Review // *Microbiology*. 2014. V. 83. No. 6. P. 713–722.
2. Zdrovenko E.L. , Shashkov A.S., Zhurina M.V., Plakunov V.K., Knirel Y.A. Structure of the O-specific polysaccharides from planktonic and biofilm cultures of *Pseudomonas chlororaphis* 449 // *Carbohydrate Research*. 2015. V.404. P. 93–97.
3. Ганнесен А.В., Журина М.В., Веселова М.А., Хмель И.А., Плакунов В.К. Регуляция процесса формирования биопленок *Pseudomonas chlororaphis* в системе *in vitro* // *Микробиология*. 2015. Т.84. №.3. С. 281–290.
4. Мартьянов С.В., Журина М.В., Эль-Регистан Г.И., Плакунов В.К. Активирующее действие азитромицина на формирование бактериальных биопленок и борьба с этим явлением // *Микробиология*. 2015. Т.84. № 1. С. 27–36.

ГЕНОМНЫЕ И МЕТАГЕНОМНЫЕ ПОДХОДЫ ДЛЯ ХАРАКТЕРИСТИКИ НОВЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ

Марданов А.В., Кадников В.В., Белецкий А.В., Ракитин А.Л., **Равин Н.В.**

ИНБ, ФИЦ Биотехнологии РАН

Определена нуклеотидная последовательность генома хитинолитической галоалкалофильной бактерии *Chitinospirillum alkaliphilum*, - первого культивируемого представителя нового класса в кандидатном филуме TG3. На основе геномных данных охарактеризованы особенности метаболизма исследуемого микроорганизма, пути утилизации хитина и других растительных полисахаридов, механизмы его адаптации к условиям высокой солености и щелочным рН содового озера. Клонированы, экспрессированы и функционально охарактеризованы две новые хитиназы из *Chitinospirillum alkaliphilum*, способные осуществлять гидролиз нерастворимого хитина при температурах 30-70С. Новые ферменты могут быть использованы в биотехнологических процессах переработки хитин-содержащего сырья.

Проведен метагеномный анализ микробного сообщества кислых дренажных вод в районе добычи руд цветных металлов в Забайкальском крае. Дренажные воды отходов добычи металлов часто характеризуются низким рН вследствие окисления сульфидов и высоким содержанием растворенных металлов. Экстремальные условия таких экосистем ограничивают разнообразие обитающих в них микроорганизмов. Мы исследовали микробное сообщество дренажных вод (Т 6.5°С, рН 2.65) в открытом карьере добычи полиметаллических руд на месторождении Шерловая гора методами метагеномики. В результате секвенирования метагенома микробное сообщество охарактеризовано на таксономическом и функциональном уровне. Более 80% микроорганизмов представлено одной некультивируемой линией, представляющей новый вид бета-протеобактерий рода *Gallionella*. На основе метагеномных данных определен имеющий размер 3.4 млн нт почти полный композитный геном бактерии этой новой линии, описанной нами как *Candidatus Gallionella acididurans* ShG14-8. Анализ генома показал, что окисление Fe(II), вероятно, осуществляется с участием цитохромов, локализованных на внешней мембране клеток. Электрон-транспортная цепь включает NADH дегидрогеназу, цитохром bc1 комплекс, альтернативный комплекс III, и цитохром-оксидазы bd, cbb3, и bo3 типа. Окисление восстановленных соединений серы может осуществляться с участием Sox системы, сульфид-хинон оксидоредуктазы, аденилсульфат редуктазы и сульфат аденилтрансферазы. Имеются гены, необходимые для автотрофной фиксации углерода в цикле Кальвина, но пути фиксации азота отсутствует. Устойчивость к тяжелым металлам может обеспечиваться за счет наличия большого числа транспортеров металлов RND семейства и АТФаз Р-типа. Новый микроорганизм является аэробным хемолитоавтотрофом, представляющим группу психротолерантных железо- и серо-окисляющих ацидофилов семейства *Gallionellaceae*, распространенных в кислых шахтных дренажах.

Публикации:

1. Karnachuk OV, Mardanov AV, Avakyan MR, Kadnikov VV, Vlasova M, Beletsky AV, Gerasimchuk AL, Ravin NV. (2015) Draft genome sequence of the first acid-tolerant sulfate-reducing deltaproteobacterium *Desulfovibrio* sp. TomC having potential for minewater treatment. *FEMS Microbiol Lett.* 362(4): 1-3.
2. Sorokin DY, Rakitin AL, Gumerov VM, Beletsky AV, Sinninghe Damsté JS, Mardanov AV, Ravin NV. (2016) Phenotypic and genomic properties of *Chitinospirillum alkaliphilum* gen. nov., sp. nov., a haloalkaliphilic anaerobic chitinolytic bacterium representing a novel class in the phylum *Fibrobacteres*. *Front. Microbiol.* 7: 407.
3. Кадников В.В., Ивасенко Д.А., Белецкий А.В., Марданов А.В., Данилова Э.В., Пименов Н.В., Карначук О.В., Равин Н.В. (2016) Новая некультивируемая бактерия семейства Gallionellaceae, - описание и реконструкция генома на основе анализа метагенома микробного сообщества кислых шахтных вод. *Микробиология*, V.85(4), 1-15

ОБЩНОСТЬ НАСМОРКА И ДИАРЕИ

Макаров В.А.¹, Рябова О.Б.¹, Казакова Е.С.¹, Schmidtke M.², Braun H.², Richter M., Kirchmair J.²

¹ ИНБИ, ФИЦ Биотехнологии РАН

² Институт вирусологии и противовирусной терапии, Клиника университета Йены, ФРГ

На сегодняшний день не существует препаратов для лечения энтеровирусных острых и хронических заболеваний, таких как обычная простуда, менингит, энцефалит, миокардит, кишечные энтеровирусные заболевания. Мы сообщаем об открытии и характеристике оригинального подхода к разработке соединений с анти энтеровирусной активностью, которые ингибируют репликацию широкого спектра рино- и энтеровирусов *in vitro* и *in vivo*, на примере Сохакіе ВЗ-индуцированного хронического миокардита у мышей. Используя постгеномные технологии, медицинскую химию и вирусологические методы, был осуществлен дизайн и синтез оригинальной группы соединений, взаимодействующих с вирусным белком капсида 1 (VP1). Показано, что исследуемые соединения через связывание с вирусным капсидом предотвращают начало жизненного цикла вируса. Фундаментальная часть работы опубликована, продолжается поиск кандидата на лекарственное средство и доклинические исследования.

Публикации:

1. Makarov V.A., Braun H., Richter M., Riabova O.B., Kirchmair J., Kazakova E.S., Seidel N., Wutzler P., Schmidtke M., Pyrazolopyrimidines: Potent Inhibitors Targeting the Capsid of Rhino- and Enteroviruses, *ChemMedChem*, 2015, 10, 1629-34.
2. Braun H., Kirchmair J., Williamson M.J., Makarov V.A., Riabova O.B., Glen R.C., Sauerbrei A., Schmidtke M., Molecular mechanism of a specific capsid binder resistance caused by mutations outside the binding pocket, *Antiviral Research*, 2015, 123, 138-145.

СПОРООБРАЗУЮЩАЯ ТЕРМОФИЛЬНАЯ БАКТЕРИЯ ВНУТРИ ИСКУССТВЕННОГО МЕТЕОРИТА СОХРАНЯЕТ ЖИЗНЕСПОСОБНОСТЬ ПОСЛЕ ПРОХОЖДЕНИЯ ЧЕРЕЗ АТМОСФЕРУ ЗЕМЛИ НА СПУСКАЕМОМ АППАРАТЕ ФОТОН-М4

Слободкин А.И.¹, Гаврилов С.Н.¹, Ионов В.Д.², Ильин В.К.²

¹ ИНМИ, ФИЦ Биотехнологии РАН

² Институт медико-биологических проблем РАН

Одним из ключевых условий гипотезы литопанспермии является возможность выживания живых организмов внутри метеоритов после их прохождения через плотные слои атмосферы Земли. До сих пор все экспериментальные доказательства такой возможности были основаны на тестах, проведенных с метеорологическими ракетами, скорость которых значительно меньше скоростей природных метеоритов. Мы провели исследования выживания термофильной анаэробной спорообразующей бактерии *Thermoanaerobacter siderophilus*, помещенной внутри базальтового диска толщиной 1,4 см (искусственный метеорит) и закрепленного на наружной поверхности спускаемого аппарата (эксперимент Метеорит, на борту КА Фотон-М4). После 45-суточного орбитального полета спускаемый аппарат был возвращен на Землю. Температура нагрева искусственного метеорита в течение спуска превышала температуру плавления базальта (1100 С). *T. siderophilus* пережил прохождение через атмосферу, жизнеспособные споры были обнаружены в 4 из 24 лунок, содержащих высушенные культуры данного микроорганизма. Идентичность культуры была подтверждена секвенированием гена 16S рНК и физиологическими тестами. Это первое сообщение о выживании живых объектов внутри искусственных метеоритов после прохождения через плотные слои атмосферы на скоростях, приближающихся к скоростям природных метеороидов. Характеристики искусственного метеорита и живого объекта, примененные в нашем исследовании, могут служить положительным контролем для дальнейших исследований возможности межпланетного транспорта.

Публикация

1. Slobodkin A., Gavrilov S., Ionov V., Iliyev V. (2015) Spore-forming thermophilic bacterium within artificial meteorite survives entry into the Earth's atmosphere on FOTON-M4 satellite landing module. *PLoS ONE* 10 (7) e0132611. Doi:10.1371/journal.pone.0132611

ЭПИГЕНЕТИКА ДРЕВНЕЙ ДНК

Прохорчук Е.Б.

ИНБ, ФИЦ Биотехнологии РАН

Изначально работа с древней ДНК была основана на анализе её первичной последовательности. Этот подход позволяет исследовать происходящие эволюционные изменения в различных популяциях, определять влияние окружающей среды на генетический отбор. Однако, усовершенствование методических подходов в области полногеномного анализа открыло новые возможности в изучении эпигенетических механизмов, вовлеченных в регуляцию экспрессии генов.

Работы, выполненные в нашей лаборатории, продемонстрировали возможность определения транскрипционной активности генов в образцах древней ДНК за счет комбинирования информации о метилировании ДНК и наличии участков, гиперчувствительных к ДНКазе1, для последовательностей, расположенных в стартах транскрипции генов.

В дальнейшем при нахождении хорошо сохранившихся тканей появляется перспектива в выявлении эволюционных изменений, связанных с эпигенетическими различиями в высшей нервной деятельности современного и древнего человека.

Публикации

1. Pedersen JS1, Valen E, Velazquez AM, Parker BJ, Rasmussen M, Lindgreen S, Lilje B, Tobin DJ, Kelly TK, Vang S, Andersson R, Jones PA, Hoover CA, Tikhonov A, Prokhortchouk E, Rubin EM, Sandelin A, Gilbert MT, Krogh A, Willerslev E, Orlando L. «Genome-wide nucleosome map and cytosine methylation levels of an ancient human genome», *Genome Res.* 2014-3: 454-66
2. Scelo G, Riazalhosseini Y, Greger L, Letourneau L, González-Porta M, Wozniak MB, Bourgey M, Harnden P, Egevad L, Jackson SM, Karimzadeh M, Arseneault M, Lepage P, How-Kit A, Daunay A, Renault V, Blanché H, Tubacher E, Sehmoun J, Viksna J, Celms E, Opmanis M, Zarins A, Vasudev NS, Seywright M, Abedi-Ardekani B, Carreira C, Selby PJ, Cartledge JJ, Byrnes G, Zavadil J, Su J, Holcatova I, Brisuda A, Zaridze D, Moukeria A, Foretova L, Navratilova M, Mates D, Jinga V, Artemov A, **Nedoluzhko A**, **Mazur A**, Rastorguev S, **Boulygina E**, Heath S, Gut M, Bihoreau MT, Lechner D, Foglio M, Gut IG, **Skryabin K**, **Prokhortchouk E**, Cambon-Thomsen A, Rung J, Bourque G, Brennan P, Tost J, Banks RE, Brazma A, Lathrop GM. «Variation in genomic landscape of clear cell renal cell carcinoma across Europe», *Nature Communications.* 2014 Oct 29;5:5135. doi: 10.1038/ncomms6135.
3. Nedoluzhko AV, Boulygina ES, Sokolov AS, Tsygankova SV, Gruzdeva NM, Rezepkin AD, Prokhortchouk EB. «Analysis of the Mitochondrial Genome of a Novosvobodnaya Culture Representative using Next-Generation Sequencing and Its Relation to the Funnel Beaker Culture.», *Acta Naturae*, 2014 Apr;6(2):31-5
4. Seguin-Orlando A, Gamba C, Der Sarkissian C, Ermini L, Louvel G, **Boulygina E**, **Sokolov A**, **Nedoluzhko A**, Lorenzen ED, Lopez P, McDonald HG, Scott E, Tikhonov A, Stafford TW Jr, Alfarhan AH, Alquraishi SA, Al-Rasheid KA, Shapiro B, Willerslev E, **Prokhortchouk E**, Orlando L «Pros and cons of methylation-based enrichment methods for ancient DNA». *Scientific Reports*, 2015; 5: 11826.

ПЕРВЫЕ АЛКАЛОФИЛЬНЫЕ ГИДРОГЕНОТРОФНЫЕ АЦЕТОГЕНЫ: ИХ НОВЫЕ ФУНКЦИИ, СВЯЗАННЫЕ С АНАЭРОБНЫМИ ЦИКЛАМИ ЖЕЛЕЗА И СЕРЫ

Заварзина Д.Г.¹, Деткова Е.Н.¹, Патутина Е.О.², Кузнецов Б.Б.²

¹ИНМИ, ФИЦ Биотехнологии РАН

²ИНБ, ФИЦ Биотехнологии РАН

Из придонных осадков высокоминерализованного коллектора содового озера Танатар III (Алтай) выделена новая гидрогенотрофная гомоацетогенная бактерия штамм Z-7101^T, отнесенная к новому виду *Fuchsiella ferrireducens* sp. nov. в составе открытого нами ранее рода *Fuchsiella*. Характерной особенностью бактерий данной группы является способность автотрофно окислять молекулярный водород за счет восстановления углекислоты с образованием ацетата в качестве единственного продукта. Впервые показано, что гомоацетогенные бактерии способны к диссимиляторной железоз- и сероредукции, причем могут использовать в качестве донора электронов молекулярный водород, что ранее не было показано для алкалофильных железоредукторов, а также ацетат, запуская при его использовании обратный для ацетогенеза механизм окислительного ацетил-СоА пути. Обнаружение у этой физиологической группы прокариот способности к восстановлению железа, входящего в состав гидроксида железа ферригидрита, в магнетит является подтверждением предположения о том, что железоредукция представляет собой древнейший способ получения энергии за счет преобразования неорганических соединений. Кроме того, полученные результаты могут служить дополнительным аргументом в пользу гипотезы о существенной роли микроорганизмов в образовании железисто-кремнистых формаций докембрия, таких как Курская магнитная аномалия, где сконцентрировано большинство мировых запасов железа, генезис которых до сих пор является дискуссионным.

Публикация

1. *Fuchsiella ferrireducens* sp. nov., a novel haloalkaliphilic, lithoautotrophic homoacetogen capable of iron reduction, and emendation of the description of the genus *Fuchsiella*. T. N. Zhilina¹, D. G. Zavarzina¹, E. N. Detkova¹, E. O. Patutina² and B. B. Kuznetsov². *IJSEM* (2015), 65, 2432–2440

ТРОФИЧЕСКИЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ПРОТЕОЛИТИЧЕСКОЙ БАКТЕРИИ *PROTEINIVORAX TANATARENSE* В АЛКАЛОФИЛЬНОМ МИКРОБНОМ СООБЩЕСТВЕ

Болтянская Ю. В., Кевбрин В. В.

ИНМИ, ФИЦ Биотехнологии РАН

Рассмотрено литическое действие анаэробной протеолитической бактерии *Proteinivorax tanatarense* на организмы с разным типом клеточной стенки. Показано, что в отсутствие выделения кислорода за счет фотосинтеза протеолитик способен к росту на интактной биомассе цианобактерий различных систематических групп, являясь, по-видимому, их обычным спутником-сапротрофом, регулирующим численность первичных продуцентов в темновой фазе. Также обнаружена способность к росту на биомассе нефототрофного грамотрицательного микроорганизма *Halomonas campisalis*, являющегося распространенным членом алкалофильного микробного сообщества. В опытах по взаимодействию с живой культурой *H. campisalis* показано, что литическое действие *P. tanatarense* ограничено, вероятно, мертвыми и/или ослабленными клетками тест-объекта. Продемонстрирована узкая направленность действия протеолитической бактерии на грамотрицательные микроорганизмы и отсутствие ее влияния на грамположительные.

Публикация:

1. Болтянская Ю.В., Кевбрин В.В. Трофические взаимодействия протеолитической бактерии *Proteinivorax tanatarense* в алкалофильном микробном сообществе // *Микробиология*. 2016. Т. 85. № 4.

