

Главный редактор	Дебабов Владимир Георгиевич , акад. РАН, проф., науч. рук. НИЦ «Курчатовский институт» – ГосНИИГенетика
Зам. главного редактора	Тоневицкий Александр Григорьевич , чл.-корр. РАН, проф., зав. лаб., НИИ общей патологии и патофизиологии РАН, науч. рук. НТЦ «Биоликсум»
Ответственный секретарь	Гордон Ирина Осиповна , к.б.н., редакционно-издательский отдел НИЦ «Курчатовский институт» – ГосНИИГенетика
Зав. редакцией	Худякова Алла Викторовна

Редакционная коллегия:

Аблаев Алексей Равильевич, к.т.н., рук. дирекции по коммерциализации НИЦ «Курчатовский институт» – ГосНИИГенетика

Бебуров Михаил Юрьевич, к.б.н., зам. директора НИЦ «Курчатовский институт» – ГосНИИГенетика, Москва

Боронин Александр Михайлович, чл.-корр. РАН, проф., зав. отд., Института биохимии и физиологии микроорганизмов им. Скрябина РАН, Пущино

Galperin Michael Yu., Ph.D, Lead Scientist, NCBI, NLM, National Institute of Health, Bethesda, Maryland, USA

Глазунов Александр Викторович, д.б.н., зав. лаб., НИЦ «Курчатовский институт» – ГосНИИГенетика, Москва

Костров Сергей Владимирович, чл.-корр. РАН, проф., директор Института молекулярной генетики РАН, Москва

Машко Сергей Владимирович, д.б.н., проф., науч. рук. российско-японского совместного предприятия «Институт Аджиното-Генетика», Москва-Токио

Мирошников Анатолий Иванович, акад. РАН, науч. рук. направления «Биоинженерия» Института биоорганической химии им. Шемякина и Овчинникова РАН, Москва

Носов Александр Михайлович, д.б.н., проф., зав. каф. биологического факультета МГУ им. Ломоносова, зав. отд., Институт физиологии растений им. Тимирязева РАН, Москва

Скрябин Константин Георгиевич, акад., проф., науч. рук., Институт биоинженерии ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, Москва

Strongin Alexander Ya. prof., Infectious and Inflammatory Diseases Center / NCI-Designated Cancer Center, Sanford Burnham Prebys Medical Discovery Institute (SBP), La Jolla, USA

Швец Виталий Иванович, акад., проф., Институт тонкой химической технологии, Москва

Адрес редакции: 117545 Москва, 1-й Дорожный проезд, дом 1
Телефон: +7 (495) 315-08-01
e-mail: editor@genetika.ru
www.biotechnology-journal.ru

БИОТЕХНОЛОГИЯ

ТЕОРЕТИЧЕСКИЙ И НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ СПЕЦВЫПУСК, 2018

Издается с мая 1985 г.

Выходит 6 раз в год

Москва

СОДЕРЖАНИЕ

Устные доклады

Секция 1 Структура и функции геномов микроорганизмов

Системная компьютерная биология и биоинформатика: моделирование и компьютерный дизайн экспериментов по созданию штаммов с целевыми свойствами	11
<u>Колчанов Н.А.</u> , Пельтек С.Е., А.С. Розанов, С.А. Лашин	
Биоинформатика микробиома	12
Лапидус А.Л.	
Анализ экспериментальных данных для определения участков ДНК, связывающих регуляторные белки	14
Воронцов И.Е., Кулаковский И.В., Медведева Ю.А., Колпаков Ф.А., Евшин И.С., <u>Макеев В.Ю.</u>	
Антирестрикционные белки семейства Argd: структура, функции и механизмы действия	16
<u>Мелькина О.Е.</u> , Котова В.Ю., Балабанов В.П., Завильгельский Г.Б.	
Геномика как инструмент изучения некультивируемых микроорганизмов	18
Марданов А.В., Кадников В.В., <u>Равин Н.В.</u>	

Секция 2 Метаболическая инженерия суперпродуцентов клеточных метаболитов (аминокислоты, органические кислоты, витамины)

Метаболическая инженерия <i>E.coli</i> для продукции промышленно значимых четырехуглеродных дикарбоновых кислот	20
<u>Гулевич А.Ю.</u> , Скороходова А.Ю., Дебабов В.Г.	

Метаболическая инженерия стероид-трансформирующих штаммов актинобактерий и новые биопроцессы для фарминдустрии	21
<u>Донова М.В.</u> , <u>Стрижов Н.И.</u> , <u>Довбня Д.В.</u> , <u>Карпов М.В.</u> , <u>Фокина В.В.</u> , <u>Брагин Е.Ю.</u> , <u>Ивашина Т.В.</u>	
Современные подходы к оптимизации транспорта метаболитов из клетки	22
<u>Лившиц В.А.</u>	
Возможный механизм модуляции действия рибопереключателей у прокариот	24
<u>Мионов А.С.</u> , <u>Тимковский А.Л.</u>	
Структурные принципы координации транскрипции и репарации ДНК у бактерий	25
<u>Прошкин С.А.</u> , <u>Мионов А.С.</u>	
Комбинирование новых и традиционных подходов метаболической инженерии для микробной продукции канонических аминокислот и схожих соединений	26
<u>Стойнова Н.В.</u> , <u>Альтман И.Б.</u> , <u>Гераскина Н.В.</u> , <u>Горшкова Н.В.</u> , <u>Закатаева Н.П.</u> , <u>Иголина О.Н.</u> , <u>Козаева Е.</u> , <u>Крамор Р.В.</u> , <u>Крылов А.А.</u> , <u>Малых Е.А.</u> , <u>Машко С.В.</u> , <u>Птицын Л.Р.</u> , <u>Саврасова Е.А.</u> , <u>Самсонов В.В.</u> , <u>Смирнов С.В.</u> , <u>Сычева Е.В.</u> , <u>Токмакова И.Л.</u> , <u>Ямпольская Т.А.</u>	

Секция 3 Методы редактирования геномов микроорганизмов

Совершенствование методов редактирования генома <i>Escherichia coli</i> с использованием системы гомологичной рекомбинации λRed	28
<u>Бубнов Д.М.</u> , <u>Юзбашев Т.В.</u> , <u>Синеокий С.П.</u>	
Синтетическая биология - от геной инженерии к инженерной биологии	30
<u>Патрушев М.В.</u>	
Природное разнообразие CRISPR Cas систем и их использование для редактирования геномов	32
<u>Федорова Я.В.</u>	
Направленное изменение внутриклеточных потоков углерода с помощью редактирования генома для решения задач метаболической инженерии	34
<u>Голубева Л.И.</u> , <u>Крылов А.А.</u> , <u>Машко С.В.</u>	

Секция 4 Биокатализ. Промышленная ферментация

Скрининговые технологии для создания биокатализаторов de novo	36
<u>Габибов А.Г.</u>	
Биокаталитические технологии синтеза акриловых мономеров	37
<u>Лавров К.В.</u> , <u>Яненко А.С.</u>	
HTS-технологии получения ферментных препаратов	38
<u>Лисов А.В.</u> , <u>Белова О.В.</u> , <u>Лисова З.А.</u> , <u>Самойленко В.А.</u> , <u>Андреева-Ковалевская Ж.И.</u> , <u>Захарова М.В.</u> , <u>Шадрин А.М.</u> , <u>Леонтьевский А.А.</u>	

Инженерия практически значимых ферментов	39
<u>Тишков В.И., Пометун А.А., Атрошенко Д.Л., Зарубина С.А., Бойко К.М., Степашкина А.В., Чубарь Т.А., Савин С.С.</u>	

Секция 5 Микробные ассоциации (микробиомы человека и животных, микроценозы ризосферы)