РОЛЬ ФАКТОРОВ МЕЖКЛЕТОЧНОЙ КОММУНИКАЦИИ В РЕГУЛЯЦИИ ОБРАЗОВАНИЯ АНТИБИОТИКОТОЛЕРАНТНЫХ КЛЕТОК-ПЕРСИСТЕРОВ И ФЕНОТИПИЧЕСКИХ ПЕРЕХОДОВ

Николаев Ю.А.¹, Лойко Н.Г.¹, Мулюкин А.Л.¹, Демкина Е.В.¹, Козлова А.Н.¹, Гапонов А.М.², Тутельян А.В.³, Эль-Регистан Г.И.¹

¹ ИНМИ, ФИЦ Биотехнологии РАН

² «Центральный НИИ эпидемиологии» Роспотребнадзора

³ «ФНКЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России

Сформирована доказательная база участия факторов межклеточной коммуникации (ФК) микробного (гексилрезорцин, ГР, и метилрезорцин, МР) и животного (индолицидин, Ind, и интерлейкин1, И1) происхождения в контроле выживания бактериальных популяций условно патогенных бактерий (УПБ) (*Escherichia coli* K12, *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, *Staphylococcus aureus* 209P) при антибиотической атаке. Установлено участие ФК в контроле гетерогенности выживающих субпопуляций, включающих незначительную долю генотипически устойчивых антибиотикорезистентных (АР) клеток и клетки антибиотикотолерантных (АТ) фенотипов: неделящихся персистеров (П) как основной фенотип и мелкоколonoчного ($d \leq 1$ мм) SCV-варианта, как форму внутриклеточного бактерионосительства. Выявлены условия, способствующие образованию П: стрессы голодания, новой среды, суббактериоцидные концентрации плотностных регуляторов. Обнаружено синергидное действие антибиотиков (7 основных групп) и ГР (или Ind), которое обеспечивает: (а) выраженный киллинговый эффект при сниженной в 5-20 раз дозе антибиотиков; (б) уменьшение числа выживающих П на 3-5 порядков, что создаёт базу для разработки бинарных препаратов нового типа с целью соответственно снижения токсических эффектов антибиотиков и уменьшения риска бактерионосительства и рецидивов инфекций. Механизм синергидного действия ГР, обладающего функциями структурных модификаторов молекул биополимеров и мембран, заключается в активации экспрессии стрессовых генов (показано на мутантах *E. coli*, тестерных для SOS-ответа и groS-регулона) и ингибировании метаболической активности и защитных механизмов клетки, а антимикробного пептида Ind – в порировании мембран, что совокупно с действием антибиотика(ов) приводит к развитию дистресса и гибели клеток. Постулировано, что образование фенотипов П и SCV как форм персистенции бактерий – процессы не столько стохастические, сколько регулируемые факторами межклеточной коммуникации, что открывает возможности их контроля. Выявлено дозозависимое влияние ГР как плотностного регулятора бактерий на фенотипическую вариабельность популяций, в т.ч. образование пилей I типа у тестерного мутанта *E.coli*, что предполагает возможность контроля вирулентности УПБ. Получены доказательства в пользу гипотезы о трансформации (созревании) П, в которых пройдена стадия цитодифференцировки, в анабиотические покоящиеся формы (ПФ) как морфотип бактерионосительства и длительного выживания в природных объектах. Для длительно (≥ 1 мес.) хранящихся П: (а) выявлена корреляция их численности и ПФ, образующихся в стрессовых и стандартных условиях; (б) показана терморезистентность (75° С, 5 мин), свойственная ПФ; (в) установлена аналогия ультратонкого строения П и стандартно полученных ПФ. На основании транскриптомного анализа mRNA 2 мес. персистеров (ПФ), проросших ПФ и вегетативных клеток (3-4 генерация), выявившего существенные различия в составе и удельном количестве mRNA/клетку, сформулирована гипотеза о реализации фенотипической гетерогенности популяций через стадию образования «персистеров \rightarrow ПФ» с их последующим прорастанием как совокупности различающихся фенотипов, из которых доминантным станет селекционирующийся данными условиями среды.

Публикации

1. Лойко Н.Г., Козлова А.Н., Николаев Ю.А., Гапонов А.М., Тутельян А.В., Эль-Регистан Г.И. Влияние стресса на образование антибиотикотолерантных клеток *Escherichia coli* // *Микробиология*. 2015. Т. 84. № 5. С. 512-528.
2. Демкина Е.В., Лойко Н.Г., Мулюкин А.Л., Смирнова Т.А., Гапонов А.М., Писарев В.М., Тутельян А.В., Николаев Ю.А., Эль-Регистан Г.И. Влияние факторов врожденного иммунитета на развитие антибиотикотолерантности и выживание бактериальных популяций, подвергаемых антибиотической атаке // *Микробиология*. 2015. Т. 84. № 6. С. 660-672.
3. Мулюкин А.Л., Козлова А.Н., Сорокин В.В., Сузина Н.Е., Чердынцева Т.А., Котова И.Б., Гапонов А.М., Тутельян А.В., Эль-Регистан Г.И. Формы выживания *Pseudomonas aeruginosa* при антибиотической обработке // *Микробиология*. 2015. Т. 84. № 6. С. 645-659.

ФИЛОГЕНЕТИЧЕСКОЕ И ФУНКЦИОНАЛЬНОЕ РАЗНООБРАЗИЕ МИКРООРГАНИЗМОВ, ТРАНСФОРМИРУЮЩИХ ПОЛИВАЛЕНТНЫЕ ЭЛЕМЕНТЫ В ЭКСТРЕМАЛЬНЫХ И УМЕРЕННЫХ ЭКОСИСТЕМАХ

Горленко В.М., Брянцева И.А., Дубинина Г.А., Сорокин Д.Ю., Намсараев З.Б., Нуянзина Е.Н., Хижняк Т.В.

ИНМИ, ФИЦ Биотехнологии РАН

Исследованы экология, участие в продукции органического вещества и в трансформации переменновалентных элементов аноксигенных фототрофных бактерий содовых и соленых водоемов. Дано таксономическое описание новой алкалофильной аэробной аноксигенной фототрофной бактерии, *Roseibacula alcaliphila* gen. nov., sp. nov. и алкалофильных несерных пурпурных бактерий *Rhodobaculum claviforme*. Уточнено филогенетическое положение пурпурной серобактерии *Lamprobacter modestohalophilus*. Опубликован формальный диагноз нового таксона мезофильных умеренно алкалофильных нитчатых бактерий 'Candidatus *Chloroploca asiatica*' gen. nov., sp. nov.. Исследованы фототрофные сообщества семи термальных источников Байкальской рифтовой зоны (БРЗ). Для идентификации АНФБ был выбран группоспецифический молекулярно-генетический маркер – оперон *rufLM* с модификациями для дифференциальной диагностики. Впервые в источниках БРЗ были описаны представители рода *Roseiflexus*. Выявленные *Roseiflexus* формировали новый филотип видового уровня.

Впервые обнаружены новые полифункциональные метаболические свойства у новых пресноводных литотрофных представителей альфа-, бета- и гаммапротеобактерий, важные для оценки их роли в природных экосистемах. Помимо окисления соединений серы, новые виды *Thioflexothrix psecupsii* gen. nov., sp. nov., *Azospirillum thiophilum* sp. nov., и выделенный нами ранее вид *Beggiatoa leptomitiformis* neotype D402 способны к литоавтотрофии за счет окисления молекулярного водорода, а также к фиксации N₂. Описаны полные геномы *B. leptomitiformis* и *A. thiophilum*. Новые виды серобактерий обладают пластичным метаболизмом и большими адаптационными возможностями, что способствует их существованию в нестабильных условиях внешней среды. Описан новый вид спирохет, устойчивый к высоким концентрациям NaCl.

В ходе исследования процессов серного дыхания у экстремально гало- и натроно-фильных эвриархей в гиперсоленых озерах обнаружены облигатно экстремально гало(натроно)фильных архей, способные к анаэробному серному дыханию. Группа сероредуцирующих галоархей представлена 2 новыми родами облигатных анаэробов. Первая ("*Halanaeroarchaeum sulfurireducens*") окисляет ацетат за счет восстановления элементной серы и является первым представителем всего архейного царства с подобным катаболизмом. Расшифровка генома показала, что активация ацетата с последующим окислением за счет ЦТК напоминает один из путей, известных для ацетат-окисляющих СРБ. Также показано наличие 4 оперонов Мо-полисульфид редуктаз, один из которых также содержит серотрансферазу. Вторая подгруппа галоархей ("*Halodesulfuriferaeum formicum*") способна к литотрофному росту (также неизвестному ранее среди галоархей) за счет формиата или водорода в качестве доноров и элементной серы или тиосульфата в качестве акцепторов электронов. Расшифровка двух геномов показала наличие Ni-Fe гидрогеназы древнего (архейного) типа, нескольких Мо-формиат дегидрогеназ и 6 оперонов, кодирующих Мо оксидоредуктазы, видимо, вовлеченные в серное дыхание. Группа сероредуцирующих натроноархей из гиперсоленых содовых озер представлена 2 новыми родами факультативных анаэробов "*Natranaeroarchaeum sulfurireducens*" и "*Halalkaliarchaeum sulfurireducens*", использующих H₂, формиат и C4-C10 ЛЖК в качестве доноров электронов в ходе серного дыхания.

Показано восстановление Cr(VI) (2.5 mM) новым представителем бактерий рода *Halomonas* в щелочных анаэробных условиях с осаждением нерастворимого минерала, содержащего Cr(III). Полученные результаты перспективны для создания биотехнологий очистки щелочных хромсодержащих отходов.

Публикации

1. Брянцева И.А., Гайсин В.А., Горленко В.М. Новая алкалофильная несерная пурпурная бактерия *Rhodobaculum claviforme* gen. nov., sp. nov.. *Микробиология*, 2015. Т. 84. № 2. С. 225–235
2. Fomenkov A., Vinze T., Grabovich M., Dubinina G., Brian A., Orlova M., Belonsove E., Roberts R. Complete genome sequence of a strain of *Azospirillum thiophilum* isolated from a sulfide spring. *Genome Announcement*. 2016; 4(1): e01521-15.
3. Fomenkov A., Vinze T., Grabovich M., Dubinina G., Brian A., Orlova M., Belonsove E., Roberts R. Complete genome sequence of the freshwater colorless sulfur bacterium *Beggiatoa leptomitiformis* neotype strain D-402^T. *Genome Announc.* 2015; 3(6): e01436-15.
4. Dubinina G., Grabovich M., Gronow S., Gavrich E., Akimov V. *Spirochaeta sinaica* sp. nov., a halophilic spirochaeta isolated from a cyanobacterial mat. *IJSEM*. 2015. 65(11): 3872-3877.
5. Sorokin D.Y., Kublanov IV, Gavrilov SN, Rojo D, Roman P, Golyshin PN, Slepak VZ, Smedile F, Ferrer M, Messina E, La Cono V, Yakimov MM. Elemental sulfur and acetate can support life of a novel strictly anaerobic haloarchaeon. *The ISME J.* 2016. 10: 240-252.
6. Sorokin D.Y., Banciu H.A., Muyzer G. Functional microbiology of soda lakes. *Curr Opin Microbiol.* 2015. 25: 88-96
Watts M.P., Khijniak T.V., Boothman C., Lloyd J.R. Treatment of alkaline Cr(VI)-contaminated leachate with an alkaliphilic metal-reducing bacterium. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2015. 81(16): 5511-8.

РАЗВЕТВЛЕННАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ БОКОВЫХ ФИБРИЛЛ У T5-ПОДОБНЫХ БАКТЕРИОФАГОВ DT57C И BE571/2

Голомидова А.К.¹, Куликов Е.Е.¹, Прохоров Н.С.¹, Guerrero-Ferreira R. C.², Книрель Ю.А.³, Кострюкова Е.С.⁴, Тарасян К.К.^{1,5} и Летаров А.В.¹

¹ Институт микробиологии им. С.Н. Виноградского ФИЦ Биотехнологии РАН

² École polytechnique fédérale de Lausanne, CE 3 316 (Centre Est), Station 1, CH-1015 Lausanne, Switzerland; ricardo.guerrero@epfl.ch

³ Институт органической химии им. Н.Д. Зелинского РАН

⁴ НИЦ Физико-химической медицины ФМБА РФ

⁵ Институт экологии и эволюции им. А.Н. Северцова РАН.

Колифаги DT57C и DT571/2, выделенные нами из фекалий лошади в 2006 г., являются T5-подобными сифовирусами (относятся к роду *T5virus* по классификации ICTV). Эти вирусы близки по последовательности геномов друг к другу, при этом по последовательности большинства белков вирусной частицы они практически идентичны колифагу T5. По результатам анализа полногеномных последовательностей этих фагов нами подана заявка на создание нового вида DT57C в рамках рода *T5virus*, при этом фаг DT571/2 может рассматриваться как штамм в пределах этого вида.

Несмотря на высокий уровень сходства геномов в целом, организация боковых фибрилл (LTF) наших бактериофагов существенно отличается от фага T5. Вместо одного белка Ltf у фага T5 наши изоляты имеют два гена LtfA и LtfB, находящиеся в том же локусе генетической карты. Биоинформатический анализ и анализ ряда сконструированных нами мутантов свидетельствуют о том, что боковые фибриллы этих фагов имеют разветвленное строение: белок LtfB присоединяется к вирусной частице через белок LtfA, но при этом оба эти белка несут рецептор-узнающие домены. Оба белка сворачиваются с помощью автопротеолитически отщепляемых шаперонных C-концевых доменов, гомологичных шаперонным доменам, встречающимся у многих различных фаговых тримерных адгезинов, включая Ltf фага T5. Разветвленная структура фибриллярных адгезинов такого рода не была ранее описана у сифовирусов.

Нами показано, что белок LtfA фага DT57C узнает O-полисахарид типа O22, тогда как LtfA фага DT571/2 специфичен к ОПС типа O87. Белки LtfB у наших фагов практически идентичны и узнают ОПС типа O81. Структуры O-звеньев всех трех типов ОПС были нами установлены. Интересно, что при инфекции ОПС-продуцирующих клеток указанных типов нашими бактериофагами функция LTF оказывается критической, в то время как у фага T5 инфицирование клетки может происходить и при отсутствии LTF.

В то же время на штаммах хозяев, дефектных по синтезу ОПС, наличие боковых фибрилл не является существенным для инфекции. Это происходит из-за снятия неспецифического барьера, препятствующего прямому взаимодействию фага с его вторичным рецептором - белком внешней мембраны VtuB. Интересно, что LTF- независимая адсорбция эффективно происходит также на штаммах, лишенных O-ацетилирования звеньев ОПС, что свидетельствует о важной роли этой модификации для защитных свойств O-антигена.

Публикации

1. Golomidova A. K., Kulikov E. E., Prokhorov N. S., Guerrero-Ferreira Rcapital Es C., Knirel Y. A., Kostryukova E. S., Tarasyan K. K., Letarov A. V. Branched Lateral Tail Fiber Organization in T5-Like Bacteriophages DT57C and DT571/2 is Revealed by Genetic and Functional Analysis // *Viruses*. – 2016. – Т. 8, № 1.
2. Zdrovenko E. L., Golomidova A. K., Prokhorov N. S., Shashkov A. S., Wang L., Letarov A. V., Knirel Y. A. Structure of the O-polysaccharide of Escherichia coli O87 // *Carbohydr Res*. – 2015. – Т. 412. – С. 15-8.
3. Knirel Y. A., Prokhorov N. S., Shashkov A. S., Ovchinnikova O. G., Zdrovenko E. L., Liu B., Kostryukova E. S., Larin A. K., Golomidova A. K., Letarov A. V. Variations in O-antigen biosynthesis and O-acetylation associated with altered phage sensitivity in Escherichia coli 4s // *J Bacteriol*. – 2015. – Т. 197, № 5. – С. 905-12.
4. Golomidova A. K., Kulikov E. E., Prokhorov N. S., Guerrero-Ferreira R. C., Ksenzenko V. N., Tarasyan K. K., Letarov A. V. Complete genome sequences of T5-related Escherichia coli bacteriophages DT57C and DT571/2 isolated from horse feces // *Arch Virol*. – 2015. – Т. 160, № 12. – С. 3133-7.

ОТВЕТ НА ТЕПЛОВОЙ ШОК У ТЕРМОФИЛЬНЫХ ГРИБОВ: МЕМБРАННЫЕ ЛИПИДЫ И РАСТВОРИМЫЕ УГЛЕВОДЫ ЦИТОЗОЛЯ

Терёшина В.М.¹, Януцевич Е.В.¹, Данилова О.А.¹, Гроза Н.В.², Котлова Е.Р.³

¹ ИНМИ, ФИЦ Биотехнологии РАН

² Московский технологический университет

³ Ботанический институт им. В.Л. Комарова РАН

У мезофильных грибов ответ на тепловой шок (ТШ) является комплексным и включает синтез белков теплового шока, трегалозы, ферментов антиоксидантной защиты, изменения в составе липидов и состоянии внутриклеточной воды. Термофильные грибы способны оптимально расти в условиях, которые для мезофильных являются ТШ. Ответ термофильных грибов на ТШ не изучен и неясно, свойствен ли им феномен «приобретенной термоустойчивости».

Целью настоящего исследования было изучение состава мембранных липидов и углеводов цитозоля у термофильных грибов, *Miceliophthora thermophila*, *Rhizomucor miehei* и *Rhizomucor tauricus*. в оптимальных условиях и под действием теплового шока

Установлено, что в оптимальных температурных условиях на всех стадиях роста грибов в мицелии содержится значительное количество трегалозы (8-18% от сухой массы). Кроме того, в составе мембранных липидов фосфатидные кислоты являются одним из основных компонентов наряду с фосфатидилхолинами, фосфатидилэтаноламинами и стеринами.