Плазмиды бактерий рода <i>Pseudomonas</i>	41
Боронин А.М.	
Эволюция бактериального генома в системе симбиоза	42
<u>Проворов Н.А., Тихонович И.А., Е.Е. Андронов Е.Е.</u>	

Стендовые сообщения

Секция 1 Структура и функции геномов микроорганизмов

Метакрилатредуктазы анаэробных бактерий	45
<u>Архипова О.В., Хохлова Г.В., Микулинская Г.В.</u>	
Структура и регуляция экспрессии <i>lux</i>-оперона морских светящихся психрофильных бактерий <i>Aliivibrio logei</i>	46
Манухов И.В., Мелькина О.Е., Хрульнова С.А., Завильгельский Г.Б.	
Филогенетический анализ бета-галактозидаз LAC аскомицетовых дрожжей	47
Наумова Е.С., <u>Лютлова Л.В.</u> , Шнырёва А.В., Наумов Г.И.	
Филогенетический анализ α-глюкозидаз MAL и IMA аскомицетовых дрожжей <i>Saccharomyces cerevisiae</i>, <i>Lachancea</i> и <i>Kluveromyces</i>	48
Наумова Е.С., <u>Боровкова А.Н.</u> , Шнырёва А.В., Наумов Г.И.	
Молекулярно-генетические особенности пектиназных генов <i>PGU</i> дрожжей <i>Saccharomyces bayanus</i>	49
<u>Наумова Е.С.</u> , Шаламитский М.Ю., Наумов Г.И.	
Гемолизин II <i>Bacillus cereus</i>	50
<u>Солонин А.С.</u> , Ковалевская Ж.И., Нагель А.С., Сиунов А.В., Бударина Ж.И.	
Регуляция гена гемолизина II <i>Bacillus cereus</i>	51
<u>Солонин А.С.</u> , Ковалевская Ж.И., Шадрин А.М., Нагель А.С., Сиунов А.В., Бударина Ж.И.	
Поиск новых генов <i>Escherichia coli</i>, участвующих в транспорте L-треонина, и изучение их влияния на уровень продукции L-треонина	52
<u>Выборная Т.В.</u> , Мокрова С.С., Юзбашев Т.В.	

Секция 2 Метаболическая инженерия суперпродуцентов клеточных метаболитов (аминокислоты, органические кислоты, витамины)

Резюме метаболической инженерии продуцента фенилаланина <i>Escherichia coli</i>	54
<u>Дорошенко В.Г.</u> , Машко С.В.	
Анализ метаболических потоков в штаммах <i>E. coli</i>, основанный на ГХ-МС измерении распределения ¹³С изотопов в протеиногенных аминокислотах, РНК и гликогене	55
<u>Ковалева Е.С.</u> , Шепелин Д.Д., Голубева Л.И., Бабошин М.А., Шуплецов М.С., Машко С.В.	
Программные средства для построения и анализа сложных моделей микробного метаболизма и микробных сообществ	56
<u>Лашин С.А.</u> , Матушкин Ю.Г., Клименко А.И., Афонников Д.А., Казанцев Ф.В., Лихошвай В.А., Мустафин З.С., Колчанов Н.А.	
Направленная регуляция активности промотора нитрилгидратазы в экспрессионной системе в бактериях <i>Rhodococcus rhodochrous</i>	57
<u>Шемякина А.О.</u> , Гречишникова Е.Г., Новиков А.Д., Калинина Т.А., Лавров К.В., Глазунов А.В., Яненко А.С.	
Использование коринебактериальных штаммов–продуцентов лизина как платформы для создания продуцентов разветвлённых аминокислот	58
<u>Шереметьева М.Е.</u> , Ануфриев К.Э., Каменева С.В., Яненко А.С.	
Микробиологический синтез молочной кислоты кислотоустойчивыми дрожжами <i>Schizosaccharomyces pombe</i> при низких значениях pH	59
Шутов А.В., Фёдоров А.С., Синеокий С.П.	

Секция 3 Методы редактирования геномов микроорганизмов

Адаптация метода интеграции рекомбинантной ДНК в бактериальную хромосому факультативного метилотрофа <i>Methylobacterium extorquens</i> AM1	61
<u>Горшкова Н.В.</u> , <u>Плеханова Н.С.</u> , Лобанова Ю.С., Токмакова И.Л., Стойнова Н.В., Машко С.В.	
Свойства ДНК-геликазы, кодируемой геном <i>uvrD Deinococcus radiodurans</i> R1, при клонировании в клетках <i>Escherichia coli</i> K-12	62
Гулевич Е.П., Кузнецова Л.В., Киль Ю.В., <u>Вербенко В.Н.</u>	
Редактирование генома микроводоросли <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> с использованием технологии CRISPR-Cas9	63
<u>Сизова И.А.</u> , Kelterborn S., Hegemann P., Вербенко В.Н.	
Разработка системы редактирования генома <i>Corynebacterium glutamicum</i> и её использование для создания штаммов, обладающих сверхпродукцией L-лизина	64
<u>Шустикова Т.Е.</u> , Леонова Т.Е., Калинина Т.И., Токмакова И.П., Герасимова Т.В., Дербигов Д.Д., Рябченко Л.Е., Каменева С.В., Яненко А.С.	

Секция 4 Биокатализ. Промышленная ферментация

Рациональное конструирование металло-карбоксипептидазы Т с измененной селективностью	66
<u>Акпаров В.Х., Тимофеев В.И., Халиуллин И.Г., Константинова Г.Е., Ракитина Т.В., Подшивалов Д.Д., Швядас В.К.</u>	
Получение L-лактатоксидазы из дрожжей <i>Yarrowia lipolytica</i> в биореакторах	67
<u>Бирюкова Е.Н., Аринбасарова А.Ю., Меденцев А.Г.</u>	
Новая эндо-1,3(4)-β-глюканаза из бактерий <i>Paenibacillus jamilae</i> Bg1	68
<u>Борщевская Л.Н., Гордеева Т.Л., Калинина А.Н., Синеокий С.П., Федоров А.С.</u>	
Новая эндо-1,4-ксиланаза из бактерий <i>Bacillus pumilus</i> XylPum41	69
<u>Калинина А.Н., Борщевская Л.Н., Гордеева Т.Л., Синеокий С.П.</u>	
Lux-биосенсоры для исследования активности шаперонов в клетках <i>Bacillus subtilis</i>	70
<u>Гнучих Е.Ю., Кесенних А.Г., Завильгельский Г.Б., Манухов И.В.</u>	
Структурно-функциональные особенности бактериолитических белков Л1 и Л5 <i>Lysobacter</i> sp. XL1	72
<u>Кудрякова И.В., Габдулхаков А.Г., Тищенко С.В., Сузина Н.Е., Шишкова Н.А., Цфасман И.М., Афошин А.С., Васильева Н.В.</u>	
Каталитические и антимикробные свойства L,D-пептидогликангидролаз бактериофагов T5, RB43, RB49	73
<u>Микулинская Г.В., Чернышов С.В., Шадрин В.С., Шаврина М.С.</u>	
Новые эндо-ксилоглюканаза и лихеназо-подобная эндо-(1,4)-β-глюканаза из <i>Aspergillus cervinus</i>: изоляция генов, гетерологичная экспрессия и биохимическая характеристика	74
<u>Рыков С.В., Березина О.В., Корнбергер П., Херлет Дж., Цурин Н.В., Зверлов В.В., Яроцкий С.В.</u>	
Точечные мутации в глюкансвязывающем домене глюкансукразы штамма NRRL B512-F вызывают нарушение связывания с декстраном G-75 и замедление подвижности в условиях электрофореза в ПААГ	75
<u>Пручковский Д.А., Чеперегин С.Э., Козлов Д.Г.</u>	
Выделение, очистка и характеристика внутриклеточной аминокластазы <i>Escherichia coli</i>	76
<u>Епремян А.С., Епремян А.Р.</u>	
Клонирование и первичная характеристика новой бета-галактозидазы из гипертермофильного археона	77
<u>Сергеев В.Р., Горбунов Н.И., Киль Ю.В., Рычков Г.Н.</u>	
Разработка биокаталитического метода синтеза цефазолина	78
<u>Скляренко А.В., Сидоренко А.И., Яроцкий С.В.</u>	
Получение высокоактивных вариантов рекомбинантной фосфолипазы A₂ <i>Streptomyces violaceoruber</i> в дрожжах	79
<u>Чеперегин С.Э., Санникова Е.П., Малышева А.В., Клебанов Ф.А., Глазунов А.В., Козлов Д.Г.</u>	