В ответе термофильных грибов на ТШ наблюдается общая закономерность - действие ТШ в течение одного и трех часов приводит к последовательному снижению количества трегалозы в мицелии. Тогда как в мембранных липидах наблюдается увеличение доли фосфатидных кислот и стерина на фоне снижения фосфатидилхолинов и фосфатидилэтаноламинов. Кроме того, под действием ТШ в основных мембранных фосфолипидах не отмечено накопления насыщенных жирных кислот, напротив, степень ненасыщенности возрастает. Изучение «приобретенной термоустойчивости» в ответ на действие ТШ показало ее отсутствие у изучаемых термофильных грибов, что, возможно, объясняется значительным снижением трегалозы в условиях ТШ.

Таким образом, настоящее исследование показало, что ответ термофильных грибов на ТШ принципиально отличается от такового у мезофильных грибов.

Публикации

1. Yanutsevich E. A., Memorskaya A. S., Groza N. V., Kochkina G. A., Tereshina V. M. Heat Shock Response in the Thermophilic Fungus *Rhizomucor miehei* // *Microbiology (Moscow)*. 2014. Vol. 83, No. 5. P. 498–504. Doi: 10.1134/S0026261714050282
2. Yanutsevich E. A., Danilova O.A., Groza N. V., Kotlova E. R., Tereshina V. M. Heat shock response of thermophilic fungi: membrane lipids and soluble carbohydrates under elevated temperatures // *Microbiology (SGM)*. Published Ahead of Print 15.03.2016, doi: 10.1099/mic.0.000279

Работа поддержана грантом РФФИ № 12-04-00732

ИССЛЕДОВАНИЕ МЕХАНИЗМА ОКИСЛЕНИЯ АРСЕНОПИРИТА АЦИДОФИЛЬНЫМИ ХЕМОЛИТОТРОФНЫМИ МИКРООРГАНИЗМАМИ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ТЕРМОДИНАМИЧЕСКОГО И РЕНТГЕНОГРАФИЧЕСКОГО МЕТОДОВ

Фомченко Н.В., Муравьев М.И.

ИНМИ, ФИЦ Биотехнологии РАН

Исследован механизм бактериально-химического окисления арсенопирита. Показана термодинамическая неустойчивость арсенопиритного концентрата в процессе его глубокого биоокисления. Биоокисление этого сульфида проходит через стадию образования элементарной серы. Впервые показано, что кристаллическая структура элементарной серы, полученной в процессе биоокисления арсенопирита, а также, для сравнения, сфалерита и элементарной серы ромбической модификации, отличалась от всех известных ее разновидностей. Микроорганизмы перед окислением серы меняют ее кристаллическую структуру, которая не зависит от окисляемого минерала. Полученный продукт биоокисления определен как элементарная сера весьма редкой разновидности, воспроизводящей бета-модификацию селена. Рентгенограмма продуктов биоокисления поверхности арсенопирита позволяет сделать вывод о том, что окисление его поверхности протекает наиболее интенсивно при использовании в качестве окислителя ионов Fe^{3+} , полученных микробным окислением двухвалентного железа, чем раствора Fe^{3+} , полученного при растворении реагента $Fe_2(SO_4)_3 \cdot 9H_2O$. При окислении сульфидных минералов сначала происходит разрыв связей в поверхностных структурах их кристаллической решетки при действии трехвалентного железа или, в случае его отсутствия, других окислителей. Нарушение поверхностной структуры сульфидов облегчает переход в раствор двухвалентного железа и трехвалентного мышьяка (в случае окисления арсенопирита). При этом образуются продукты, являющиеся субстратом для микробов (элементарная сера, двухвалентное железо), и запускается процесс окисления сульфидов с биорегенерацией окислителя – сульфата трехвалентного железа.

Публикация:

1. Fomchenko, N.V., Muravyov M.I. Thermodynamic and XRD analysis of arsenopyrite biooxidation and enhancement of oxidation efficiency of gold-bearing concentrates // *International Journal of Mineral Processing*. 2014. V. 133. P. 112–118.

РАЗРАБОТКА ОСНОВ БИОТЕХНОЛОГИИ ПЕРЕРАБОТКИ КОММУНАЛЬНЫХ ОТХОДОВ ПУТЕМ МЕТАНОГЕННОГО СБРАЖИВАНИЯ ОРГАНИЧЕСКОЙ ФРАКЦИИ ТБО СОВМЕСТНО С ОСВ

Литти Ю.В.¹, Никитина А.А.¹, Бочкова Е.А.¹, Ковалев Д.А.², Зубов М.Г.³, Ножевникова А.Н.¹

¹ ИНИИ, ФИЦ Биотехнологии РАН

² ФГБНУ ВИЭСХ

³ ЗАО «Компания «ЭКОС»

Основным способом утилизации твердых бытовых отходов (ТБО) и осадков сточных вод (ОСВ) в России является захоронение на полигонах ТБО. Для снижения антропогенной нагрузки на окружающую среду перспективным является переработка ОСВ совместно с органической биоразлагаемой фракцией ТБО (ОФ-ТБО) на очистных сооружениях в анаэробных биореакторах. Для практического внедрения этой технологии актуальными являются исследования, направленные на обеспечение стабильности и повышение эффективности процесса анаэробного сбраживания, и использование недавно открытого процесса анаммокс для удаления азотных загрязнений из жидкой фракции эффлюента перед ее возвратом на очистные сооружения. Анаэробная обработка ОСВ показала, что при влажности ОСВ менее 90% значительно снижается эффективность и стабильность метаногенеза. При использовании катионного полиакриламидного флокулянта Праестол 650 для сгущения ОСВ наблюдалось снижение скорости образования метана. Показано, что основной проблемой на первом этапе анаэробного сбраживания являлось закисление сбраживаемой смеси ОСВ и ОФ-ТБО за счет избыточного образования летучих жирных кислот. Для обеспечения стабильной работы биореактора в термофильном режиме количество активного инокулята при пуске должно составлять не менее 30-50%, в расчете на суммарное органическое вещество. При соотношении ОСВ к ОФ-ТБО, равном 4:1 по весу, производительность биогазовой установки объемом 50 л увеличивалась до 2,5 раз, а теплотворная способность биогаза - до 10%, по сравнению со сбраживанием ОСВ без внесения ОФ-ТБО. Разрабатываемая технология включает очистку жидкой фракции сброженного осадка от азота с использованием процесса анаммокс. В результате длительного культивирования анаммокс-бактерий в проточном реакторе на минеральной среде достигнута высокая скорость удаления азота ($6,5 \text{ г N/л}^{-1} \text{ сут}^{-1}$). Анаммокс-бактерии в биореакторе образуют сферические и плоские биопленки. В составе биопленок, помимо кокковидных анаммокс-бактерий, присутствуют микроорганизмы, относящиеся к разным таксономическим группам, в частности, структурообразующие нитчатые бактерии, относительно близкие к филуму Chloroflexi. В настоящее время идет работа по адаптации накопленной биомассы анаммокс-бактерий для очистки жидкой фракции сброженной массы от азота.

Публикации

1. Botchkova E.A., Litt Y.V., Kuznetsov B.B., Nozhevnikova A.N. Microbial Biofilms Formed in a Laboratory-Scale Anammox Bioreactor with Flexible Brush Carrier. *Journal of Biomaterials and Nanobiotechnology*, 2014, 5, 76-82.
2. Nikitina A.A., Kallistova A.Y., Nekrasova V.K., Litt Y.V., Nozhevnikova A.N., Kevbrina M.V. Intensification of Microbial Decomposition of Organic Fraction of Municipal Waste: Laboratory and Field Experiments. *Appl. Biochem. Microbiol*, 2015, Vol.51, N4, pp. 393-401.
3. Botchkova E.A., Plakunov V.K., Nozhevnikova A.N. Dynamics of biofilm formation on microscopic slides submerged in an anammox bioreactor. *Microbiology*, Vol. 84, No. 3, 2015, p. 456-460.
4. Литти Ю.В., Ковалев Д.А., Ковалев А.А., Никитина А.А., Ермошин А.А., Ножевникова А.Н. Анаэробная обработка высокоуплотненных осадков сточных вод в термофильных условиях. *Voda Magazine*, 2015, т 6 (94), с. 34-38.

СУКЦЕССИОННЫЕ ПРОЦЕССЫ В СООБЩЕСТВЕ АНОКСИГЕННЫХ ФОТОТРОФНЫХ БАКТЕРИЙ ОЗЕРА КИСЛО-СЛАДКОЕ (КАНДАЛАКШСКИЙ ЗАЛИВ БЕЛОГО МОРЯ)

Лунина О.Н.*, Саввичев А.С.*, Краснова Е.Д.***, Кокрятская Н.М.***, Веслополова Е.Ф.*, Кузнецов Б.Б.****, Горленко В.М.*

* ИНМИ, ФИЦ Биотехнологии РАН

** Беломорская биологическая станция им. Н.А. Перцова Биологического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова,

*** Федеральный исследовательский центр Комплексного изучения Арктики РАН, г. Архангельск,

**** ИНБ, ФИЦ Биотехнологии РАН

В марте-апреле 2012 г., марте-апреле 2013 г. и в сентябре 2013 г. проведены исследования сообщества аноксигенных фототрофных бактерий (АФБ) водной толщи оз. Кисло-Сладкое, недавно отделившегося от моря (Кандалакшский залив Белого моря). Оказалось, что озеро, ранее считавшееся меромиктическим, перемешивается и сильно подвержено влиянию моря. На сезонную цикличность сукцессионных процессов в некоторые зимние периоды накладываются промывки водоема свежей морской водой, что совокупно определяет сукцессию микробного сообщества. Показано, что в сообществе АФБ последствия осеннего перемешивания 2011 года продолжали наблюдаться вплоть до осени 2013 г. В хемоклине обычно преобладали зеленоокрашенные зеленые серные бактерии (ЗСБ), а также в небольшом количестве присутствовали коричневоокрашенные ЗСБ. Зимой 2013 г. в силу стагнации подледная вода оказалась мутной, что явилось причиной как доминирования коричневых форм ЗСБ, так и изменения соотношения видов пурпурных серобактерий в анаэробной толще. По морфологии и пигментному составу выделенные штаммы зеленых серобактерий были аналогичны штаммам, ранее выделенным из этого озера (осень 2010 г., зеленоокрашенные *ChlvPS10*, *PrPS10* и коричневоокрашенные *PhvPS10*) (Лунина и соавт., 2014). Помимо ранее известных штаммов, из воды озера в 2012 г. были выделены окенонсодержащие пурпурные серобактерии штамм *TsakPS12*, имеющие по 98% сходства с типовыми штаммами *Thiocapsa pendens* st. DSM 236, *Thiocapsa bogorovii* st. VBS, а также со штаммами *AmPS10* и *TcyrPS10*, выделенными из оз. Кисло-Сладкое в 2010 г. Продукция аноксигенного фотосинтеза в оз. Кисло-Сладкое в сентябре составляла не менее $240 \text{ мг С м}^{-2} \text{ сут}^{-1}$, в марте-апреле – $0\text{--}20 \text{ мг С м}^{-2} \text{ сут}^{-1}$, что соответствовало 40% и 69% от оксигенного фотосинтеза в озере.

Публикации

1. О. Н. Лунина, А. С. Саввичев, Б. Б. Кузнецов, Н. В. Пименов, В. М. Горленко Аноксигенные фототрофные бактерии стратифицированного озера Кисло-Сладкое, (Кандалакшский залив Белого моря) // Микробиология 2014. Т. 83. №1. С. 90–108. O. N. Lunina, A. S. Savvichev, B. B. Kuznetsov, N. V. Pimenov, V. M. Gorlenko Anoxygenic phototrophic bacteria of the Kislo-Sladkoe stratified lake (White Sea, Kandalaksha Bay) *Microbiology*, November 2013, V. 82, N. 6, pp. 815–832.
2. Саввичев А.С., Лунина О.Н., Русанов И.И., Захарова Е.Е., Веслополова Е.Ф., Иванов М.В. Микробиологические и изотопно-геохимические исследования озера Кисло-Сладкое – меромиктического водоема в Кандалакшском заливе Белого моря // *Микробиология*. 2014. Т. 83. № 2. С. 191–203.

НОВЫЙ ПСИХРОАКТИВНЫЙ МЕТАНОГЕННЫЙ АРХЕОН *METHANOSPIRILLUM STAMSII* SP. NOV., ВЫДЕЛЕННЫЙ ИЗ НИЗКОТЕМПЕРАТУРНОГО АНАЭРОБНОГО РЕАКТОРА

Паршина С.Н.¹, Ермакова А.В.¹, Бомберг М.², Деткова Е.Н.¹

¹ ИНМИ, ФИЦ Биотехнологии РАН,

² VTT Technical Research Centre of Finland, Espoo, Finland

В последние годы растет интерес к микробным сообществам и микроорганизмам, развивающимся при пониженных температурах. Выделение чистых культур психроактивных микроорганизмов необходимо для исследования микробного разнообразия и взаимосвязей микроорганизмов в микробных сообществах, а также важно для развития энергосберегающих технологий анаэробной обработки органических отходов. В нашей лаборатории было выделено несколько анаэробных психроактивных бактерий и архей из природных и антропогенных мест обитания. Ключевыми интермедиатами при анаэробном разложении органических веществ являются ЛЖК - ацетат, пропионат и бутират. Их деградация происходит при синтрофном взаимодействии ацетогенных синтрофных бактерий и водородиспользующих метаногенных архей. Из гранулированной биомассы лабораторного биореактора, работавшего при 3-8°C на смеси ацетата, пропионата и бутирата, были получены психроактивные пропионат- и бутиратокисляющие синтрофные консорциумы. После многочисленных пересевов на H₂/CO₂ в качестве субстрата в присутствии антибиотиков, получения отдельных колоний на агаризованной среде и новых серий разведений с H₂/CO₂ был выделен в чистую культуру водородиспользующий метаноген *Methanospirillum stamsii* штамм Pt1. Организм был строгим анаэробом, представлен искривленными палочками (0.4-0.5 x 7.5-25 мкм), иногда образовывал длинные нити до нескольких сотен мкм. Клетки - подвижные благодаря наличию жгутиков, растущих пучками. Организм рос на H₂/CO₂ при температуре от 5 до 37°C, с оптимумом при 20-30°C. Анализ гена 16S рРНК показал принадлежность штамма к роду *Methanospirillum*, 97.5% сходства сиквенса с *Methanospirillum hungatei* JF1^T. ДНК-ДНК гибридизация штамма Pt1 с *Methanospirillum hungatei* JF1^T показала гомологию 39%. На основании фенотипических и филогенетических исследований штамм был отнесен к новому виду рода *Methanospirillum*, для него было предложено имя *Methanospirillum stamsii* sp. nov. Типовой штамм Pt1^T (=DSM 26304^T =VKM B-2808^T). Работа по выделению психроактивных анаэробных микроорганизмов продолжается.

Публикация

1. *Methanospirillum stamsii* sp. nov., a psychrotolerant hydrogenotrophic methanogenic archaeon isolated from an anaerobic expanded granular sludge bed bioreactor operated at low temperature. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2014, 64, 180-186

РАСПОЗНАВАНИЕ КЛЕТОЧНОЙ ПОВЕРХНОСТИ N4-ПОДОБНЫМИ ВИРУСАМИ

Прохоров Н.С.¹, Риччио К.², Назаров С.², Здорovenко Э.Л.³, Гуэрро-Феррейра Р.², Шнейдер М.М.^{2,4}, Голомидова А.К.¹, Татарский Е.В.¹, Гурко Е.В.¹, Книрель Ю.А.³, Лейман П.Г.², Летаров А.В.¹

¹ ИИМИ, ФИЦ Биотехнологии РАН

² *École polytechnique fédérale de Lausanne, Switzerland*

³ Институт органической химии им. Н.Д. Зелинского РАН

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

Вирусы бактерий - бактериофаги - сыграли исключительную роль в развитии молекулярной биологии, молекулярной генетики и структурной биологии в качестве удобного и благодарного объекта исследований. Сейчас, когда появились первые адекватные оценки численности и генетического разнообразия бактериофагов, они стали всерьез рассматриваться в качестве потенциального средства борьбы с патогенными бактериями с множественной лекарственной устойчивостью. Однако, рациональное применение вирусов в качестве антибактериальных средств, может быть основано только на глубоком понимании механизмов взаимодействия вирусов и их хозяев, определяющих специфический характер инфекции, в первую очередь механизмов распознавания клеточной поверхности чувствительных штаммов. Вопросы о том, как именно бактериофаги находят и связывают чувствительные клетки, и каким образом происходит принятие решения о введении вирусного генома в клетку, остаются одними из самых загадочных аспектов биологии бактериофагов.

Используя комбинацию биоинформатических, биохимических, биоинженерных подходов и структурного анализа мы изучили молекулярные механизмы распознавания клеток чувствительного штамма *E. coli* 4s (O22) близкородственными N4-подобными бактериофагами G7C и Alt63 - представителями наименее изученного семейства хвостатых фагов Podoviridae. Анализ геномов этих вирусов позволил сформулировать гипотезы об устройстве их адсорбционных аппаратов. Генетический анализ устойчивых к фаговой инфекции мутантов 4s позволил показать вовлечённость липополисахаридов в процесс инфекции в качестве первичных рецепторов проникновения вирусов. Биохимические тесты с применением рекомбинантных белков-компонентов адсорбционного аппарата и последующий ЯМР-анализ продуктов взаимодействия выявили два альтернативных механизма модификации молекул липополисахарида, необходимой для успешной инфекции этими фагами, - негидролитическое расщепление и деацетилирование липополисахарида. Второй механизм представляется единственной альтернативой деполимеризации липополисахаридов при инфекции подовирусами, описанной до сих пор. Структура вириона и адсорбционного аппарата G7C была установлена методом криоэлектронной реконструкции. Все компоненты адсорбционных аппаратов G7C и Alt63 кристаллизованы, структуры белков определены методом рентгеноструктурного анализа. Установлена связь между полученными структурами и ферментативными функциями компонентов адсорбционных аппаратов.