Секция 5 Микробные ассоциации (микробиомы человека и животных, микроценозы ризосферы), биотехнология открытых систем

Разнообразие прокариот и эукариотических микроорганизмов в кислых шахтных дренажных водах	81
<u>Груздев Е.В.</u> , Кадников В.В., Белецкий А.В., Марданов А.В., Равин Н.В.	
Частота встречаемости микрофлоры в организме человека в условиях Кольского Севера.	82
<u>Завадская Т.С.</u> , Михайлов Р.Е., Белишева Н.К.	
Влияние факела попутного газа на биологические свойства верхнего слоя почвы	83
<u>Квиткина А.К.</u> , Журавлева А.И., <u>Дударева Д.М.</u>	
Определение биodeградативного потенциала новых почвенных штаммов-деструкторов поллютантов	84
<u>Поливцева В.Н.</u> , Борзова О.В., Присяжная Н.В., Сузина Н.Е., Соляникова И.П.	
Микробный метаболизм природных и синтетических органофосфонатов: практическая значимость и роль в глобальном круговороте фосфора	85
<u>Свиридов А.В.</u> , Шушкова Т.В., Ермакова И.Т., Эпиктетов Д.О., Леонтьевский А.А.	
Ассоциации плазмидосодержащих штаммов для очистки нефтезагрязненных территорий	86
<u>Фунтикова Т.В.</u> , Валентович Л.Н., Захарова М.В., Пунтус И.Ф., Филонов А.Е.	

Секция 6 Биофармацевтика

Разработка методик выделения рекомбинантных белков медицинского назначения	88
<u>Асраркулова А.С.</u> , Коваленко А.О.	
Антистафилококковая β-литическая протеаза <i>Lysobacter capsici</i>	89
<u>Афошин А.С.</u> , Кудрякова И.В., Торопыгин И.Ю., Васильева Н.В.	
Препараты на основе синтетических пептидов для экстренной и профилактической медицины	90
Воюшина Т.Л., Дубовская С.И., Котлова Е.К., Яроцкий С.В.	
Изучение стабильности кристаллов и растворов акадезина при хранении	91
<u>Куваев Т.А.</u> , Антонова С.В., Демина Н.Г., Румянцева Н.Ф.	
Создание лекарственного препарата на основе литического фермента бактериофага для лечения глазных инфекций	92
<u>Свиридов Б.В.</u> , Горбань Е.А., Дворянчикова Т.К., Коваленко А.О., Яроцкий С.В.	

Секция 7 Другая тематика

Исследование влияния гипогеомагнитных полей на биологические объекты	95
<u>Беликова Ю. А.</u> , Васильева О. В., Песков Т.В.	
Микроорганизмы – от антибиотиков до наночастиц	96
<u>Воейкова Т.А.</u> , Журавлева О.А., Булушова Н.В., Вейко В.П., Исмагулова Т.Т., Лупанова Т.Н., Лобастов С.Л., Дебабов В.Г.	
Кодоны не для белков: сдвиг предпочтений аминокислот и кодонов в районах промоторов и сайтов связывания транскрипционных факторов нужен для их электростатических свойств	97
Осипов А.А.	
Нетермическое воздействие терагерцового излучения на генетические системы микроорганизмов	98
<u>Пельтек С.Е.</u> , Брянская А.В., Банникова С.В., Горячковская Т.Н., Демидова Е.В., Демидов Е.А., Мещерякова И.А., Розанов А.С., Старостин К.В., Слынько Н.М., Уварова Ю.Е., Шеховцов С.В., Колчанов Н.А., Винокуров Н.А., Попик В.М.	
Разработка тест-систем для диагностики возбудителей бактериозов и микозов овощных культур методом ПЦР	99
Сидоренко А.В., Барейко А.А., Валентович Л.Н., Купцов В.Н., Пилипчук Т.А., Титок М.А., Коломиец Э.И.	
Бактерицидные покрытия для изделий медицинского назначения	100
<u>Шишкова М.Л.</u> , Васильев А.Ф.	

УСТНЫЕ ДОКЛАДЫ

Секция 1

Структура и функции геномов микроорганизмов

Системная компьютерная биология и биоинформатика: моделирование и компьютерный дизайн экспериментов по созданию штаммов с целевыми свойствами

Колчанов Н.А.^{1,2,*}, Пельтек С.Е.¹, Розанов А.С.¹, Лашин С.А.^{1,2}

¹ Федеральный исследовательский центр институт цитологии и генетики СО РАН,
г. Новосибирск, пр. Академика Лаврентьева 10

² Новосибирский Государственный Университет, г. Новосибирск, ул. Пирогова 1.
e-mail: kol@bionet.nsc.ru

doi: 10.21519/0234-2758-2018-S-11-11

В докладе приводится обзор классических и современных методов и подходов к моделированию метаболизма и генетической регуляции микроорганизмов – прокариот, одноклеточных эукариот и вирусов. Стартовав в 50-60-е годы XX столетия с моделей отдельных метаболических систем и систем генетической регуляции, математическое, а теперь и компьютерное моделирование сделало огромный шаг вперед – не так давно построены первые полногеномные модели микроорганизмов, обладающие предсказательной силой. В частности, модель *Mycoplasma genitalium*, опубликованная Джонатаном Карром и коллегами, позволяет предсказывать фенотипические проявления у бактериальных клеток в разных условиях культивирования, а также при внесении различных генетических модификаций. Увеличение вычислительных мощностей компьютеров привело к развитию методов агентного моделирования в биологии, в частности, в микробиологии. С помощью агентного подхода можно моделировать отдельные ансамбли и целые сообщества микроорганизмов, их развитие и эволюцию.

Также в докладе приведен пример моделирования экспериментов по созданию штаммов с целевыми свойствами на основе нового штамма *Geobacillus stearothermophilus*, выделенного из термального источника Гарга Байкальской рифтовой зоны, для которых была выполнена экспериментальная проверка. В геноме ранее не изученных штаммов *Geobacillus stearothermofillus* (линии 22 и 53) были обнаружены гены белков гемицеллюлазного комплекса, которые затем были клонированы в *E.coli*. Получены белковые препараты гемицеллюлазного комплекса и изучены их свойства. Впервые проведено исследование влияния ионных жидкостей на свойства эндо-1,4-β-ксилазазы и ксилан-1,4-β-ксилозидазы *Geobacillus stearothermofillus*. На основе экспериментальных данных построена модель синтеза молочной кислоты этим микроорганизмом. В докладе дано описание результатов компьютерного моделирования генетической системы синтеза молочной кислоты бактерией *Geobacillus stearothermophilus* 22 (VKPM В-11678). По результатам моделирования проведена генетическая модификация генома *Geobacillus stearothermophilus* 22, повысившая выход молочной кислоты на 6 – 8%.

Биоинформатика микробиома

Лapidус А.Л.

Санкт-Петербургский Государственный Университет
Санкт-Петербург, Университетская набережная, д. 7–9
a.lapidus@spbu.ru

doi: 10.21519/0234-2758-2018-S-12-13

Микроорганизмы заселили нашу планету задолго до появления человека. Они обитают везде и влияют на все процессы, происходящие на планете Земля.

Изучение микроорганизмов началось давно и в этой области сделано множество выдающихся открытий. Однако только с появлением современных молекулярно-биологических методов стало возможным глубокое широко-масштабное изучение микробных сообществ, обитающих в различных природных условиях.

При этом производятся огромные объёмы данных, анализ которых невозможен без мощных компьютеров и умных программных продуктов (программ). На помощь пришла наука Биоинформатика и ее раздел Алгоритмическая биоинформатика.

В то время как метагеномное секвенирование стало повсеместно использоваться для анализа бактериальных сообществ, сборка метагеномных данных остается трудной задачей, существенно ограничивающей возможности глубокого биологического анализа процессов, протекающих в естественной среде.

Эти трудности связаны с тем, что:

- глубина покрытия чтениями сильно варьируется между различными видами микроорганизмов в метагеноме;
- присутствуют близкородственные штаммы с похожими, но не идентичными геномами;
- в геномах различных бактериальных видов присутствуют консервативные последовательности.

Также нельзя не отметить, что значительной проблемой при обработке многих метагеномных данных является их размер: данные секвенирования образцов почвы зачастую содержат до миллиарда парных чтений, а длина получаемых сборок превышает сотни Gb.

В Лаборатории "Центр алгоритмической биотехнологии" (ЦАБ) Санкт-Петербургского государственного университета разработан инструмент **metaSPAdes** - новый специализированный сборщик метагеномных данных. metaSPAdes комплексно решает перечисленные выше проблемы сборки метагеномов, объединяя новые алгоритмические идеи и приемы, хорошо зарекомендовавшие себя в более ранних инструментах семейства SPAdes. По независимым оценкам экспертов, metaSPAdes значительно превосходит результаты конкурирующих инструментов.

Сборкой геномов занимаются во множестве лабораторий по всему миру, однако сложность этой задачи не позволяет найти единое оптимальное решение, которое

годились бы для любых типов данных. В связи с этим возникает потребность в сравнении и оценке результатов работы различных программ, созданных многочисленными разработчиками из разных стран. Для решения этой задачи в ЦАБ была создана программа **QUAST**, которая работает с различными типами данных секвенирования. Особенности, метагеномных данных потребовали значительной переработки алгоритмов программы **QUAST**, что привело к появлению программы **MetaQUAST**, представляющей собой расширение для метагеномных данных, которые становятся всё более популярными в исследованиях последних лет.

Основной особенностью метагеномных сборок является то, что они содержат данные сразу о множестве (десятках, сотнях, тысячах) геномов в одном файле. **MetaQUAST** позволяет проанализировать такие данные выполняя выравнивание сразу на несколько референсных геномов (в отличие от традиционного **QUAST**, работающего только с одним референсом). При отсутствии референсных геномов, **MetaQUAST** предпринимает попытки найти их в общедоступной базе NCBI на основе поиска 16S РНК во входных сборках. Визуализация результатов сравнения исследуемых геномныхборок как с референсным геномом, так и между собой осуществляется программным продуктом **Icarus**, так же созданным в лаборатории.

Многие современные метагеномные исследования (например, воды, почвы или кишечной микрофлоры) включают анализ целого ряда похожих образцов, представляющего временную (если сбор образцов происходит из одного источника в разные моменты времени) или пространственную (если сбор образцов происходит из близко расположенных источников) серию. Анализ такого рода данных, в частности, проливает свет на динамику изменений бактериального сообщества и связи между его функциональными и геномными характеристиками.

В лаборатории ведется работа по созданию нового вычислительного протокола **MTS** (Metagenomic Time Series).

Примеры применения созданных в лаборатории программ будут представлены во время выступления.

Анализ экспериментальных данных для определения участков ДНК, связывающих регуляторные белки

Воронцов И.Е.¹, Кулаковский И.В.^{1,2}, Медведева Ю.А.^{1,3,5}, Колпаков Ф.А.⁴,
Евшин И.С.⁴, Макеев В.Ю.^{1,2,5,6,*}

¹ Институт общей генетики РАН им. Н.И. Вавилова, ул. Губкина 3, Москва, 119991

² Институт молекулярной биологии РАН им. В.А. Энгельгардта, ул. Вавилова 32, Москва 119991

³ ФИЦ биотехнологии РАН, Институт биоинженерии РАН, пр-т 60-летия Октября д. 7, корп. 1, Москва 117312

⁴ Институт вычислительных технологий СО РАН, пр-т Академика Лаврентьева, 6, Новосибирск, 630090

⁵ НИЦ «Курчатовский институт» – ГосНИИгенетика, 1-й Дорожный проезд, д. 1, Москва, 117545

⁶ Московский физико-технический институт, Институтский переулок, д. 9., г. Долгопрудный, Московская область, 141701

email: vsevolod.makeev@vigg.ru

doi: 10.21519/0234-2758-2018-S-14-15

Аллельные варианты регуляторных регионов генома являются доминирующим фактором в формировании многих фенотипических признаков. Нуклеотидные замены в регуляторных районах генов могут изменять сродство конкретных участков ДНК к специфически связывающим их факторам транскрипции, что в свою очередь может влиять на экспрессию генов и, следовательно, фенотип. Связывание транскрипционных факторов зависит не только от последовательности нуклеотидов ДНК, но и от ее доступности для связывания белков. У эукариот именно доступность ДНК для связывания регуляторов является главным фактором, определяющим специфическую активность генов в конкретных типах клеток, которая в конечном счете определяет индивидуальные свойства клеточных типов. Учитывая, что в клетке имеются сотни типов транскрипционных факторов (порядка 250 для *E. coli* и порядка 1600 для *H. sapiens*), прямое экспериментальное определение всех участков ДНК, связывающих регуляторные белки конкретных типов, во всех случаях (например, для сотен клеточных типов человека) является нереалистичным.

В своей работе мы разрабатываем методы для вычислительного предсказания участков ДНК, связывающих конкретный регуляторный белок в конкретных условиях, а также для оценки изменений аффинности связывания при точечных заменах нуклеотидов в этих участках. Для решения этих задач анализируются факторы, влияющие на специфическое связывание факторов транскрипции, включая степень доступности хроматина, транскрипционную активность соседних генов, мотивы последовательности сайтов связывания транскрипционных факторов и их кофакторов. Цель состоит в том, чтобы разделить переменные, характеризующие состояние клетки и специфичность связывания фактора транскрипции. Мы обнаружили, что

сравнительная значимость доступности хроматина существенно зависит от клеточного типа и конкретного белка-регулятора. Это затрудняет прогнозирование профиля связывания фактора транскрипции для конкретного типа клеток. Тем не менее, использование современных методов машинного обучения позволяет получить осмысленные предсказания, по крайней мере для наиболее экспериментально изученных регуляторов. Полученная путем таких предсказаний информация о возможном вкладе конкретных нуклеотидных замен в связывание белка – регулятора транскрипции может быть использована для определения приоритетных вариантов, генетически ассоциированных с определенными признаками. Предсказание типа клеток, в которых активен сегмент ДНК, содержащий конкретную регуляторную замену, в свою очередь, может иметь важное значение для идентификации органов, которые в первую очередь поражаются при наследственных патологиях или при соматических мутациях.

Антирестрикционные белки семейства Ard: структура, функции и механизмы действия

Мелькина О.Е.^{*}, Котова В.Ю., Балабанов В.П., Завильгельский Г.Б.