Биоинформатический анализ геномных последовательностей бактериофагов и опубликованных структур компонентов фаговых адсорбционных аппаратов позволил выявить консервативные элементы G7C-подобного типа адсорбционных аппаратов не только у очевидно родственных подовирусов, но и таких отдаленных представителей хвостатых фагов, как крупные миовирусы Vi1, CVA120 и даже бактериофаг T4.

Публикации

1. Knirel Y. A.*, Prokhorov N. S.*, Shashkov A. S., Ovchinnikova O. G., Zdorovenko E. L., Liu B., Kostyukova E. S., Larin A. K., Golomidova A. K., Letarov A. V. Variations in O-antigen biosynthesis and O-acetylation associated with altered phage sensitivity in *Escherichia coli* 4s. *J Bacteriol.* – 2015. – Т. 197, № 5. – С. 905-12.
2. Taylor N.M.I., Prokhorov N.S., Guerrero-Ferreira R., Shneider M.M., Browning C., Goldie K.N., Stahlberg H., Leiman P.G. Structure of the T4 baseplate and its function in triggering sheath contraction. *Nature* - v. 533, 346–352 (19 May 2016) doi:10.1038/nature17971.

РАЗРАБОТКА ТЕХНОЛОГИЙ ПОЛУЧЕНИЯ ВЫСОКОПРОДУКТИВНЫХ ЛИНИЙ КЛЕТОК МЛЕКОПИТАЮЩИХ, СЕКРЕТИРУЮЩИХ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИ ЗНАЧИМЫЕ БЕЛКИ

Воробьев И.И., Орлова Н.А., Ковнир С.В., Ходак Ю.А.

ИНБ, ФИЦ Биотехнологии РАН

Увеличение удельной продуктивности культивируемых клеток млекопитающих, секретирующих фармацевтически значимые белки при сохранении постоянства уровня секреции в течение 50-100 клеточных генераций, является основным способом повышения экономической эффективности современного биофармацевтического производства. Традиционные методы получения клональных клеточных продуцентов биотехнологически значимых белков основаны на использовании векторов с промотором цитомегаловируса и на анализе десятков тысяч клонов для выбора клона-продуцента с оптимальным уровнем секреции. Такой подход сопряжен с большими затратами ресурсов и в случае создания продуцентов для регионального рынка приводит к отбору низкопродуктивных клонов и последующей организации производства с неочевидной конкурентоспособностью.

Ранее нами было разработано семейство векторов p1.1 с присутствием в векторной плазмиде протяженных областей ДНК, фланкирующих ген фактора элонгации трансляции 1 α (EEF1A, ген домашнего хозяйства Кл китайского хомячка) и конкатемер терминального повтора вируса Эпштейна-Барра. Было установлено, что сочетание этих 2-х генетических элементов позволяет в десятки раз увеличить частоту интеграции целевых плазмид в геном клеток-продуцентов и быстро амплифицировать целевые гены в геноме продуцентов до максимальной метаболически возможной продуктивности. Вследствие этого для получения промышленных продуцентов фармацевтически значимых белков достаточно было провести первичный скрининг 2-3-х тысяч клонов и подробно исследовать 24 клона.

На примере фолликулостимулирующего гормона человека нами был получен клональный продуцент гетеродимерного белка с удельной продуктивностью более 10 пг/клетка/день и решена задача балансировки относительного уровня экспрессии генов цепей двухцепочечного гликопротеина при помощи ко-экспрессии генов цепей в составе одного цистрона с внутренним сайтом связывания рибосом вируса энцефаломиокардита дикого типа. Ранее в литературе не описывались продуценты фолликулостимулирующего гормона с такими уровнями удельной продуктивности. Созданный нами продуцент позволил проводить промышленный процесс получения рекомбинантного ФСГ при помощи стандартного настольного оборудования для культивации клеток млекопитающих и жидкостной хроматографии.

Публикации

1. Orlova NA, Kovnir SV, Hodak JA, Vorobiev II, Gabibov AG, Skryabin KG. Improved elongation factor-1 α -based vectors for stable high-level expression of heterologous proteins in Chinese hamster ovary cells//*BMC Biotechnology*, 2014 14;14:56
2. Воробьев И.И., Орлова Н.А., Ковнир С.В., Ходак Ю.А., плазида для экспрессии в клетках сно рекомбинантного фолликулостимулирующего гормона (ФСГ) человека, плазида для экспрессии в клетках сно бета-субъединицы рекомбинантного ФСГ человека, клетка СНО - продуцент рекомбинантного ФСГ человека и способ получения указанного гормона, *Патент 2 560 596*, опубл. 20.08.2015 Бюл. № 23
3. Орлова Н. А., Воробьев И. И., Ходак Ю. А., Дронина М. А., Смирнов И. В., Пономаренко Н. А., Скрябин К. Г., Габибов А. Г. Плазида для экспрессии рекомбинантного фактора свёртываемости крови ix человека, моноклональная линия клеток млекопитающего - продуцент рекомбинантного фактора свёртываемости крови ix человека и способ получения указанного фактора, *Заявка РФ*, 2014103168, от 31.01.2014, принято решение о выдаче патента.

ИССЛЕДОВАНИЕ ТОКСИЧНОСТИ И ГЕМОСОВМЕСТИМОСТИ ХИТОЗАНА И ЕГО ПРОИЗВОДНЫХ

Зубарева А.А.^{1,2}, Щербинина Т.С.^{1,2}, Свирщевская Е.В.², Варламов В.П.¹

¹ ИНБ, ФИЦ Биотехнологии РАН

² Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН

Хитозан - дезацетилированное производное природного полисахарида хитина является перспективным для использования в биомедицинской области благодаря низкой токсичности, биосовместимости, а также наличию реакционноспособных групп, посредством которых возможно получение полимеров с различными физико-химическими характеристиками. Несмотря на большое число научных исследований в области применения хитозана и его производных в биомедицине, использование его на практике ограничено лишь ранозаживляющими покрытиями и биологически активными добавками к пище. Это связано, прежде всего, с проблемами стандартизации полисахарида, а также с недостаточным пониманием поведения хитозана *in vitro* и *in vivo*. Целью работы являлись получение и характеристика производных хитозана с различными физико-химическими свойствами и анализ их цитотоксичности и гемосовместимости.

В результате работы было показано, что хитозан и его положительно заряженные производные, за исключением кватернизированных с высокой степенью замещения, оказывали слабый (<20% при 100 мкг/мл) цитотоксический эффект независимо от молекулярной массы, степени дезацетилирования и наличия гидрофобных заместителей. В то время как введение более ≥ 60 % четвертичных аммониевых групп в молекулу полимера значительно увеличивало цитотоксический эффект, обусловленный как влиянием на клеточный цикл, так и индукцией апоптоза. Все положительно заряженные полимеры активировали агрегацию тромбоцитов, но не влияли на скорость свертывания крови. Отрицательно заряженные сукцинильные производные не обладали токсичностью, не активировали агрегацию тромбоцитов и не индуцировали апоптоз клеток. Таким образом, более предпочтительными для внутривенного введения являются отрицательно-заряженные производные хитозана. Механизм цитотоксического действия хитозана и его положительно заряженных производных в настоящее время остается невыясненным. Вероятно, он связан как с влиянием на электрическую емкость отрицательно заряженной мембраны клеток, так и с путем внутриклеточного транспорта. Так, нами недавно показано различие в транспорте положительно и отрицательно заряженных производных хитозана и наночастиц на их основе, где установлено явление внутриклеточной сортировки отрицательно заряженных производных в лизосомы, а положительно заряженных – в митохондрии.

Публикации

1. Zubareva A.A., Shcherbinina T.S., Varlamov V.P., Svirshchevskaya E.V. Biodistribution of doxorubicin loaded succinoyl chitosan nanoparticles in mice injected via intravenous or intranasal routes // *Progress on Chemistry and Application of Chitin and Its Derivatives*, Volume XIX, 2014, p.145-154, DOI:10.15259/PCACD.19.18.
2. Zubareva A.A., Shcherbinina T. S., Varlamov V. P. , Svirshchevskaya E. V. Intracellular Sorting of Differently Charged Chitosan Derivatives and Chitosan-Based Nanoparticles // *Nanoscale*. 2015, 7, 7942 - 7952.,DOI 10.1039/C5NR00327J.
3. Зубарева А.А., Зубков Д. А., Рязанцев Д. Ю., Димитриева Т. В. Разработка противовирусных вакцин на основе лентивирусов, капсулированных в хитозан // *Российский иммунологический журнал* 2015, том 9 (18), №2-3, С. 738-739, № 2(1).
4. Щербинина Т.С., Зубарева А.А., Варламов В.П., Свирщевская Е.В. Эффект включения производных хитозана на иммуногенные свойства белковых наночастиц // *Российский иммунологический журнал* 2015, том 9 (18), №2-3, С. 516-518, № 2(1).
5. A.V. Il'ina, D.V. Kurek, Zubareva A.A., M.M. Il'in Jr., N.M. Mestechkina, V.P. Varlamov Preparation and characterization of biopolymer nanoparticles based on lactoferrin-polysaccharide complex // *Reactive and Functional Polymers*, 2016, V.102, P.33-DOI:10.1016/j.reactfunctpolym.2016.03.003.

Приняты в печать:

1. А. А. Зубарева, В. Тс. Шагдарова, В. Р. Варламов, Е. В. Свирщевская Cell binding and penetration of quaternized chitosan derivatives // *Progress on Chemistry and Application of Chitin and Its Derivatives*, Volume XXI, 2016
2. А.А. Зубарева, А.А. Бойко, И.В. Холоденко, Ф.Н. Розов, М.В. Ларина, Т.К. Алиев, И.И. Доронин, П.А. Вишнякова, И.М. Молотковская, Р.В. Холоденко Хитозановые наночастицы, направленные на опухолеассоциированный ганглиозид GD2, *Биоорганическая химия*, 2016.
3. А.А. Зубарева, Е.В. Свирщевская Механизмы взаимодействия хитозана и его производных с клеткой (обзор) // *Прикладная биохимия и микробиология*, 2016
4. Е.В. Свирщевская, А.А. Зубарева, А.А. Бойко, О.А. Шустова, М.В. Гречихина, Б.Ц. Шагдарова, В.П. Варламов. Анализ токсичности и биосовместимости производных хитозана с различными физико-химическими свойствами // *Прикладная биохимия и микробиология*, 2016.

РАЗРАБОТКА БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ МЕТОДОВ ПОЛУЧЕНИЯ ВЫСОКО АКТИВНЫХ ФТОРИРОВАННЫХ КОРТИКОСТЕРОИДОВ И ИММУНОДЕПРЕССАНТОВ

Джавахи В.В., Андрияшина В.А.

ИНБ, ФИЦ Биотехнологии РАН

В ходе работ по синтезу фторированных кортикостероидов из фитостерина получены следующие результаты:

1. Разработан способ получения 1,4,9(11),16(17)-тетраена - ключевого полупродукта синтеза высокоактивных противовоспалительных и антиаллергических препаратов - фторированных стероидов из стероидов. Способ отличается оригинальной последовательностью реакций и использованием высокоэффективных биокатализаторов на стадиях получения 9 α -гидрокси-АД из фитостерина и микробиологического дегидрирования. Разработаны биотехнологические методы 9 α -гидроксилирования и 1,2-дегидрирования для получения фармакологически-значимых стероидов с использованием в биотрансформации вновь созданных биокатализаторов на основе оригинальных актинобактерий *Rhodococcus erythropolis* Ac-1740 и *Pimelobacter simplex* ВКПМ Ac-1632, включенных в гранулы операционно-стабильного макропористого криогеля поливинилового спирта. Использование в процессах биокатализаторов и плотной биомассы позволило поднять нагрузку стероидных субстратов до 50 г/л.

В 2014 г. получен патент РФ №2524434 - «Иммобилизованный биокатализатор для микробной биотрансформации стероидных соединений». За разработку «Биокатализатор для трансформации стероидных соединений» Международным Жюри XVIII Московского Международного Салона изобретений и инновационных технологий «Архимед» Институту биоинженерии присуждена Золотая Медаль. Работы по иммобилизации проводятся совместно с ИНЭОС РАН (проф. Лозинский В.И.)

2. Оформлена методика получения тетраена из 9 α -гидрокси-АД. Выход 1,4,9(11),16(17) - тетраена – ключевого полупродукта синтеза фторированных стероидов из стероидов составил 60% от теоретического. Благодаря 4-м двойным связям, тетраен представляет собой структуру, которая может быть легко функционализирована по положениям стероидной молекулы, отвечающим за противовоспалительную, антиаллергическую, противошоковую и др. уникальные виды активностей стероидных структур. Способ может быть использован в синтезе дексаметазона, бетаметазона, триамцинолона и других востребованных в медицине фторированных кортикоидов.

В ходе разработки высокоактивных штаммов *Streptomyces hygroscopicus* -продуцентов фармацевтической субстанции рапамицина получены следующие результаты:

С использованием метода ненаправленного индуцированного многоступенчатого мутагенеза с применением УФ облучения в качестве мутагенного фактора и последующей селекции получен штамм *St. hygroscopicus* R 33-41, способный синтезировать 655 \pm 5 мг рапамицина в 1л культуральной жидкости, что составляет 201.5% от продуцирующей способности исходного штамма *St. hygroscopicus* R 13-29. Вновь полученный штамм *St. hygroscopicus* R 33-41 обладает повышенной устойчивостью к антибиотикам (амфотерицину, циклогексимиду, рапамицину) и способностью утилизировать такие источники углерода, как глюкоза и глицерин, в более высоких концентрациях относительно исходного штамма.

1. Подобран оптимальный состав питательной среды и условия культивирования для штамма *St. hygroscopicus* R 33-41. Конечный выход рапамицина составил 937 \pm 3 мг/л, превысив показатели продуктивности аналогичных штаммов более, чем в 1.5 раза.

2. Отработана методика культивирования штамма *St. hygroscopicus* R 33-41 в лабораторных колбах.

В ближайшей перспективе - разработка технологии культивирования штамма в ферментационных установках, а также – разработка технологии выделения и очистки рапамицина для получения химических производных.

Публикации

1. Андрияшина В.А., Карпова Н.В., Дружинина А.В., Стыщенко Т.С., Подорожко Е.А., Рябев А.Н., Лозинский В.И. «Новый иммобилизованный биокатализатор для микробиологического синтеза фармацевтических стероидов», *Прикладная биохимия и микробиология*, Т51, № 5, С 1-10, 2015.
2. Андрияшина В.А., Рябев А.Н., Дружинина А.В., Подорожко Е.А., Карпова Н.В., Стыщенко Т.С., Ядерец В.В., Лозинский В.И., «Иммобилизованный биокатализатор для микробной биотрансформации стероидных соединений», *Патент РФ №2524434* (Бюллет. изобрет. от 27.07.2014).
3. Dzhavakhiya V.V., Voinova T.M., Glagoleva E.V., Petukhov D.V., Ovchinnikov A.I., Kartashov M.I., Kuznetsov V.B., Skryabin K.G., 2015. Strain improvement of *Streptomyces xanthochromogenes* RIA 1098 for Enhanced Pravastatin Production at High Compactin Concentrations. *Indian Journal of Microbiology*, 55(4): 440–446.
4. Савельева В.В., 2015. Создание высокоактивного штамма *St. hygroscopicus*, продуцента фармацевтической субстанции рапамицина, методом индуцированного ненаправленного мутагенеза. *Russian Agricultural Science Review*, 6(6-2): 18-19.

ЦЕФАЛОСПОРИНЫ: ОСОБЕННОСТИ РЕГУЛЯЦИИ БИОСИНТЕЗА В *ACREMONIUM CHRYSOGENUM* И НОВЫЕ ПОДХОДЫ К ПОЛУЧЕНИЮ БИОКАТАЛИЗАТОРОВ ДЛЯ СИНТЕЗА АНТИБИОТИКОВ

Жгун А.А.¹, Думина М.В.¹, Новак М.И.¹, Домрачева А.Г.¹, Джавахия В.В.¹, Петухов Д.В.¹, Складенко А.В.², Яроцкий С.В.², Эльдаров М.А.¹

¹ ИНБ, ФИЦ Биотехнологии РАН

² ФГУП ГосНИИГенетика

Проведен сравнительный анализ влияния экзогенных спермидина (СПД) и диаминопропана (ДАП) на морфологические, физиологические, молекулярно-генетические и производственные характеристики штаммов *Acremonium chrysogenum*, резко различающихся по уровню продукции цефС. Показано, что добавление ДАП и СПД приводит к стимулированию роста штаммов *A. chrysogenum* на плотной питательной среде, изменению морфологии колоний, повышает устойчивость штаммов к осмотическому и оксидативному стрессам, резистентность к ингибиторам биосинтеза клеточной стенки. Культивирование высокопродуктивного штамма *A. chrysogenum* в присутствии СПД приводит к повышению продукции цефС на 10-15%. Установлено, что экзогенный СПД активирует экспрессию регуляторных генов биосинтеза цефС и ранних “cef”-генов.

Сравнительный анализ уровней транскрипции “cef”-генов в двух штаммах *A. chrysogenum* показал, что увеличение продукции цефС в высокопродуктивном штамме сопровождается резким увеличением уровней транскрипции «поздних» генов *cefEF*, *cefG*. Эти данные хорошо согласуются с данными вестерн-блот анализа содержания белков *CefEF* и *CefG* в клетках исследуемых штаммов и их динамикой в ходе культивирования.

С использованием методов высокопроизводительной протеомики установлены значительные отличия в составе протеомов двух штаммов, в том числе в представленности белков, связанных с метаболизмом аминокислот, энергетическим обменом, ответом на оксидативный стресс.

Для разработки процессов биокаталитического синтеза антибиотиков класса цефалоспоринов кислот клонирован ген фермента *CASA* из штамма-продуцента *E.coli* ВКПМ В-10182, создан эффективный рекомбинантный штамм *E.coli* – продуцент *CASA*, с помощью которого разработан высокоэффективный процесс биокаталитического синтеза цефазолина.

Оптимизированы методы экспрессии рекомбинантной глутарил-ацилазы *Brevundimonas diminuta* (BrdGLA) – одного из ферментов биотрансформации цефС в 7-АЦК – исходного соединения для получения полусинтетических цефалоспоринов. Методами компьютерного моделирования и сайт-направленного мутагенеза определены структурные основы субстратной специфичности и закономерности формирования четвертичной структуры BrdGLA, получены аналоги с повышенной стабильностью в щелочных условиях и при повышенной температуре.

Публикации

1. Жгун А.А., Калинин С.Г., Новак М.И., Домрачева А.Г., Петухов Д.В., Джавахия В.В., Эльдаров М.А., Бартошевич Ю.Э. Влияние полиаминов на биосинтез антибиотика цефалоспорина С в штаммах *Acremonium chrysogenum*. *Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология*, 2015, т. 14 вып. 3, 47-54
2. Эльдаров М.А., Складенко А.В., Думина М.В., Медведева Н.В., Жгун А.А., Сатарова Д.Э., Сидоренко А.И., Епремян А.С., Яроцкий С.В. Рекомбинантная синтетаза цефалоспоринов-кислот: оптимизация экспрессии в клетках *E.coli*, иммобилизация и использование для биокаталитического синтеза цефазолина. *Биомедицинская химия*, 2015, т 61, вып. 5, 646-651
3. Эльдаров М.А., Складенко А.В., Марданов А.В., Белецкий А.В., Жгун А.А., Думина М.В., Медведева Н.В., Сатарова Д.Э., Равин Н.В., Яроцкий С.В. Синтетаза цефалоспоринов-кислот штамма *E. coli* ВКПМ В10182: геномный контекст, идентификация гена, создание штамма-продуцента. *Прикладная биохимия и микробиология*, т. 51, вып. 5, 465-471.
4. Eldarov M.A. Recombinant enzymes for biotransformation of Cephalosporin antibiotics *J.Nanomedicine&Nanotechnology* 2014 V.5, N.5, p 193.
5. Dumina MV, Zhgun AA, Novak MI, Domratcheva AG, Petukhov DV, Dzhevakhia VV, Eldarov MA, Bartoshevitch IuE. Comparative gene expression profiling reveals key changes in expression levels of cephalosporin C biosynthesis and transport genes between low and high-producing strains of *Acremonium chrysogenum*. *World J Microbiol Biotechnol.* 2014 Nov;30(11):2933-41
6. Складенко А.В., Эльдаров М.А., Курочкина В.Б., Яроцкий С.В. Ферментативный синтез бета-лактамов-кислот (ОБЗОР). *Прикладная биохимия и микробиология*, 2015.-N 6.-С.546-560.
7. Mardanov A.V., Eldarov M.A., Beletsky A.V., Dumina M.V., Yarotsky S.V., Ravin N.V. Draft Genome Sequence of *Escherichia coli* Strain VKPM B-10182, Producing the Enzyme for Synthesis of Cephalosporin Acids. *Genome Announcements* 2014, 2(6):e01222-14.
8. Eldarov M., A. Lyashenko, T. Sherbakova, Supltadov D., Kopylov A., Svedas V. Probing the substrate specificity and intersubunit interactions of *Brevundimonas diminuta* glutaryl acylase with site-directed mutagenesis. *American Journal of Biochemistry and Biotechnology*. 2014. Vol. 10, no. 3. P. 169–179.
9. Заявка № 2015149927 от 20.11.2015 г. «Модифицированный ген рас бактерии *Escherichia coli*, кодирующий предшественник фермента с активностью пенициллин G ацилазы, рекомбинантный штамм *Escherichia coli*- продуцент пенициллин G ацилазы и способ микробиологического синтеза этого фермента». (Заявители – ФИЦ «Биотехнологии» РАН, ГИЦ РФ ФГУП «ГосНИИГенетика», авторы - Эльдаров М.А., Складенко А.В., Думина М.В., Сатарова Д.Э., Жгун А.А., Медведева Н.В., Яроцкий С.В.)
10. Заявка № 2015149925 от 20.11.2015 «Рекомбинантный штамм бактерий *Escherichia coli* – продуцент фермента с активностью синтетазы цефалоспоринов-кислот из штамма бактерий *Escherichia coli* ВКПМ В-10182 и способ микробиологического синтеза этого фермента». (Заявители – ФИЦ «Биотехнологии» РАН, ГИЦ РФ ФГУП «ГосНИИГенетика», авторы - Эльдаров М.А., Складенко А.В., Думина М.В., Сатарова Д.Э., Жгун А.А., Медведева Н.В., Яроцкий С.В.)

РАЗРАБОТКА МАТЕМАТИЧЕСКИХ ПОДХОДОВ ДЛЯ АННОТАЦИИ БАКТЕРИАЛЬНЫХ ГЕНОВ И ДЛЯ ПОИСКА МНОЖЕСТВЕННОГО ВЫРАВНИВАНИЯ АМИНОКИСЛОТНЫХ И НУКЛЕОТИДНЫХ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

Коротков Е.В., Френкель Ф.Е., Суворова Ю.М., Пугачева В.М., Голышев М.А.

ИНБ, ФИЦ Биотехнологии РАН

В 2015 году исследования в научной группе проводились по двум направлениям.

1. Разработка математического подхода для аннотации бактериальных генов.

За последние годы было секвенировано большое число бактериальных геномов. Поэтому одной из важнейших задач компьютерной геномики является функциональная аннотация нуклеотидных последовательностей, в том числе нуклеотидных последовательностей генов. Существующие математические методы функциональной аннотации могут достоверно предсказать возможную функцию гена только при достаточной гомологии между последовательностями. Вследствие этого существенная доля всех секвенированных генов из бактериальных геномов остаётся неаннотированной. В 2015 году была закончена разработка метода предсказания возможной биологической функции гена и его функциональной группы на основе филогенетических профилей. Филогенетический профиль гена создавался путём поиска подобий для нуклеотидной последовательности гена в 1204 референтных геномах и последующей проверки статистической значимости найденного подобия. Профили генов с известными функциями использовались для предсказания возможных функций новых генов, а также их функциональных групп. Мы провели аннотацию генов из 104 бактериальных геномов и можем предсказать возможные функции для 19% генов, для которых нет ранее предсказанной функции без понижения статистической значимости. Также для 7% генов предсказанные нами функции отличались от установленных ранее другими методами. Разработанная система может быть использована как дополняющая к существующим системам аннотации, а также для создания функциональных групп генов. Система представлена на сайте <http://genefunction.ru>

2. Разработка математического подхода для множественного выравнивания аминокислотных и нуклеотидных последовательностей.

В 2015 году разработан метод поиска множественного выравнивания аминокислотных и нуклеотидных последовательностей (NP-полная задача) без использования парного сравнения последовательностей и без использования идентичных k-слов или “зародышей”. Множественное выравнивание обнаруживается как единое целое в пространстве $4n$ или $20n$, где n - длина последовательностей для множественного выравнивания. Найденное решение позволяет обнаруживать такие множественные выравнивания, которые пропускаются всеми разработанными ранее подходами. Например, это могут быть последовательности, имеющие более чем 1.8 замен на одну аминокислоту или нуклеотид. При поиске множественного выравнивания используются случайные позиционно-весовые матрицы, специальные процедуры оптимизации, а также двумерное динамическое программирование. Метод был применен в первую очередь для поиска скрытой периодичности в символьных последовательностях, что позволило обнаружить периодическую структуру очень многих аминокислотных последовательностей и последовательностей оснований ДНК из различных геномов. Метод оказался значительно более мощным, чем все спектральные подходы и подходы, основанные на динамическом программировании.

Публикации

1. Y. M. Suvorova, E.V. Korotkov, Genome Specificity of Triplet Periodicity of Prokaryotic Genomes, *Vestnik of Research Nuclear University MPhI* v3. N.2, 2014.
2. Suvorova YM, Korotkova MA, Korotkov EV. Study of the Paired Change Points in Bacterial Genes *IEEE/ACM Transactions on Computational Biology and Bioinformatics*; v.11(5), pp.955-964. DOI:10.1109/TCBB.2014.2321154
3. Suvorova YM, Korotkova MA, Korotkov EV. Comparative analysis of periodicity search methods in DNA sequences. *Computational Biology and Chemistry*, v.53, p.43-48, 2014 DOI: 10.1016/j.compbiolchem.2014.08.008
4. Pugacheva V, Frenkel F, Korotkov E. Investigation of phase shifts for different period lengths in the genomes of *C. elegans*, *D. melanogaster* and *S. cerevisiae*. *Comput Biol Chem*. v.51, p.12-21. 2014. doi: 10.1016/j.compbiolchem.2014.03.004.
5. Yulia M Suvorova, Eugene V Korotkov Study of triplet periodicity differences inside and between genomes. *Statistical Applications in Genetics and Molecular Biology* 2015, v.14, pp.113-123.
6. Короткова МА, Коротков ЕВ Разработка математического метода для поиска скрытой периодичности в аминокислотных последовательностях с учетом делеций или же вставок символов. *Биофизика*, том 60, №6, 1057-1068, 2015
7. Golishev MA, Korotkov EV Developing of the Computer Method for Annotation of Bacterial Genes. *Advances in Bioinformatics*, 2015. <http://dx.doi.org/10.1155/2015/635437>

АНОКСИГЕННЫЕ НИТЧАТЫЕ ФОТОТРОФНЫЕ БАКТЕРИИ – ПИОНЕРЫ ЗЕМНОЙ БИОСФЕРЫ

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

¹ ИИБ, ФИЦ Биотехнологии РАН

² ИИМИ, ФИЦ Биотехнологии РАН

Аноксигенные нитчатые фототрофные бактерии (АНФБ) являлись одними из древнейших обитателей Земли в докембрийский период (около 3,5 млрд лет назад). Их существование подтверждается наличием ископаемых строматолитов. Фактически, строматолиты являются единственными ископаемыми доказательствами существования сложно организованных микробных сообществ в этот период. Обладая способностью к фотоавтотрофному росту, по мнению многих авторов, АНФБ в докембрийский период выполняли функцию первичных продуцентов и эдификаторов в существовавших тогда микробных сообществах, представляя собой первую ступень конверсии неорганического углерода в биогенные соединения. Понимание особенностей устройства генома и метаболизма АНФБ способно прояснить многие аспекты формирования биосферы Земли на ранних этапах ее развития, поэтому изучение этих реликтовых микроорганизмов привлекает внимание исследователей во всем мире.

Целью настоящей работы являлось изучение распространения АНФБ из филы *Chloroflexi* в различных экстремальных экосистемах, поиск новых видов, их описание, определение особенностей физиологии и структуры генома и сравнительный анализ. В качестве основных объектов исследования нами были выбраны щелочные гидротермы и содовые озера Байкальской рифтовой зоны, как экосистемы, наиболее сходные по своим условиям с существовавшими в докембрийский период.

В исследованных экосистемах нам удалось обнаружить 5 новых АНФБ, закрепив тем самым мировой приоритет по описанию мезофильных АНФБ, просеквенировать геномы двух новых АНФБ, провести сравнительный анализ последовательностей генов, ответственных за формирование фотосинтетического аппарата в известных АНФБ и предложить схему эволюции АНФБ филы *Chloroflexi*. Для безхлоросомных АНФБ рода *Roseiflexus* был обнаружен и описан новый филогеографический паттерн, хорошо согласующийся с данными по геохронологии основной геотектонической системы Земли – Азиатско-Тихоокеанского Огненного кольца.

За цикл работ по исследованию АНФБ их экстремальных экосистем коллективу авторов была присуждена Первая премия издательства МАИК Наука-Интерпериодика за 2015 год.

Работа проведена при поддержке гранта РФФИ 15-04-07655.

Публикации

1. А. М. Калашников, В. А. Гайсин, М. В. Сухачева, Б. Б. Намсараев, А. Н. Пантелеева, Е. Н. Нуянзина-Болдарева, Б. Б. Кузнецов, В. М. Горленко. Аноксигенные фототрофные бактерии микробных сообществ термального источника Горячинск (Прибайкалье). *Микробиология*, 2014, том 83, № 4, с. 484–499
2. В. М. Горленко, И. А. Брянцева, А. М. Калашников, В. А. Гайсин, М. В. Сухачева, Д. С. Груздев, Б. Б. Кузнецов. НОВАЯ МЕЗОФИЛЬНАЯ НИТЧАТАЯ АНОКСИГЕННАЯ ФОТОТРОФНАЯ БАКТЕРИЯ ‘CANDIDATUS CHLOROPLOCA ASIAN’ GEN. NOV., SP. NOV. *Микробиология*, 2014, Vol. 83, No. 6, pp. 838–848
3. Е.Н.Нуянзина-Болдарева, А.М.Калашников, В.А.Гайсин, М.В.Сухачева, Б.Б.Кузнецов, В.М.Горленко. Характеристика нового штамма пурпурных несерных бактерий из термального источника. *Микробиология*, 2014, Т.83, № 2, С. 170-179
4. Gaisin, V. A., Grouzdev, D. S., Namsaraev, Z. B., Sukhacheva, M. V., Gorlenko, V. M., & Kuznetsov, B. B. (2016). Biogeography of thermophilic phototrophic bacteria belonging to *Roseiflexus* genus. *FEMS Microbiology Ecology*, 92(3), fiw012
5. Gaisin VA, Kalashnikov AM, Sukhacheva MV, Namsaraev ZB, Barhutova DD, Gorlenko VM, Kuznetsov BB. Filamentous anoxygenic phototrophic bacteria from cyanobacterial mats of Alla hot springs (Barguzin Valley, Russia). *Extremophiles*. 2015, 19(6), 1067-1076
6. Grouzdev DS, Kuznetsov BB, Keppen OI, Krasil'nikova EN, Lebedeva NV, Ivanovsky RN. Reconstruction of bacteriochlorophyll biosynthesis pathways in the filamentous anoxygenic phototrophic bacterium *Oscillochloris trichoides* DG-6 and evolution of anoxygenic phototrophs of the order Chloroflexales. *Microbiology (UK)*. 2015 Jan;161(Pt 1):120-30

МАГНЕТОСОМЫ: КОМПЛЕКСНЫЕ ПРОКАРИОТИЧЕСКИЕ ОРГАНЕЛЛЫ И ОБЪЕКТЫ НАНОБИОТЕХНОЛОГИИ

Дзюба М.В., Груздев Д.С., Козяева В.В., Кузнецов Б.Б.

ИНБ, ФИЦ Биотехнологии РАН

Магнетосомы – внутриклеточные магнитные кристаллы (30-120 нм), синтезируемые магнитотактическими бактериями (МТБ). Кристаллы магнетосом окружены двойной липопротеиновой мембраной и, как правило, выстроены в одну или несколько цепочек, что позволяет МТБ ориентироваться в геомагнитном поле. Мембрана магнетосом содержит около 30 специализированных белков, обеспечивающих их биосинтез. Уникальные свойства этих частиц (видоспецифичная форма, постоянные размеры, высокая намагниченность, биосовместимость и др.) привлекают мультидисциплинарный интерес и делают их привлекательным объектом для биотехнологии.

Им были предложены следующие применения: в качестве контрастирующих агентов для МРТ; носителей для направленной доставки лекарств; в терапии опухолей методом магнитной гипертермии; в иммунодетекции и диагностике и др. Значительными препятствиями для применения магнетосом является низкая продуктивность МТБ и сложность генетических манипуляций с ними, что усложняет функционализацию поверхности.

Для решения этих задач мы ведем исследования по следующим направлениям: 1) поиск, выделение и описание новых видов МТБ из различных природных источников; 2) разработка нового метода создания иммуноглобулин-связывающих магнетосом; 3) комплексный анализ геномов МТБ и организации генов синтеза магнетосом (магнетосомного геномного острова, MAI).

В результате были выделены и описаны три новых вида МТБ рода *Magnetospirillum*, в том числе секвенированы их геномы и установлена организация генов MAI; разработан и оптимизирован метод создания магнетосом для магнитного ИФА (иммуноферментного анализа) с поверхностью покрытой антителами, закрепленными посредством иммуноглобулин-связывающего белка.

Совместно с группой Д-ра Дирка Шулера (Университет г. Байройт, Германия), ведущей лабораторией в области генетической инженерии МТБ, в 2015 году были начаты работы по переносу MAI в другие бактерии с целью конструирования искусственного организма-производителя магнетосом. Была собрана компактная генетическая кассета, содержащая гены, кодирующие полный путь биосинтеза магнетосом. В настоящее время продолжается тестирование потенциальных гетерологических хозяев для функциональной экспрессии генов биосинтеза магнетосом.