НИЦ «Курчатовский институт» – ГосНИИгенетика, 117545, Москва, 1-й Дорожный пр-д, д. 1,
Лаборатория генетики бактерий

e-mail: compleanno@mail.ru, zavilgel@genetika.ru

doi: 10.21519/0234-2758-2018-S-16-17

В настоящее время известно несколько групп антирестрикционных белков, кодируемых мобильными элементами – плазмидами и транспозонами. Белки ArdA, ArdB, ArdC кодируются генами, расположенными в конъюгативных плазмидах и конъюгативных транспозонах; белок ArdD кодируется геном, расположенным в некоъюгативных транспозонах. Конъюгативные плазмиды и конъюгативные транспозоны содержат гены *ardA*, кодирующие антирестрикционные белки ArdA (открыты Завильгельским Г.Б. и сотр., 1984-1985 гг.). Белки ArdA специфически ингибируют ферменты рестрикции-модификации типа I. Наличие генов *ardA* помогает мобильным элементам преодолевать рестрикционные барьеры и тем самым обеспечивают эффективный «горизонтальный» перенос генов между бактериями различных видов и родов. Белки ArdA относятся к семейству ДНК-мимикрирующих белков.

Белки ArdA представляют собой небольшие (165-170 аминокислотных остатков), очень кислые (суммарный заряд от -25 до -32) полипептиды. В растворе ArdA образует гомодимер, который по форме соответствует биспиральной ДНК размером 42 н.п. с изгибом в интерфейсе (области контакта мономеров). Ингибирующее действие этих белков на ферменты рестрикции-модификации типа I, образуемых из 5 субъединиц ($R_2M_2S_1$), состоит в формировании специфического стехиометрического (2:1) комплекса с ферментом (R - субъединица рестрикции, M - субъединица модификации, S - субъединица, узнающая сайт рестрикции-модификации в ДНК). Ингибирование рестрикции белками ArdA носит конкурентный характер: ДНК вытесняется из комплекса с ферментом полипептидом, пространственная структура которого подобна биспиральной ДНК, и константа диссоциации примерно в 100 раз ниже по сравнению с таковой, характерной для биспиральной ДНК. Белки ArdA в форме гомодимеров формируют комплекс с S-субъединицей (в результате происходит ингибирование как эндонуклеазной, так и метилазной активностей фермента), а в форме мономеров только с R-субъединицами (в результате ингибируется лишь эндонуклеазная активность фермента).

Вторая функция белка ArdA – ингибирование репрессорной активности гистон-подобного белка H-NS. H-NS непосредственно участвует в компактизации бактериальной хромосомы, и входит в группу глобальных регуляторов, репрессирующих транскрипцию нескольких сотен генов в бактериальном геноме, а также регулирующих транспозицию ряда транспозонов. Показано, что в клетках штамма *Escherichia coli hns⁺* транскрипция с H-NS-зависимых промоторов усиливается примерно в 10-100 раз при трансформации клеток плазмидами, содержащими под

арабинозным промотором *araB* гены *ardA*. Показано также, что экспрессия генов с H-NS-зависимым промотором усиливается примерно в 5-10 раз в бактерии-реципиенте в процессе конъюгативного переноса трансмиссивных плазмид ColIb-P9 и pKM101, содержащих ген *ardA*.

Показано, что не-конъюгативные транспозоны *Tn21*, *Tn5053*, *Tn5045*, *Tn501*, *Tn402*, введенные в бактериальную клетку, снижают примерно в 50-100 раз рестрикционную активность ферментов рестрикции-модификации типа I. Ген *ardD*, ответственный за снижение антирестрикционной активности, расположен в опероне транспозиции *tniABQR* внутри гена *tniA* в комплементарной нити. Транскрипция гена *ardD* противоположна транскрипции гена *tniA*. Предполагается, что в результате активности белка ArdD в бактериальной клетке образуется значительное количество немодифицированной ДНК, что вызывает SOS-зависимый эффект ослабления действия фермента EcoKI (R₂M₂S) в связи с ClpXP-индуцируемым протеолизом R-субъединицы.

Публикации:

- 1) Balabanov V.P., Kotova V.Yu., Kholodii G.Y., Mindlin S.Z., Zavilgelsky G.B. A novel gene, *ardD*, determines antirestriction activity of the non-conjugative transposon *Tn5053* and is located antisense with the *tniA* gene. // 2012. FEMS Microbiol Lett. V. 337, P. 55-60.
- 2) Завильгельский Г.Б., Котова В.Ю., Мелькина О.Е., Балабанов В.П., Миндлин С.З. Протеолитический контроль антирестрикционной активности неконъюгативных транспозонов *Tn21*, *Tn5053*, *Tn5045*, *Tn501*, *Tn402*. // 2015. Мол. биол. Т. 49. №2. С. 334-341.
- 3) Olga E. Melkina, Ignatij I. Goryanin, and Gennadii B. Zavilgelsky. The DNA-mimic antirestriction proteins ArdA ColIb-P9, Arn T4, and Ocr T7 as activators of H-NS-dependent gene transcription // 2016. Microbiological Research, V. 192, P. 283-291.
- 4) Olga E. Melkina, Vasilii S. Koval, Alexander A. Ivanov, Alexei L. Zhuze, and Gennadii B. Zavilgelsky. DNA sequence-specific dimeric bisbenzimidazoles DBP(n) and DBPA(n) as inhibitors of H-NS silencing in bacterial cells. // 2018. Microbiological Research. V. 207. P. 75-82.

Геномика как инструмент изучения некультивируемых микроорганизмов

Марданов А.В., Кадников В.В., Равин Н.В.*

Институт биоинженерии, Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН

119071, г. Москва, Ленинский просп. д. 33, стр. 2.

e-mail: nravin@biengi.ac.ru

doi: 10.21519/0234-2758-2018-S-18-18

Микробиология XX века была построена на исследовании чистых культур, что дало представление о разнообразии метаболических путей микроорганизмов, осуществляемых ими биохимических процессах, и их роли в биосфере. С развитием молекулярных методов исследования микроорганизмов стало очевидно, что более 99% микроорганизмов из природных экосистем невозможно культивировать в лабораторных условиях. Так, из примерно 100 известных филумов прокариот около половины не имеют культивируемых представителей. Геномный анализ является основным инструментом для изучения «некультивируемых» микроорганизмов, при этом используется два основных подхода. Первый из них, метагеномика, основан на расшифровке и анализе коллективного генома (метагенома) микробного сообщества. Анализ метагеномных данных с помощью биоинформатики позволяет не только охарактеризовать состав и генетический потенциал сообщества, но и выделить из метагенома геномы отдельных видов микроорганизмов, в том числе и «некультивируемых». Второй подход – выделение из природного микробного сообщества единичных клеток и расшифровка их индивидуальных геномов.

С помощью методов метагеномики мы исследовали микробные сообщества экстремальных экосистем. Объектами исследований были подземные воды Западно-Сибирского региона, залегающие на глубине 2-3 км. Эти экологические ниши характеризуются анаэробными условиями, высоким давлением и повышенной температурой. Анализ метагеномов этих микробных сообществ показал, что во многих случаях среди обнаруженных микроорганизмов менее половины относились к известным видам, а остальные представляли «некультивируемые» группы, часть из них были ранее не известны даже по последовательностям генов 16S рРНК. Анализ метагеномов позволил получить около 50 геномов микроорганизмов, среди которых были представители «некультивируемых» филумов *Aminicenantes*, *Armatimonadetes*, *Riflеbacteria* и BRC1. В результате секвенирования геномов единичных клеток из микробных сообществ подземных термальных вод и донных осадков озера Байкал получены геномы бактерий, представляющих филумы *Aerophobetes*, *Aminicenantes*, *Atribacteria*, *Caldiserica*, *Parcubacteria*, *Microgenometes* и NC10.

Работы коллектива были поддержаны грантом РФФ 14-14-01016.

Секция 2

**Метаболическая инженерия
суперпродуцентов клеточных
метаболитов (аминокислоты,
органические кислоты, витамины)**

Метаболическая инженерия *Escherichia coli* для продукции промышленно значимых четырехуглеродных дикарбоновых кислот

Гулевич А.Ю.* , Скороходова А.Ю., Дебабов В.Г.

НИЦ «Курчатовский институт» – ГосНИИгенетика, 117545, Москва, 1-й Дорожный пр-д, д. 1,
e-mail: gulevich@genetika.ru

doi: 10.21519/0234-2758-2018-S-20-20

Замена веществ, получаемых нефтехимическим синтезом, продуктами микробных биотехнологий является важной частью стратегий устойчивого развития промышленно развитых стран. Среди востребованных продуктов микробиологического синтеза особая роль отводится соединениям, способным служить гибкими “строительными блоками” в последующем синтезе широкого спектра химикатов с высокой добавленной стоимостью, находящих применение в лакокрасочной, текстильной, автомобильной, фармакологической и других отраслях промышленности. Повышенное внимание, в данной связи, привлекают четырехуглеродные дикарбоновые кислоты, в том числе содержащие, помимо карбоксильной, другие функциональные группы. В частности, янтарная, яблочная и фумаровая кислоты, простейшие природные четырехуглеродные дикарбоксилаты, могут быть использованы в качестве замены малеинового и фталевого ангидридов в крупнотоннажном синтезе растворителей, полимеров и пластификаторов, включая 1,4-бутандиол, гамма-бутиролактон, тетрагидрофуран, полибутиленсукцинат и др..

В общем случае, данные кислоты не являются секретируемыми метаболитами известных микроорганизмов. Таким образом, их микробиологический синтез с использованием природных продуцентов затруднен или невозможен. При этом традиционные процессы нефтехимического производства этих продуктов весьма не экологичны, а также ресурсо- и энергозатратны. Вместе с тем, с биохимической точки зрения, перечисленные органические кислоты могут быть рассмотрены как продукты ограниченного числа реакций с участием ключевых интермедиатов центрального метаболизма, а именно щавелевоуксусной кислоты и ацетил-КоА. Более того, соответствующие кислоты являются прямыми интермедиатами одного из консервативных биохимических путей живых организмов - цикла трикарбоновых кислот.

В последние годы значительный прогресс в создании рекомбинантных продуцентов яблочной, фумаровой и янтарной кислот был достигнут в результате направленной метаболической инженерии традиционной для промышленной биотехнологии бактерии *Escherichia coli*. Вместе с тем, при внесении множественных модификаций, в особенности затрагивающих ферменты центральных биохимических путей, в результате выраженного перераспределения потоков углерода в клетках модифицированных штаммов, метаболизм организма зачастую претерпевает значительные и трудно предсказуемые изменения, серьезно осложняющие дальнейшее рациональное конструирование целевых продуцентов. Подобные изменения, связанные, в частности, с активацией латентных метаболических путей и проявлением побочных активностей известных и ранее охарактеризованных ферментов, обуславливают необходимость углубленного изучения особенностей метаболизма множественно модифицированных штаммов промышленно значимых микроорганизмов.

Работа поддержана грантом РФФИ № 16-14-10389.

Метаболическая инженерия стероидтрансформирующих штаммов актинобактерий и новые биопроцессы для фарминдустрии

Доновна М.В.^{*}, Стрижов Н.И., Довбня Д.В., Карпов М.В., Фокина В.В., Брагин Е.Ю., Ивашина Т.В.

Институт биохимии и физиологии микроорганизмов РАН, 142290, Проспект Науки, д. 5, Пущино Московской области; e-mail: donova@ibpm.pushchino.ru

doi: 10.21519/0234-2758-2018-S-21-21

Стероиды представляют собой суперсемейство терпеноидных липидов, широко распространенных в природе, и включающее стерины, желчные кислоты, кортикоиды, минералокортикоиды, сердечные гликозиды, витамин Д и др. Стероиды выполняют важнейшие жизненные функции в организме – от половых гормонов и гормонов коры надпочечников до регуляции нейротрансмиттерных рецепторов. Медицинские препараты на основе стероидов составляют значительный сектор мирового фармацевтического рынка, по общему объему уступая лишь антибиотикам. Год от года растет доля фармсубстанций, произведенных с помощью микробных технологий. Большинство используемых в настоящее время в стероидной биотехнологии промышленных штаммов были получены традиционными методами, основанными на скрининге, физико-химическом мутагенезе и селекции. Новая эра связана с применением метаболической инженерии и рекомбинантных ДНК-технологий для создания высокоактивных промышленных клеточных катализаторов нового поколения, обладающих высокой регио- и стереоспецифичностью.

Фитостерины (смесь растительных стеринов, таких как ситостерин, стигмастерин, кампестерин и др.) являются основными сырьевыми материалами для стероидной фарминдустрии. Биоконверсия фитостеринов актинобактериями, осуществляющими каскад реакций окисления боковой цепи и структурной модификации гонанового ядра, обеспечивает накопление целевых биоактивных стероидов в одну биотехнологическую стадию и при мягких условиях.

На основе геномных исследований и транскриптомного профилирования выявлены специфические гены и кластеры генов стеринтрансформирующих актинобактерий, важные для специфичных реакций структурной модификации стероидов и регуляции метаболических потоков. Полученные данные использованы для создания на основе микобактериальных хозяев новых штаммов с улучшенными биокаталитическими возможностями для получения из фитостеринов андростендиона (АД), 20-гидроксиметилпрегненона и других ценных стероидов и изопреноидов. Дальнейшая оксифункционализация и/или структурная модификация полученных стероидов обеспечивает эффективное получение целого спектра ценных биоактивных стероидов, включая 7(α/β), 9 α , 11 α -гидроксипроизводные АД, дегидро-эпиандростендион и его гидроксильированные аналоги, $\Delta^{5,7}$ -предшественники синтеза витамина Д₃, $\Delta^9(11)$ -дегидростероиды.

На основе гетерологической экспрессии эукариотических белков в микобактериальных хозяевах созданы рекомбинантные штаммы, продуцирующие из фитостерина в одну стадию важные стероидные гормоны тестостерон, прогестерон и их аналоги.

Разработки могут являться основой эффективного многоцелевого производства стероидных гормонов и синтетических стероидов нового поколения.

Работа выполнялась при поддержке РФФИ (Грант 18-14-00361).

Современные подходы к оптимизации транспорта метаболитов из клетки

Лившиц В.А.

ЗАО «Научно-исследовательский институт Аджиномото-Генетика» (ЗАО «АГРИ») 117545, Москва, 1-й Дорожный проезд, д. 1, корп. 1, e-mail: vitaliy_livshits@agri.ru

doi: 10.21519/0234-2758-2018-S-22-23

Исследования транспорта метаболитов – аминокислот из клеток *Escherichia coli* связаны с осуществлением в СССР во ВНИИГенетика работы по созданию штамма-продуцента треонина с использованием методов генетической инженерии. Эта работа проводилась по инициативе и под руководством В.Г. Дебабова. В то время (1980 г.) была получена мутация *thrR23 (rhtA23)*, которая придавала клеткам *E. coli* устойчивость к высоким концентрациям треонина и гомосерина и значительно увеличивала продукцию треонина. В течение последующих 15 лет мы периодически возвращались к изучению природы этой загадочной мутации. Наконец, исследуя последовательности фрагментов хромосомы *E. coli*, амплификация которых сообщала клеткам устойчивость к гомосерину и треонину, мы обнаружили в них гены, один из которых (*rhtB*) имел гомологию с недавно (в 1996 г.) описанным геном *lysE*, кодирующим белок-экспортёр лизина *Corynebacterium glutamicum*. Дальнейшие исследования подтвердили, что оба гена, *rhtA* и *rhtB*, кодируют транспортеры, участвующие в выведении треонина из клетки. Предварительные результаты были доложены и опубликованы в 1997 г. Дальнейшие исследования были продолжены в НИИ Аджиномото-Генетика и привели к обнаружению гена *rhtC*, кодирующего ещё один экспортёр треонина, гена *leuE (yeaS)*, кодирующего экспортёр аминокислот с разветвлённой цепью, гена *yddG*, кодирующего экспортёр ароматических аминокислот. Кроме того, был найден ген *nepl (yicM)* – у *E. coli*, и ген *pbuE (ydhL)* – у *Bacillus*, участвующие в экспорте пуриновых оснований и нуклеозидов.