Работы выполнены при поддержке программы РАН «Наноструктуры: физика, химия, биология, основы технологий», гранта 14.120.14.6150-NSh Президента РФ, гранта МОН РФ №16.512.11.2128, стипендии №91578115 Германского фонда академических обменов DAAD

Публикации

1. Dziuba M, Koziaeva V, Grouzdev D, Burganskaya E, Baslerov R, Kolganova T, Chernyadyev A, Osipov G, Andrianova E, Gorlenko V, Kuznetsov B. (2016) *Magnetospirillum caucaseum* sp. nov., *Magnetospirillum marisnigri* sp. nov. and *Magnetospirillum moscoviense* sp. nov., freshwater magnetotactic bacteria isolated from three distinct geographical locations in European Russia. *Int J Syst Evol Microbiol*, 66(5):2069-77.
2. Grouzdev D.S., Dziuba M.V., Kurek D.V., Ovchinnikov A.I., Zhigalova N.A., Kuznetsov B.B., Skryabin K.G. (2014) Optimized method for preparation of IG-binding bacterial magnetic nanoparticles // *Plos One*. V.9 (10). P. e109914.
3. Grouzdev D.S., Dziuba M.V., Sukhacheva M.S., Mardanov A.V., Beletskiy A.V., Kuznetsov B.B., Skryabin K.G. (2014) Draft Genome Sequence of *Magnetospirillum* sp. Strain SO-1, a Freshwater Magnetotactic Bacterium Isolated from the Ol'khovka River, Russia // *Genome Announc.* V 2. №2. pii:e00235-14.

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ МЕХАНИЗМЫ РЕГУЛЯЦИИ ЦВЕТЕНИЯ У АСТРОВЫХ (ASTERACEAE)

Шульга О.А., Щенникова А.В., Нескородов Я.Б., Скрыбин К.Г.

ИНБ, ФИЦ Биотехнологии РАН

Цель исследований - изучение эволюционных аспектов молекулярных механизмов, регулирующих онтогенез и, в частности, цветение у представителей самого многочисленного семейства цветковых растений – Астровых (*Asteraceae*, сложноцветных), - у подсолнечника и хризантемы. Наши исследования сконцентрированы на определении функциональных особенностей транскрипционных факторов семейств MADS и YABBY, а также - на выяснении роли микроРНК в регуляции морфогенеза соцветия.

Были определены функциональные особенности MADS гена подсолнечника *HAM59*, являющегося гомологом гена *AGAMOUS A.thaliana*. Ранее нами были выделены у подсолнечника два гомолога AG - *HAM45* и *HAM59*, идентичных друг другу на 85%. Для определения функциональных особенностей *HAM59* впервые получены и проанализированы трансгенные растения подсолнечника с изменённым паттерном экспрессии гена *HAM59* и хризантемы с эктопической экспрессией гена *HAM59*.

Результаты данного исследования показали, что MADS фактор транскрипции *HAM59* действительно представляет С-активность в подсолнечнике. Обнаруженные различия в паттернах экспрессии генов *HAM59* и *HAM45* при гомеозисных превращениях в цветке подсолнечника свидетельствуют о разделении С-функции между генами *HAM59* и *HAM45*. При этом терминация цветковой меристемы и кадастральная функция по отношению к А-активности лежат на факторе транскрипции *HAM59*, а определение идентичности репродуктивных органов белка *HAM59* и *HAM45* выполняют вдвоём при наличии соответствующих партнеров (1).

Эктопическая экспрессия гена *HAM59* в трубчатых цветках хризантемы вызывала превращение тычинок в лепестко-подобные структуры и приводила к мужской стерильности. В то же время изменения структуры язычковых цветков были менее выражены: наблюдалось укорачивание лепестков и их раздвоение по краю. Полученные результаты свидетельствуют о возможности использования эктопической экспрессии гена *HAM59* для создания декоративных культур с фенотипом двойного венчика, а также для получения растений с мужской стерильностью (2).

Публикации

1. Шульга ОА, Нескородов ЯБ, Щенникова АВ, Гапоненко АК, Скрыбин КГ. Эктопическая экспрессия гена *HAM59* вызывает гомеозисные изменения репродуктивных органов цветка в подсолнечнике (*Helianthus annuus* L.). Доклады Академии наук (Doklady Biochemistry and Biophysics), (2015) т.461, №4, с. 480-484 (программа фундаментальных исследований Президиума РАН “Молекулярная и клеточная биология” № 01201353319)
2. Shulga OA, Mitiouchkina TY, Shchennikova AV, Skryabin KG, Dolgov SV. Chrysanthemum modification via ectopic expression of sunflower MADS-box gene *HAM59*. *Acta Horticulturae*, (2015) V. 1087, p. 105-111 (РНФ № 14-50-00079)

ПОКОЯЩИЕСЯ "НЕКУЛЬТИВИРУЕМЫЕ" КЛЕТКИ *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* ХАРАКТЕРИЗУЮТСЯ ГЛОБАЛЬНЫМ СНИЖЕНИЕМ СОДЕРЖАНИЯ мРНК И ВЫСОКОЙ СТАБИЛЬНОСТЬЮ ТРАНСКРИПТОВ

Салина Е.Г.*, Игнатов Д.В.**, Макаров В.А.*, Воделл С.Дж.***, Бутчер Ф.Д.****, Ажикина Т.Л.***, Капрельянц А.С.*

* *ИНБИ, ФИЦ Биотехнологии РАН*

** *Институт биоорганической химии им. Шемякина и Овчинникова РАН*

*** *Brighton and Sussex Medical School, University of Sussex, Brighton*

**** *Institute for Infection and Immunity, St. George's University of London, London*

Известно, что латентная форма туберкулеза тесно связана с покоящимся состоянием микобактерий, которое характеризуется временной неспособностью к высеву на стандартных лабораторных средах ("некультивируемостью"), низким уровнем метаболической активности и фенотипической резистентностью к антибиотикам. Обнаружено, что пребывание *Mycobacterium tuberculosis* в условиях недостатка калия *in vitro* приводит к образованию морфологически измененных, "некультивируемых" форм, характеризующихся низким уровнем метаболической активности и высокой степенью резистентности к препаратам антитуберкулезной направленности. При внесении калия в среду покоящиеся клетки обладают способностью быстро реактивировать в метаболически активное, культивируемое состояние.

Анализ персистирующих *in vitro* клеток выявил глобальное снижение уровня транскрипции, сопровождающееся снижением содержания мРНК в покоящихся клетках не менее чем в 50 раз, и обнаружил транскрипты генов, кодирующих синтез белков, вовлеченных в процессы детоксикации, адаптации и репарации клеток, контроля инициации транскрипции и трансляции, а также транскрипты, соответствующие ферментам-участникам различных метаболических путей. Кроме того, в покоящихся клетках обнаружено высокое содержание малых некодирующих РНК. Хотя "транскриптом покоя" характеризуется пониженным содержанием мРНК, обнаружено, что стабильность транскриптов во времени достаточно высока. Предполагается, что данные транскрипты могут быть использованы клетками при реактивации в метаболически активное состояние.

Наличие стабильных транскриптов и белков в покоящихся клетках позволяет предположить, что, несмотря на глобальное снижение метаболической активности, в покоящихся клетках возможно протекание ряда активных метаболических процессов и существование молекулярных мишеней, для которых могут быть найдены ингибиторы. При скрининге ряда классов химических соединений обнаружен оригинальный класс 2-тиопиридинов, проявляющих существенную бактерицидную активность в отношении покоящихся клеток *M. tuberculosis*. Данный класс химических соединений перспективен для разработки лекарственных средств против латентного туберкулеза.

Публикации

1. Salina E, Ryabova O, Kaprelyants A, Makarov V. New 2-thiopyridines as potential candidates for killing both actively growing and dormant *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother*, 2014, 58(1): 55-60.
2. Salina EG, Waddell SJ, Hoffmann N, Rosenkrands I, Butcher PD, Kaprelyants AS. Potassium availability triggers *Mycobacterium tuberculosis* transition to, and resuscitation from, non-culturable (dormant) states. *Open Biol.* 2014 4: 140106
3. Ignatov DV, Salina EG, Fursov MV, Skvortsov TA, Azhikina TL, Kaprelyants AS. Dormant non-culturable *Mycobacterium tuberculosis* retains stable low-abundant mRNA. *BMC Genomics*. 2015,16(1):954.
4. Т.Л. Ажикина, Д.В. Игнатов, Е. Г. Салина, М.В. Фурсов, А.С. Капрельянц. Роль малых некодирующих РНК в метаболизме бактерий. *Успехи биологической химии* т. 55, 2015, с. 3–32

СПОСОБЫ ЗАЩИТЫ ФОТОСИНТЕТИЧЕСКОГО АППАРАТА ЦИАНОБАКТЕРИЙ ОТ ВОЗДЕЙСТВИЯ ИЗБЫТОЧНО ПОГЛОЩЕННОЙ ЭНЕРГИИ СВЕТА

Болычевцева Ю.В.¹, Акулинка Д.В.¹, Карапетян Н.В.¹, Терехова И.В.¹, Шубин В.В.¹, Юрина Н.П.¹, Волошина О.В.², Еланская И.В.³, Кузьминов Ф.И.⁴, Горбунов М.Ю.⁴, Брехт М.⁵,

¹ ИНБИ, ФИЦ Биотехнологии РАН

² МГУ, Международный лазерный центр;

³ МГУ, Биологический факультет

⁴ Institute of Marine and Coastal Sciences, Rutgers, the State University of New Jersey, USA

⁵ University of Tübingen, Institute of Physical and Theoretical Chemistry

Фотосинтез происходит с оптимальной эффективностью при такой интенсивности света, при которой энергия поглощенных квантов практически полностью используется в процессах преобразования в энергию химических связей. Избыточно поглощенная пигментами энергия может расходоваться на переход хлорофиллов в триплетное состояние. Взаимодействие же триплетных хлорофиллов с кислородом приводит к образованию синглетного кислорода, который вызывает деструкцию фотосинтетического аппарата. Цианобактерии обладают несколькими способами, позволяющими сохранять высокую эффективность биоэнергетических процессов при различных условиях освещения [1-5]. Один из них - оптимизация функционирования фотосинтетической цепи переноса электрона вследствие быстрой перестройки фотосинтетического аппарата (так называемой «state transitions»), ведущей к перераспределению энергии между фотосистемами. Известно, что изменение состояния фотосинтетического аппарата зависит от редокс состояния переносчиков электронов между фотосистемами. Однако механизм передачи редокс сигнала к световой антенне цианобактерий (фикобилисомам) не выяснен. Благодаря использованию мутантов *Synechocystis* sp. PCC 6803 с различным редокс состоянием пластохинонового пула, нам удалось получить четкое различие по квантовому выходу флуоресценции ФСII между состоянием 1 (высокий выход - дикий тип и мутант SDH⁻ с окисленным пулом) и состоянием 2 (низкий выход - Oх⁻ мутант с восстановленным пулом) фотосинтетического аппарата [3]. Показано, что клетки Oх⁻ содержат большую часть фотохимически неактивных реакционных центров ФСII, в отличие от дикого типа и SDH⁻. Кроме того, удалось показать, что ускорение линейного переноса электронов в акцепторной части ФСII вызывает возрастание выхода флуоресценции и функционального сечения поглощения фотосистемы II (в отличие от дикого типа и мутанта SDH⁻), а замедление линейного переноса электронов и ускорение циклических (и, возможно, обратных) реакций в ФСI приводит к инактивации ФСII. Эти данные позволяют предполагать участие первичного и вторичного хиноновых акцепторов ФСII в передаче редокс сигнала от пластохинонового пула к пигмент-белковой антенне и донорной части ФСII [5].

Публикации

1. Н.В. Карапетян, Ю.В. Болычевцева, Н.П. Юрина, И.В. Терехова, В.В. Шубин, М. Брехт. Длинноволновые хлорофиллы фотосистемы I цианобактерий: происхождение, локализация и функции. *Биохимия*. 2014, том 79. № 3, с.283-292.
2. Kuzminov F.I., Bolychevtseva Yu.V., Elanskaya I.V., Karapetyan N.V. Effect of APCD and APCF subunits depletion on phycobilisome fluorescence of the cyanobacterium *Synechocystis* PCC 6803. *J. Photochem. Photobiol. B* 133, 2014, 153-160
3. Болычевцева Ю.В., Кузьминов Ф.И., Еланская И.В., Горбунов М.Ю., Карапетян Н.В. Активность фотосистем и переходные состояния фотосинтетического аппарата мутантов *Synechocystis* PCC 6803 с различным редокс состоянием пластохинонового пула. *Биохимия*. 2015. Т. 80, № 1, с. 65 – 78.
4. Д.В. Акулинка, Ю.В. Болычевцева, И.В. Еланская, Н.В. Карапетян, Н.П. Юрина. Ассоциация светоиндуцируемых стрессовых белков HliA/HliB с тримерами и мономерами фотосистемы Iв клетках цианобактерии *Synechocystis* PCC 6803. *Биохимия*, 2015, том 80, № 10, с. 1523 – 1532.
5. О.В. Волошина, Ю.В. Болычевцева, Ф.И. Кузьминов, М.Ю. Горбунов, И.В. Еланская, В.В. Фадеев. Активность фотосистемы II дикого типа *Synechocystis* PCC6803 и его мутантов с различным редокс состоянием пластохинонового пула. *Принято в журнал Биохимия*.

ГЕНЕТИЧЕСКИ КОДИРУЕМЫЙ FRET-СЕНСОР, ОСНОВАННЫЙ НА ТЕРБИЕВОМ ХЕЛАТЕ И КРАСНОМ ФЛУОРЕСЦЕНТНОМ БЕЛКЕ, ДЛЯ ДЕТЕКЦИИ АКТИВНОСТИ КАСПАЗЫ-3

Горященко А.С.¹, Хренова М.Г.^{1,2}, Бочкова А.А.², Ивашина Т.В.³, Винокуров Л.М.⁴, Савицкий А.П.^{1,2}

¹ ИНБИ, ФИЦ Биотехнологии РАН

² МГУ имени М.В. Ломоносова, Химический факультет

³ Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрябина

⁴ Филиал Института биоорганической химии имени академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН

FRET-сенсоры широко применяются для детекции ферментативной активности в живых клетках. Использование в качестве доноров во FRET-паре флуоресцирующих комплексов лантанидов, отличительной особенностью которых является микросекундная флуоресценция, и спектроскопии с временной задержкой позволяет элиминировать короткоживущий фоновый сигнал, связанный с автофлуоресценцией биомолекул и светорассеянием.

В нашей лаборатории был разработан генетически кодируемый FRET-сенсор на каспазу-3 Tb³⁺-TСП-19-TagRFP, где в качестве донора использован Tb³⁺ в комплексе с тербий-связывающим пептидом YIDTNNDGWYEGDELLA, гибкий линкер VDGGSGGDEVGDWGGSGLD с сайтом узнавания каспазы-3 (DEVVD), и красный флуоресцентный белок TagRFP в качестве акцептора. В получаемой конструкции образуются две донорно-акцепторные пары, между которыми происходит перенос энергии по индуктивно-резонансному механизму, первая – от остатка триптофана, являющегося сенсibilизатором к тербию, вторая – от иона тербия к акцептору, которым является хромофор белка TagRFP.

Впервые нами была детектирована сенсibilизированная флуоресценция TagRFP методом спектроскопии с временной задержкой. Данный подход позволяет исключить вклад в общую интенсивность прямого возбуждения флуоресценции акцептора и регистрировать только флуоресценцию акцептора за счет переноса энергии. Кроме того, временная задержка отсекала короткоживущую фоновую флуоресценцию. Было рассчитано значение K_d комплекса тербия с тербий-связывающим пептидом, составившее 17±7 мкМ. Наконец, симуляция методом молекулярной динамики позволила нам определить квантовый выход комплекса тербия с тербий-связывающим пептидом, равный 10%.

Публикация

1. Goryashchenko, A.S.; Khrenova, M.G.; Bochkova, A.A.; Ivashina, T.V.; Vinokurov, L.M.; Savitsky, A.P. Genetically Encoded FRET-Sensor Based on Terbium Chelate and Red Fluorescent Protein for Detection of Caspase-3 Activity. *Int. J. Mol. Sci.* **2015**, *16*, 16642-16654.

ЗАВИСИМОСТЬ БИОХИМИЧЕСКИХ И КАТАЛИТИЧЕСКИХ СВОЙСТВ ЦЕЛЛЮЛАЗ *PENICILLIUM VERRUCULOSUM* ОТ СТЕПЕНИ N-ГЛИКОЗИЛИРОВАНИЯ

Доценко А.С.^{1,2}, Гусаков А.В.², Рожкова А.М.¹, Волков П.В.¹, Шашков И.А.¹, Сатрутдинов А.Д.¹,
Синицын А.П.¹

¹ ИНБИ, ФИЦ Биотехнологии РАН

² МГУ имени М.В. Ломоносова, Химический факультет

Большинство ферментов, использующихся в промышленных процессах биотрансформации растительного сырья, в значительной степени гликозилированы. Гликозилирование оказывает влияние на все стадии формирования, секреции и проявления активности ферментов. Для целлюлаз показано, что гликаны на поверхности белковой глобулы принимают участие в неспецифическом связывании с субстратом и проявлении каталитической активности. Целью предлагаемой работы являлось исследование зависимости биохимических и каталитических свойств целлюлаз *Penicillium verruculosum* от степени N-гликозилирования.