Если биологическая роль белков-экспортёров токсичных соединений достаточно очевидна, то само существование активного транспорта из клетки ценных метаболитов долгое время казалось невероятным. Однако результаты проведенных в последние десятилетия исследований показали важную роль этого процесса в поддержании клеточного гомеостаза при изменении внешних условий, при стрессах, а также для межклеточного взаимодействия.

В настоящее время оптимизация экспорта метаболита из клетки всё больше становится обязательной манипуляцией в метаболической инженерии штаммов-продуцентов. Вопрос заключается в выявлении, оптимизации, а в некоторых случаях – инженерии соответствующих экспортёров. Среди подходов к решению этой задачи, актуальным остаётся использованный нами метод, основанный на осознании сходства экспортёров метаболитов с экспортёрами антибиотиков и других вредных веществ. Если целевое соединение или его структурный аналог токсичны для клеток и подавляют их рост, то повышение экспрессии соответствующих генов экспортёров придаст к ним устойчивость. Например, вводя в клетки плазмиды, содержащие фрагменты хромосомы, и высевая их на среды, содержащие подходящие концентрации

ингибитора, среди устойчивых клонов могут быть найдены те, которые несут ген экспортёра данного соединения. Причём, источником генетического материала может быть любой организм. Другой метод идентификации подходящих генов экспортёров, также впервые применённый нами, заключается в поиске устойчивых клонов после введения плазмид, содержащих гены белков-гомологов из семейства транспортёров, или даже гены не известных мембранных белков. При этом можно воспользоваться соответствующими базами данных. Описаны пути поиска генов транспортёров, противоположные первым двум. Например, с помощью транспозонного мутагенеза сначала получают чувствительные к целевому субстрату мутанты, в которых определяют участок внедрения транспозона. Среди тех, что кодируют мембранные белки, находят гены экспортёров. В случае аминокислот с этой целью в качестве ингибиторов используют пептиды, содержащие целевую аминокислоту. При поступлении в клетки мутанта они расщепляются и создают концентрацию аминокислоты, подавляющую рост. Следует отметить, что эти методы не являются селективными, а потому более трудоёмкие, чем предложенные нами. Они могут применяться более эффективно, если имеется геномная коллекция инактивированных генов, типа Keio -коллекции для *E. coli*. Недавно была получена геномная коллекция инактивированных генов и для *Bacillus subtilis*. Кроме того, в таком поиске можно использовать биосенсоры на основе соответствующих регуляторных белков, или аптамеров, которые реагируют на концентрацию целевого метаболита в клетке.

Новые перспективы для поиска и идентификации транспортёров открывает применение геномных технологий. Геномное секвенирование имеет особое значение для новых микроорганизмов, вовлекаемых в метаболическую инженерию продуцентов. Оно открывает доступ к генам мембранных белков, среди которых можно найти ортологи известных экспортёров. В случае продуцентов антибиотиков соседство генов мембранных белков с генами, определяющими их синтез, может указывать на их экспортную функцию. Сравнительное транскриптомное профилирование позволяет выявить гены, экспрессия которых повышается в ответ на добавление в среду целевого метаболита – среди них могут быть гены, обеспечивающие его экспорт.

Избыточный синтез мембранных белков негативно влияет на жизнеспособность клеток. С другой стороны, экспортёр может себя не проявить в должной степени, если его мало. Поэтому в каждом случае следует оптимизировать уровень экспрессии соответствующих генов с помощью известных методов.

Необходимость и возможность изменения субстратной специфичности белков-экспортёров связана с изначальной широкой специфичностью многих из них. Поэтому наряду с целевым метаболитом они могут выводить из клетки другие соединения, в том числе, необходимые для роста культуры. Этот негативный эффект на жизнеспособность клеток может сочетаться с накоплением побочных метаболитов, затрудняющих выделение и очистку целевого продукта. Для придания экспортёру наибольшего сродства к определённому метаболиту могут применяться различные методы белковой инженерии. Многообещающим представляется подход, связанный с использованием метода направленной эволюции. Вместе с высокопроизводительным скринингом он может обеспечить быструю нужную модификацию белков-экспортёров для успешной метаболической инженерии промышленных штаммов-продуцентов.

Возможный механизм модуляции действия рибопереключателей у прокариот

Миронов А.С.^{1,2}, Тимковский А.Л.^{3,4,*}

¹ Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта, 119991, Москва, ул. Вавилова, д.32.

² НИЦ «Курчатовский институт» – ГосНИИгенетика, 117545, Москва, 1-й Дорожный пр-д, д. 1.

³ НИЦ «Курчатовский институт» - ПИЯФ им. Б.П. Константинова, 188300, Ленинградская обл., г. Гатчина, мкр Орлова Роща, д. 1.

⁴ Институт высокомолекулярных соединений РАН, 199004, Санкт-Петербург, В.О., Большой пр., д. 31

e-mail: altim1938@yandex.ru

doi: 10.21519/0234-2758-2018-S-24-25

Наличие в клетках *Bacillus subtilis* механизма регуляции транскрипции генов рибопереключателем было доказано 16 лет назад (Mironov A.S., Gusarov I., Rafikov R., Errais L.L., Shatalin K., Kreneva R.A., Perumov D.A., Nudler E. // *Cell*. 2002. V.111. P. 747-756). Было показано также, что такой тип регуляции характерен не только для *gib*-оперона, но и для других участков генома *B. subtilis* (Склярова С.А., Миронов А.С. // *Генетика*. 2014. Т. 50, № 3. С. 1-5). Но для *gib*-оперона ситуация парадоксальна. Он содержит 4 гена, 3 из которых кодируют ферменты, осуществляющие синтез и преобразование предшественников рибофлавина, а 4-й ген, *gibT*, вроде бы не играет роли в синтезе рибофлавина. При этом оперон содержит основной промотор P1 и два дополнительных внутренних промотора P2 и P3, причём P3 – промотор именно для *gibT*. Все промоторы различаются по функциональной активности (Склярова С.А., Кренева Р.А., Перумов Д.А., Миронов А.С. // *Генетика*. 2012. Т. 48. № 10. С. 1–9). Однако транскрипция всего *gib*-оперона (в том числе и гена *gibT*) идёт под контролем основного промотора P1, и все элементы этого оперона транскрибируются согласованно в полицистронную мРНК (Mironov V.N., Kraev A.S., Chikindas M.L., Chernov B.K., Stepanov A.L., Skryabin K.G. // *Mol. Gen. Genet.* 1994. V. 242. № 2. P. 201–208). При этом транскрипция регулируется флавином, изменяющими вторичную структуру сенсорной мРНК. Приходится предположить, что продукт гена *gibT* каким-то образом модулирует процесс транскрипции всего *gib*-оперона, иначе его наличие в опероне не выглядит логичным. На основании предыдущих этапов работы Д.А. Перумов высказал ранее предположение, что белок RibT является ацетилтрансферазой, которая может осуществлять в клетке ацетильное восстановление синтезированных флавинов. Это препятствует взаимодействию флавинов с сенсорной мРНК и способствует продолжению активной транскрипции. Основанием для такого предположения служат данные о том, что именно окисленные флавины способны взаимодействовать с лидерной последовательностью РНК-транскрипта (Serganov A., Huang L., Patel D.J. *Coenzyme recognition and gene regulation by a flavin mononucleotide riboswitch*. // *Nature*. 2009. V. 458. P. 233-237). Ацетильное восстановление снижает концентрацию активных (окисленных) флавинов и способствует поддержанию высокого уровня экспрессии оперона. Предложенная нами в предыдущей работе теоретическая структура белка RibT (Якимов А.П., Серегина Т.А., Холодняк А.А.,