Целлобиогидролаза I (ЦБГI), целлобиогидролаза II (ЦБГII) и эндоглюканаза II (ЭГII) являются одними из ключевых ферментов целлюлолитического комплекса, секретируемого промышленным продуцентом технических ферментов *P. verruculosum*. Масс-спектрометрическим анализом были определены сайты N-гликозилирования и структуры N-связанных гликанов. В структурах ЦБГI и ЦБГII было обнаружено 4 сайта, в структуре ЭГII – 2 сайта N-гликозилирования. N-Связанные гликаны представляли собой высокоманнозные олигосахариды общей структуры (GlcNAc)₂Man_x, где x составлял от 0 до 13.

Для исследования роли N-гликозилирования в проявлении свойств ЦБГI, ЦБГII и ЭГII были получены соответствующие рекомбинантные белки с мутированными сайтами N-гликозилирования. Было показано, что внесение мутаций в структуру ЦБГI (N45A), ЦБГII (N219A, N265A) и ЭГII (N42A, N194A) позволило получить мутантные формы с увеличенной каталитической активностью по отношению к модельным субстратам (микрористаллическая целлюлоза, β-глюкан), а также с увеличенной гидролитической способностью по отношению к природному субстрату (древесина осины). В случае ЦБГI и ЦБГII внесение мутаций, заключавшихся в удалении одного из сайтов гликозилирования, не привело к изменению таких биохимических свойств, как температурный и рН-профили ферментативной активности, термостабильность. В случае ЭГII внесение мутаций не привело к изменению температурного профиля ферментативной активности и термостабильности, однако вызвало незначительное изменение рН-профиля ферментативной активности.

Публикации

1. Anna S. Dotsenko, Alexander V. Gusakov, Pavel V. Volkov, Aleksandra M. Rozhkova, Arkady P. Sinitsyn. N-Linked Glycosylation of Recombinant Cellobiohydrolase I (Cel7A) From *Penicillium verruculosum* and Its Effect on the Enzyme Activity // *Biotechnology and Bioengineering*. 2016. – V.113, I.2. – P.283-291.
2. А.С. Доценко, А.М. Рожкова, А.В. Гусаков. Свойства и N-гликозилирование рекомбинантной эндоглюканазы II *Penicillium verruculosum* // *Вестн. Моск. Ун-та. Сер. 2. Химия*. 2015. – Т. 56, № 6. – С.354-358.
3. Anna S. Dotsenko, Alexander V. Gusakov, Aleksandra M. Rozhkova, Olga A. Sinitsyna, Vitaly A. Nemashkalov, Arkady P. Sinitsyn. Effect of N-linked Glycosylation on the Activity and Other Properties of Recombinant Endoglucanase IIa (Cel5A) from *Penicillium verruculosum*. *Protein Engineering, Design, and Selection*, 2016, submitted

ОПТИМИЗАЦИЯ РЕФОЛДИНГА, БЕЛКОВАЯ ИНЖЕНЕРИЯ И БИОАНАЛИТИЧЕСКОЕ ПРИМЕНЕНИЕ АНИОННОЙ ПЕРОКСИДАЗЫ ТАБАКА

Тишков В.И.^{1,2,3}, Захарова Г.С.^{1,3,4}, Полозников А.А.^{3,4}, Газарян И.Г.²

¹ ИНБИ, ФИЦ Биотехнологии РАН

² Химический факультет Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова

³ ООО "Инновации и высокие технологии МГУ"

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

Пероксидаза из корней хрена (HRP) широко используется в биоаналитике и тонком органическом синтезе, однако этот фермент имеет большое количество недостатков. В качестве альтернативы были предложены пероксидазы из других источников - сои, королевской пальмы и др. Нами была создана генно-инженерная конструкция для экспрессии в клетках *E.coli* анионной пероксидазы табака (TOP), которая превосходит HRP по многим параметрам. В рамках данной работы:

1. Разработана методика рефолдинга фермента с выходом по активности выше 80%
2. На основе анализа трехмерной структуры фермента предложены положения для направленного мутагенеза. Получены точечные и двойной мутант с улучшенными свойствами.
3. Полученные мутанты были успешно использованы в биоаналитических системах на основе хемилюминесцентной системы окисления люминола и в амперометрических биосенсорах

Публикации:

1. Zakharova, G.S., Poloznikov, A.A., Chubar, T.A., Gazaryan, I.G., Tishkov, V.I. High-yield reactivation of anionic tobacco peroxidase overexpressed in *Escherichia coli*. *Protein Expression and Purification*, 2015, v.113, p.85-93. DOI 10.1016/j.pep.2015.05.007
2. Poloznikov, A., Zakharova, G., Chubar, T., Tishkov, V., Gazaryan, I. Site-directed mutagenesis of tobacco anionic peroxidase: effect of additional aromatic acids on stability and activity. *Biochimie*, 2015, v.115, N1, p.71-77. doi:10.1016/j.biochi.2015.04.021.
3. Olloqui-Sariego J.L., Zakharova G.S., Poloznikov A.A., Calvente J.J., Hushpulia D.M., Gorton L., Andreu R. Interprotein Coupling Enhances the Electrocatalytic Efficiency of Tobacco Peroxidase Immobilized at a Graphite Electrode. *Analytical Chemistry*, 2015, v.87, N (21), pp 10807–10814. DOI: 10.1021/acs.analchem.5b01710.
4. Полозников А.А., Захарова Г.С., Чубарь Т.А., Хушпульян Д.М., Газарян И.Г., Тишков В.И. Каталитические свойства и стабильность рекомбинантной пероксидазы табака с заменой Pe37Met. *Вестник Московского Университета, Серия 2: Химия*, 2014, т.55, №2, с.106-112. DOI: 10.3103/S0027131414020072

РАЗРАБОТКА СИСТЕМ ЭКСПРЕССНОЙ ИММУНОХРОМАТОГРАФИЧЕСКОЙ СЕРОДИАГНОСТИКИ

Сотников Д.В., Бызова Н.А., Жердев А.В., Дзантиев Б.Б.

ИНБИ, ФИЦ Биотехнологии РАН

Серодиагностика – определение уровня специфических антител в крови – широко применяется для выявления различных инфекционных заболеваний. В настоящей работе представлено изучение общих закономерностей серодиагностики в иммунохроматографическом формате и разработка тест-систем для двух социально значимых инфекционных заболеваний: легочного туберкулеза людей и бруцеллеза крупного рогатого скота.

При реализации стандартного формата иммунохроматографической серодиагностики на мембране формируются детектируемые комплексы из иммобилизованных молекул антигена, содержащихся в пробе специфических антител и конъюгата коллоидного золота с иммуноглобулин-связывающим реагентом (антивидовыми антителами или белками А/Г). При этом с иммуноглобулин-связывающим реагентом взаимодействуют все иммуноглобулины пробы, а с иммобилизованным антигеном – только специфические антитела, составляющие менее 10% общего пула иммуноглобулинов, что в значительной степени ограничивает аналитические возможности таких тестов.

Для количественного описания процессов в аналитических системах изучено иммунное комплексообразование с использованием биосенсорной системы Biosoge X, основанной на принципе поверхностного плазмонного резонанса. Получены значения кинетических и равновесных констант взаимодействия антиген–антитело.

Проведены исследования состава конъюгатов маркера (коллоидного золота) с иммунореагентами. С этой целью разработана новая методика, основанная на измерении флуоресценции триптофана в составе белков. Флуоресценцию измеряли в надосадках, получаемых после центрифугирования конъюгатов коллоидного золота с белком. Значения флуоресценции на длине волны 350 нм для надосадочной жидкости (не связанного с коллоидным золотом белка) сравнивали с калибровочной зависимостью. Исходя из материального баланса, рассчитывали количество белка, связавшегося с поверхностью коллоидного золота. Предложенная методика позволяет с высокой точностью установить количество белковых молекул на наночастице без использования меток. Также исследована степень сохранения функциональной активности антител, конъюгированных с коллоидным золотом. Методом иммуноферментного анализа показано, что после конъюгации только 12% активных центров антивидовых антител сохраняют способность связываться с соответствующими антителами.

Чтобы выявить способы преодоления ограничений иммунохроматографической серодиагностики, характерных для существующих систем, разработана математическая модель, описывающая процессы взаимодействия иммунореагентов. Отличием данной модели является использование нечисленного подхода и учет неравновесности процессов иммунного взаимодействия, тогда как существующие модели либо являются численными, либо используют приближение равновесных условий.

На основании анализа модели и выявленных факторов, лимитирующих аналитические возможности тестов, предложены две новые схемы иммунохроматографической серодиагностики. В первой схеме один и тот же антиген сорбируется на поверхность коллоидного маркера и на иммунохроматографическую мембрану, а детектируемые комплексы формируются благодаря наличию у антител нескольких валентностей. Во второй схеме порядок формирования детектируемого комплекса инвертируется: коллоидное золото конъюгируется с антигеном, а на мембране сорбируется белок А в концентрациях, достаточных для связывания всех иммуноглобулинов пробы. Данные подходы нивелируют влияние неспецифических иммуноглобулинов на результаты анализа.

Предложенные схемы иммунохроматографии реализованы для диагностики легочного туберкулеза людей с использованием в качестве антигена рекомбинантного антигена 38 кДа *Mycobacterium tuberculosis* (Rv0934) и бруцеллеза крупного рогатого скота с использованием липополисахарида *Brucella abortus*. Экспериментальные образцы тест-систем показали высокую диагностическую эффективность, позволяя достоверно выявлять специфические антитела в пробах от больных, не дававших положительные результаты тестирования в традиционном формате иммунохроматографии.

Публикации:

1. Sotnikov D.V., Zherdev A.V., Dzantiev B.B. Development and application of a label-free fluorescence method for determining the composition of gold nanoparticle–protein conjugates. – International Journal of Molecular Sciences. 2015; 16 (1): 907-923. (IF 2,862)
2. Сотников Д.В., Жердев А.В., Дзантиев Б.Б. Детекция межмолекулярных взаимодействий, основанная на регистрации поверхностного плазмонного резонанса. – Успехи биологической химии. 2015, 55: 391-420. (IF 1,303)
3. Сотников Д.В., Жердев А.В., Авдиенко В.Г., Дзантиев Б.Б. Иммунохроматографическая серодиагностика туберкулеза с использованием конъюгата коллоидное золото – антиген. – Биотехнология, 2015, N 2: 76-81. (IF 0,735)
4. Sotnikov D.V., Radchenko A.S., Zherdev A.V., Dzantiev B.B. Determination of the composition and functional activity of the conjugates of colloidal gold and antibodies. – Eurasian Journal of Analytical Chemistry. 2016; 11 (3): 169-179. (SCOPUS)
5. Sotnikov D.V., Byzova N.A., Zherdev A.V., Eskendirova S.Z., Baltin K.K., Mukanov K.K., Ramankulov E.M., Sadykhov E.G., Dzantiev B.B. Express immunochromatographic detection of antibodies against *Brucella abortus* in cattle sera based on quantitative photometric registration and modulated cut-off level. – Journal of Immunoassay and Immunochemistry. 2015; 36: 80–90. (SCOPUS)
6. Sotnikov D.V., Zherdev A.V., Dzantiev B.B. Surface plasmon resonance based biosensors. – Chapter 30. In book: Nanobiosensors for Personalized and Onsite Biomedical Diagnosis (Ed. Pranjal Chandra). *Stevenage*: Institution of Engineering and Technology. 2016. ISBN-10: 1849199507. (Book in press).

Патенты:

1. Сотников Д.В., Жердев А.В., Дзантиев Б.Б. Тест-полоска для высокочувствительного иммунохроматографического анализа. – Патент Российской Федерации на изобретение № 2523393. Опубликовано 20 июля 2014 г. в «Бюлл. изобр.» № 20.
2. Сотников Д.В., Бызова Н.А., Жердев А.В., Дзантиев Б.Б. Метод получения межмолекулярных конъюгатов для иммунохроматографического определения специфических антител. – Патент Российской Федерации на изобретение № 2530560. Опубликовано 10 октября 2014 г. в «Бюлл. изобр.» № 28.
3. Сотников Д.В., Бызова Н.А., Жердев А.В., Дзантиев Б.Б. Способ проведения иммунохроматографического анализа для серодиагностики. – Патент Российской Федерации на изобретение № 2532352. Опубликовано 10 ноября 2014 г. в «Бюлл. изобр.» № 31.
4. Сотников Д.В., Жердев А.В., Дзантиев Б.Б. Способ проведения иммунохроматографического анализа с диссоциирующей флуоресцентной меткой. – Патент Российской Федерации на изобретение № 2535061. Опубликовано 10 декабря 2014 г. в «Бюлл. изобр.» № 34.
5. Сотников Д.В., Жердев А.В., Дзантиев Б.Б. Способ иммунохроматографического определения специфических антител. – Патент Российской Федерации на изобретение № 2545909. Опубликовано 10 апреля 2015 г. в «Бюлл. изобр.» № 10.

МЕХАНИЗМ ТЕПЛОВОЙ АГРЕГАЦИИ БЫЧЬЕГО СЫВОРОТОЧНОГО АЛЬБУМИНА

Борзова В.А.¹, Маркосян К.А.¹, Чеботарева Н.А.¹, Клейменов С.Ю.^{1,2}, Полянский Н.Б.³,
Муранов К.О.³, Штейн-Марголина В.А.¹, Шубин В.В.¹, Марков Д.И.¹, Курганов Б.И.¹

¹ ИИБИ, ФИЦ Биотехнологии РАН

² Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН

³ Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН

Механизм тепловой агрегации бычьего сывороточного альбумина установлен на основании экспериментальных данных, полученных с использованием методов динамического светорассеяния, аналитического ультрацентрифугирования, дифференциальной сканирующей калориметрии и фракционирования в поле асимметричного потока (AF4). Первая стадия процесса агрегации – разворачивание нативной формы (N), приводящее к образованию двух форм денатурированного белка с разной склонностью к агрегации. Одна из форм (высокореакционноспособная форма, U_{hr}) характеризуется высокой скоростью агрегации; агрегация этой формы приводит к формированию первичных агрегатов с гидродинамическим радиусом $R_{h,1}$. Вторая форма (низкореакционноспособная форма, U_{lr}) способна участвовать в процессе агрегации путем присоединения к первичным агрегатам, образованным формой U_{hr} , и обладает способностью к самоагрегации с формированием стабильных агрегатов малого размера (A_{st}). При исчерпании формы U_{lr} образуются вторичные агрегаты с гидродинамическим радиусом $R_{h,2}$. Дальнейшая агрегация белка происходит в результате слипания вторичных агрегатов в режиме диффузионно-контролируемой кластер-кластерной агрегации. Первичные и вторичные агрегаты морфологически охарактеризованы методами трансмиссионной электронной микроскопии и флуоресцентной спектроскопии и представляют собой фибриллоподобные агрегаты, не имеющие выраженной амилоидной структуры. Стабильные агрегаты малого размера (A_{st}) выделены и охарактеризованы методами флуоресцентной спектроскопии, динамического светорассеяния, спектроскопии кругового дихроизма и аналитического ультрацентрифугирования.

Предложена возможность использования тест-системы на основе тепловой агрегации БСА при 70 °С для количественной оценки антиагрегационной активности химических шаперонов.

Публикация

1. Borzova V.A., Markossian K.A., Chebotareva N.A., Kleymenov S.Y., Poliansky N.B., Muranov K.O., Stein-Margolina V.A., Shubin V.V., Markov D.I., Kurganov B.I. (2016) Kinetics of Thermal Denaturation and Aggregation of Bovine Serum Albumin. *PLoS ONE*. V. 11. No. 4. e: 0153495.

НОВЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ ПРОТЕОМНОГО ИЗУЧЕНИЯ МЫШЕЧНЫХ БЕЛКОВ ДВУХ ВИДОВ СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫХ ЖИВОТНЫХ И ЧЕЛОВЕКА

Ковалев Л.И.¹, Ковалева М.А.¹, Иванов А.В.¹, Еремина Л.С.¹, Лисицкая К.В.¹, Пашинцева Н.В.¹, Каменихина И.А.¹, Новикова Л.А.¹, Шишкин С.С.¹, Зверева Е.А.¹, Жердев А.В.¹, Дзантиев Б.Б.¹, Манюхин Я.С.², Чернуха И.М.², Лисицын А.В.², Жетишева Р.А.³, Галахов И.Е.³, Шогенова М.Х.³, Карпов А.М.³, Наумов В.Г.³

¹ ИНБИ, ФИЦ Биотехнологии РАН,

² ФГБНУ «ВНИИМП им. В.М.Горбатова»,

³ ФГБУ «РКНПК» Минздрава РФ.

В отчетный период с помощью протеомных технологий были изучены белковые составы скелетных мышц двух видов сельскохозяйственных животных - домашней лошади (*Equus caballus*) и двугорбого верблюда (*Camelus bactrianus*). Удалось идентифицировать 85 и 114 белковых фракций на двумерных электрофореграммах мышечных белков этих видов. Для большинства идентифицированных белков ранее отсутствовали прямые данные («на белковом уровне») и идентификация осуществлялась по материалам исследований нуклеиновых кислот соответствующих видов (т.е. по сведениям, полученным на «геномном или транскриптомном уровнях»). В итоге расширена отечественная база данных «Протеомика мышечных органов» (<http://mp.inbi.ras.ru/>) за счет формирования двух новых модулей с новой информацией о 199 белковых продуктах генной экспрессии («Белки скелетной мышцы лошади» и «Белки скелетной мышцы верблюда»).

На основе результатов протеомных исследований был выбран как потенциальный маркер термостабильный тропонин I и была разработана методика определения этого белка в мясных продуктах (в сотрудничестве с лабораторией иммунобиохимии). Разработанная методика позволяет достоверно определить количество мясного сырья в коммерческих продуктах и дифференцировать присутствие в них мяса животных от мяса птицы.

В 2014-2015 гг. продолжалось исследование мышечных белков аорты человека. В результате количество идентифицированных белков и включенных в модуль «Белки средней оболочки аорты» базы данных «ПМО» увеличено с 29 до 88. Среди идентифицированных в отчетный период - ряд белков, которые можно рассматривать как потенциальные биомаркеры атеросклеротического поражения разных слоев аорты. Так, при послойном исследовании грудного отдела аорты (интима, медиальный слой, n=20) в норме и при атеросклеротических изменениях было выявлено существенное отложение белковых продуктов 10 генов в зонах образования атеросклеротических бляшек в разных сочетаниях. В частности, выявлены фрагменты окисленного гладкомышечного трансгелина, а также изоформы аполипопротеинов A1, E и J, неканонические изоформы β , γ – фибриногена и катепсина D, макрофаг-кэпирующий белок 1 (Macrophage-capping protein), СОД 3, амилоид P и др.. Кроме того, во всех исследованных случаях регистрировалось накопление большого количества легких и тяжелых цепей иммуноглобулинов.

При изучении с помощью протеомных технологий белков в культивируемых клетках рабдомиосаркомы линии RD в сравнении с клетками нескольких линий мезенхимального происхождения, в частности, SK-UT-1B (лейомиосаркома), U-2 OS (остеосаркома) и SC5-MSC (неиммортиализованные мезенхимальные эмбриональные стволовые клетки), было идентифицировано 65 белковых фракций. Среди идентифицированных фракций оказалось, как минимум, десять, принадлежащих белкам, которые рассматриваются как ассоциированные со злокачественной трансформацией или даже как потенциальные биомаркеры различных злокачественных опухолей. Полученные результаты стали основой для формирования новой расширенной версии отечественной БД ПРП.

Публикации:

1. Манюхин Я.С., Чернуха И.М., Ковалев Л.И., Иванов А.В., Ковалева М.А., Шишкин С.С. Изучение белков конины с помощью протеомных технологий. Все о мясе – теория и практика переработки мяса, 2014. 3, 20-25
2. Шишкин С.С., Ковалев Л.И., Ковалева М.А., Иванов А.В., Еремина Л.С., Садыхов Э.Г. Применение протеомных технологий для анализа мышечных белков сельскохозяйственных животных, используемых в мясной промышленности (обзор). *Прикладная биохимия и микробиология*, 2014.-N 5.-453-465.
3. Zvereva E.A., Kovalev L.I., Ivanov A.V., Kovaleva M.A., Zherdev A.V., Shishkin S.S., Lisitsyn A.B., Chernukha I.M., Dzantiev V.B. Enzyme immunoassay and proteomic characterization of troponin I as a marker of mammalian muscle compounds in raw meat and some meat products. *Meat Science*. 2015, 105, 46-52.
4. Жетишева Р.А., Ковалева М.А., Галахов И.Е., Каменихина И.А., Новикова Л.А., Шогенова М.Х., Карпов А.М., Ковалев Л.И., Наумов В.Г. Исследование изменений белкового состава интимы и меди грудного отдела аорты больных ИБС при атеросклеротическом поражении протеомными технологиями. *Кардиологический вестник*, 2015,2, 44-50.
5. Пашинцева Н.В., Лисицкая К.В., Ковалев Л.И., Еремина Л.С., Шишкин С.С. Протеомное изучение белков в культивируемых клетках рабдомиосаркомы RD и в некоторых других клетках мезенхимального происхождения. // *Современные проблемы науки и образования*. 2015. №5. 8 с. <http://www.science-education.ru/pdf/2015/5/587.pdf>

ФАКТЫ, СВИДЕТЕЛЬСТВУЮЩИЕ О СЖАТИИ КЛЕТОК *ESCHERICHIA COLI* K12 ПРИ ДЕЙСТВИИ НАНОЧАСТИЦ TiO_2

Жукова Л.В.

ИНБИ, ФИЦ Биотехнологии РАН.

Исследование механизма действия наночастиц на живые клетки является актуальным в связи с возрастающим использованием в технологии наноразмерных материалов, чтобы свести к минимуму их возможное отрицательное воздействие на окружающую среду и здоровье человека. Кроме того, такое исследование представляет интерес в связи с поиском принципиально новых антимикробных препаратов. Известно, что действие наночастиц TiO_2 при облучении ближним ультрафиолетом (УФА) и в определённых темновых условиях приводит к снижению численности различных микроорганизмов. С целью выяснения механизма антибактериального действия наночастиц TiO_2 на клетки бактерии *E. coli* K12 в данной работе определялось влияние наночастиц TiO_2 на колониеобразующую способность клеток в темноте и при УФА-облучении при разной продолжительности воздействия в условиях, обеспечивающих контакт наночастиц с клеточной поверхностью. Методом окрашивания флуоресцентным красителем акридином оранжевым выявлялось физиологическое состояние клеток после инкубации с наночастицами TiO_2 . Оказалось, что даже в условиях сорбции наночастиц на поверхности клеток, не все клетки инактивировались. Как при облучении, так и без УФА, инактивированные клетки обнаруживались только в составе агрегатов, образуемых в результате действия наночастиц, причём преимущественно во внутренней их части. Если воспрепятствовать образованию крупных агрегатов клеток, то воздействие наночастиц TiO_2 при УФА-облучении в течение 60 мин не приводило к инактивации клеток. Сравнение флуоресцентного и оптического изображения одного и того же агрегата, образованного после воздействия наночастиц, показало, что расположение инактивированных клеток совпадало с оптически более плотной областью агрегата. УФА-облучение приводило к увеличению взаимного притяжения клеток, подвергнутых воздействию наночастиц. Наружные клетки в агрегатах, которые подвергались относительно большему воздействию УФА, инактивировались при увеличении продолжительности экспозиции в последнюю очередь, то есть после клеток, которые экранировались внешними клетками агрегата. Полученные результаты подтверждают ранее высказанное предположение, что инактивация бактериальных клеток, покрытых наночастицами TiO_2 , происходит в результате их взаимного притяжения и последующего сжатия, причём УФА-облучение усиливает этот процесс.

Публикация:

Zhukova L.V. Evidence for Compression of *Escherichia coli* K12 Cells under the Effect of TiO_2 Nanoparticles. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 2015, 7 (49), pp 27197–27205

ПОДХОДЫ К РЕГУЛЯЦИИ АЛЬТЕРНАТИВНОГО СИНТЕЗА АЛЬГИНАТОВ И ПОЛИОКСИАЛКАНОАТОВ БАКТЕРИЯМИ РОДА *AZOTOBACTER*

Бонарцева Г.А.¹, Акулина Е.А.¹, Мышкина В.Л.¹, Махина Т.К.¹, Яковлев С.Г.¹, Филатова Е.В.¹, Зернов А.Л.¹, Жуйков В.А.¹, Воинова В.В.^{1,2}, Жаркова И.И.², Иванова Э.В.², Иорданский А.Л.¹, Гажва Ю.В.³, Иванов С.Ю.³, Трещалина Е.М.⁴, Шайтан К.В.², Бонарцев А.П.^{1,2}

¹ ИНБИ, ФИЦ Биотехнологии РАН

² Биологический факультет МГУ им.М.В.Ломоносова

³ Центральный научно-исследовательский институт стоматологии и челюстно-лицевой хирургии МЗ РФ

⁴ Российский онкологический научный центр им. Н.Н.Блохина» МЗ РФ

Интерес к полимерам, синтезируемым микроорганизмами, определяется их уникальными свойствами (биосовместимость и биоразлагаемость), столь необходимыми в настоящее время для создания новых материалов при использовании в определенных областях промышленности, медицины и фармакологии. Бактерии рода *Azotobacter* продуцируют два класса полимеров, имеющих биотехнологическое значение: внутриклеточные запасные вещества – полиоксиалканоаты (ПОА) и внеклеточные полисахариды – альгинаты (АЛГ). Исследования нашей группы длительное время были посвящены изучению биосинтеза и свойств ПОА, созданию новых композиционных материалов на их основе, получению микро- и наночастиц с включением лекарственных веществ, созданию биоразлагаемых имплантов и матриц для тканевой биоинженерии и т.д. Между тем, АЛГ, которые, как правило, считались нежелательным побочным продуктом биосинтеза ПОА бактериями рода *Azotobacter*, в настоящее время можно считать не менее ценным биосинтетическим материалом. В медицине и фармацевтической промышленности появились новые ниши для использования АЛГ, чем и объясняется сегодня активное внимание к этим полимерам в научном мире. Альгинаты обладают гелирующими свойствами, что определяет возможность их использования в фармацевтике в форме гидрогелей, микрокапсул, микросфер, наночастиц, матриц и т.д. Одним из применений в фармацевтике является использование АЛГ в качестве пероральных препаратов благодаря их способности сохранять гелеобразность даже в условиях низкой кислотности желудочного сока, что позволяет осуществлять эффективную защиту при заболеваниях желудочно-кишечного тракта.

Целью работы было изучение способности бактерий рода *Azotobacter* к синтезу АЛГ. Оценка способности коллекции разного вида бактерий рода *Azotobacter* к синтезу АЛГ показала, что все испытанные бактерии обладают этой способностью, однако количество синтезированного полимера у разных видов варьирует. Показано, что капсулярный АЛГ составляет от 2,6% до 32% от общего АЛГ у разных штаммов. Отобраны штаммы, способные к активному синтезу АЛГ. В условиях несбалансированного роста изучено влияние различного состава среды на биосинтез АЛГ у отобранных штаммов. Выявлено регулирующее влияние кислорода на биосинтез АЛГ и ПОА у бактерий рода *Azotobacter*. Увеличение аэрации приводит к увеличению синтеза АЛГ, уменьшение аэрации способствует синтезу ПОА. Дальнейшая работа предусматривает изучение влияния различных ферментационных параметров на продукцию и композиционный состав АЛГ и ПОА и разработку новых ферментационных стратегий, которые могут быть применены для альтернативной продукции АЛГ и ПОА бактериями рода *Azotobacter*.

Публикации:

1. Гажва Ю.В., Бонарцев А.П., Жаркова И.И., Махина Т.К., Мышкина В.Л., Зернов А.Л., Иванова Э.В.², Бонарцева Г.А., Шайтан К.В., Иванов С.Ю. Разработка и исследование in vivo и in vitro костно-пластического материала на основе композиции гидроксипатита, поли-3-оксипутирата и альгината натрия. *Современные технологии в медицине*, 2014, том 6, No.1, стр. 6-13.
2. Иванов С.Ю., Бонарцев А.П., Гажва Ю.В., Жаркова И.И., Махина Т.К., Мышкина В.Л., Бонарцева Г.А., Акулина Е.А., Шайтан К.В. Разработка и исследование изолирующей мембраны на основе сополимера поли-3-оксипутирата-со-3-оксипутирата для направленной костной регенерации. *Биомедицинская химия*, 2015, 61(6), 717-723.
3. Зернов А.Л., Бонарцев А.П., Иванов С.Ю., Махина Т.К., Мышкина В.Л., Фефанов А.В., Гажва Ю.В., Иванов С.Ю., Шайтан К.В., Бонарцева Г.А. Микрокапсулы из поли(3-гидроксипутирата) для пролонгированного высвобождения белка. *Современные технологии в медицине*, 2015 г., 7(4), 50-57.
4. Bonartsev A.P., Zharkova I.I., Yakovlev S.G., Myshkina V.L., Makhina T.K., Zernov A.L., Kudryashova K.S., Feofanov A.V., Akulina E.A., Ivanova E.V., Zhuikov V.A., Voinova V.V., Bessonov I.V., Bonartseva G.A., Shaitan K.V., and Kirpichnikov M.P. 3D-Scaffolds from Poly (3-hydroxybutyrate) Poly (ethylene glycol) Copolymer for Tissue Engineering. *Journal of Biomaterials and Tissue Engineering* 6.1 (2016): 42-52.
5. Bonartsev A.P., Zernov A.L., Yakovlev S.G., Zharkova I.I., Myshkina V.L., Mahina T.K., Bonartseva G.A., Shaitan K.V., Treshalina E.M. New poly(3-hydroxybutyrate) microparticles with paclitaxel sustained release for intraperitoneal administration. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry*, 2016. (in press).
6. Бонарцева Г.А., Акулина Е.А., Мышкина В.Л., Воинова В.В., Махина Т.К., Бонарцев А.П. Влияние условий культивирования на синтез альгинатов бактериями рода *Azotobacter*. *Прикладная биохимия и микробиология*, 2016, (в печати).

ГЕНОМ И ТРАНСКРИПТОМ БАЗИДИОМИЦЕТА *TRAMETES HIRSUTA* - ЭФФЕКТИВНОГО ДЕСТРУКТОРА ЛИГНИНА

Королева О.В., Тяжелова Т.В., Павлов А.Р., Мосунова О.В., Васина Д.В., Федорова Т.В., Моисеенко К.В., Глазунова О.А., Ландесман Е.О.

ИНБИ, ФИЦ Биотехнологии РАН

Получен гаплоидный штамм *Trametes hirsuta* 072. Проведено секвенирование 4 созданных библиотек геномной ДНК. Собранный standard draft геном помещён в DDBJ/EMBL/GenBank (accession number LIYB00000000).

Установлено, что мультигенное семейство лакказ базидиомицета *Trametes hirsuta* состоит из 7 генов. В ходе анализа динамики экспрессии генов лакказ при культивировании *T. hirsuta* в разных условиях была показана дифференциальная экспрессия генов в зависимости от условий и времени культивирования гриба. Внесение эффекторов сильно влияло на профиль экспрессии генов, кодирующих изоферменты лакказ *T. hirsuta*, причем динамика экспрессии каждого индивидуального гена зависела от типа индуктора. Сравнение карт *de novo* секвенированных пептидов идентифицированных лакказ *T. hirsuta* между собой показало, что основным продуцируемым на всех средах культивирования изоферментом является LacA (GenBank: KP027478). Однако после 21 суток культивирования на ЛЦ среде была обнаружена продукция второго изофермента – LacC. Присутствие белкового продукта немажорного изофермента (LacC) совместно с мажорным изоферментом в секретома показано впервые.

Динамика экспрессии лакказ также исследована на ГП и ГП/Cu²⁺ средах методом супрессионной вычитающей гибридизации кДНК с дополнительным этапом зеркально-ориентированной селекции транскриптов. Основное влияние ионы меди на тотальный транскриптом базидиомицета *T. hirsuta* оказывают в части процессов метаболизма углеводов. Кроме того, одним из метаболических путей *T. hirsuta*, экспрессия генов которого изменялась достаточно значительно, явилась дыхательная цепь (окислительное фосфорилирование). По данным вычитающей гибридизации, последовательности, идентифицированные как транскрипты лакказ, увеличивали экспрессию в 10-1000 раз (в зависимости от изофермента) на ГП/Cu²⁺ среде. Филогенетический анализ полученных аминокислотных последовательностей и последовательностей лакказ из других грибов рода *Trametes* позволил выделить 4 кластера среди лакказ рода *Trametes*: кластер 1 (LacA); кластер 2 (LacB); кластер 3 (LacC); кластер 4 (LacD). Лакказа LacE не входила ни в один из этих кластеров. Установлено, что гетерогенность внутри лакказного семейства гриба *T. hirsuta* выше, чем гетерогенность между его членами и лакказами других представителей рода *Trametes*. Полученные данные подтверждают предположение о том, что лакказы, составляющие мультигенные семейства у грибов рода *Trametes*, обладают не только различными биохимическими и каталитическими свойствами, но и дифференциальной регуляцией экспрессии, и, как следствие, выполняют различные физиологические роли на разных стадиях развития гриба, а также при воздействии различных биотических и абиотических факторов.

Публикации

1. Vasina D.V., Mustafaev O.N., Moiseenko K.V., Sadovskaya N.S., Glazunova O.A., Tyurin A.A., Fedorova T.V., Pavlov A.R., Tyazhelova T.V., Goldenkova-Pavlova I.V., Koroleva O.V. The *Trametes hirsuta* 072 laccase multigene family: genes identification and transcriptional analysis under copper ions induction. *Biochimie*. 2015. Vol. 116. P. 154–164. doi: 10.1016/j.biochi.2015.07.015.
2. Andrey R Pavlov, Tatiana V Tyazhelova, Konstantin V Moiseenko, Daria V. Vasina, Olga V Mosunova, Tatiana V Fedorova, Lilya G Maloshenok, Elena O Landesman, Sergei A Bruskin, Nadezhda V Psurtseva, Alexei I Slesarev, Sergei Kozyavkin, Olga V Koroleva. Draft Genome Sequence of the Fungus *Trametes hirsuta* 072. *ASM, Genome Announcements*. 2015, Volume 3(Issue 6) e01287-15. doi: 10.1128/genomeA.01287-15
3. Мосунова О.В., Васина Д.В., Тяжелова Т.В., Ландесман Е.О., Королева О.В. «Получение протопластов гриба *T. hirsuta* 072 и изучение влияния антиоксидантов на их формирование и регенерацию» *Прикладная биохимия и микробиология*. №3, 2016.