Кренева Р.А., Миронов А.С., Перумов Д.А., Тимковский А.Л. // *Acta Naturae*. 2014. Т. 6, № 3. С. 66-69) не противоречит такой гипотезе. Экспериментальная проверка этого предположения сопряжена со значительными трудностями, но сможет стать доказательством наличия вспомогательного механизма в процессе регуляции транскрипции рибопереключателем, обеспечивающего коррекцию внутриклеточной концентрации активных эффекторов. Это будет способствовать пониманию механизмов поддержания клеточного гомеостаза и совершенствованию суперпродукторов жизненно важного витамина рибофлавина.

Структурные принципы координации транскрипции и репарации ДНК у бактерий

Прошкин С.А.¹, Миронов А.С.^{1,2,*}

¹ Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, 119991 Москва, ул. Вавилова, 32.

² НИЦ «Курчатовский институт» – ГосНИИгенетика, 117545, Москва, 1-й Дорожный пр-д., д. 1.

e-mail: alexmir_98@yahoo.com

doi: 10.21519/0234-2758-2018-S-25-25

Недавно мы предложили новый механизм координации транскрипции и репарации ДНК (TCR) у бактерий. В его основе лежит возвратное смещение элонгационного комплекса РНК-полимеразы (РНКП) против хода транскрипции (backtracking) от поврежденного сайта ДНК. Центральная роль в этом механизме принадлежит хеликазе/транслоказе UvrD, которая стимулирует откат РНК-полимеразы. Элонгационный фактор NusA и сигнальная молекула гуанозин-5',3'-тетрафосфат (ppGpp) с белковым кофактором DksA содействуют UvrD в смещении РНК-полимеразы. Привлечение структурных, биохимических и генетических подходов позволило описать взаимодействия в комплексе TCR и определить последовательность событий в эксцизионной репарации нуклеотидов. Мономер UvrD связан с элонгационным комплексом РНК-полимеразы в нормальных условиях роста клеток. В ответ на генотоксичный стресс в клетке временно повышается уровень ppGpp, а к комплексу РНКП-NusA-UvrD привлекается вторая субъединица UvrD с образованием каталитически активного димера UvrD, который стимулирует смещение РНК-полимеразы от поврежденного участка ДНК. К элонгационному комплексу последовательно привлекаются белки репарации ДНК. Нарушение взаимодействия UvrD с РНК-полимеразой, затрагивающее механизм отката элонгационного комплекса, значительно снижает эффективность эксцизионной репарации нуклеотидов *in vivo*.

Комбинирование новых и традиционных подходов метаболической инженерии для микробной продукции канонических аминокислот и схожих соединений

Стойнова Н.В.* , Альтман И.Б., Гераскина Н.В., Горшкова Н.В., Закатаева Н.П., Игоница О.Н., Козаева Е., Крамор Р.В., Крылов А.А., Малых Е.А., Машко С.В., Птицын Л.Р., Саврасова Е.А., Самсонов В.В., Смирнов С.В., Сычева Е.В., Токмакова И.Л., Ямпольская Т.А.

Научно-исследовательский институт Аджиномото-Генетика (ЗАО «АГРИ»),
117545, Москва, 1-й Дорожный пр-д, д. 1, кор. 1, e-mail: nataliya_stoynova@agri.ru.

doi: 10.21519/0234-2758-2018-S-26

Метаболическая инженерия бактерий, направленная на изменение ферментативных реакций и транспортных систем для получения значимых целевых соединений включает ряд общих подходов, основанных на фундаментальных знаниях о функционировании клеток. Среди важнейших этапов развития метаболической инженерии можно выделить (i) традиционную селекцию; (ii) направленную и рандомную модификацию метаболических путей посредством генно-инженерных манипуляций, основанную на информации, полученной средствами системной биологии и (iii) широкое внедрение подходов синтетической биологии, позволяющее расширить круг используемых субстратов и метаболических путей, что делает более эффективным микробный синтез как природных, так и неприродных соединений. В настоящей работе рассматриваются отдельные подходы, использованные для селекции штаммов – продуцентов L-аминокислот и структурно сходных соединений. Так, особое внимание уделяется (i) инструментам геномного редактирования, разработанным на основе рекомбинационных систем бактериофагов и адаптированных для широко используемых в биотехнологии объектов – *Escherichia coli*, *Corynebacterium glutamicum*, *Methylophilis methylotrophus* и *Bacillus amyloliquefaciens*; (ii) конструированию искусственных автоиндуцибельных метаболически регулируемых экспрессионных систем на примере синтеза разветвленных аминокислот; (iii) идентификации скрытых («underground»), метаболических путей на примере биосинтеза L-изолейцина; (iv) перенаправления потоков углерода в клетке в процессе культивирования путем tmRNA-опосредованного, протеолиза ключевых ферментов биосинтеза, а также условного сайленсинга генов; (v) кофакторной инженерии на примере NADH оксидоредуктазного комплекса I и глицеральдегид-3-фосфат дегидрогеназы из *E. coli*. Перечисленные подходы применялись для селекции штаммов, продуцирующих канонические и неканонические аминокислоты, а также соединения, получающиеся из интермедиатов их биосинтеза, как, например, спирты, используемые в качестве биотоплива. При этом ключевые ферменты биосинтеза были модифицированы при помощи традиционных селекционных подходов, либо путем сайт-направленного мутагенеза на основании структурных и биоинформатических данных. Последующие этапы селекции включали амплификацию и оптимизацию уровня экспрессии существенных генов, в том числе, генов, ответственных за экскрецию целевого соединения. Важным этапом создания каждого отдельного продуцента являлось введение геномных модификаций, направленных на его адаптацию к условиям крупномасштабного культивирования.

Секция 3

Методы редактирования геномов микроорганизмов

Совершенствование методов редактирования генома *Escherichia coli* с использованием системы гомологичной рекомбинации λ Red

Бубнов Д.М.^{*}, Юзбашев Т.В., Синеокий С.П.

НИЦ «Курчатовский институт» – ГосНИИгенетика, 117545, Москва, 1-й Дорожный пр-д, д. 1,
e-mail: bubnov.dmitrii@mail.ru

doi: 10.21519/0234-2758-2018-S-28-29

Прошло более полувека с тех пор, как Эстер и Джошуа Ледерберг открыли явление лизогении бактериофага λ и конъюгативный перенос генетического материала, Мезельсон и Сталь доказали полуконсервативный механизм репликации ДНК, а Сеймур Бензер исследовал тонкую структуру гена. Эти основополагающие работы были выполнены на *Escherichia coli*, которая за время, прошедшее до настоящего момента, стала ключевым модельным объектом микробиологии, молекулярной генетики и многих других разделов биологических исследований, в том числе и микробной биотехнологии.

Популярность этого микроорганизма во многом обязана наличию широкого спектра методов модификации последовательности хромосомы. Среди них наиболее важное место на данный момент занимает система гомологичной рекомбинации бактериофага λ – λ Red. Она состоит из трех генов *gam*, *bet* и *exo*, продукты которых способны катализировать встраивание в хромосому интегративных кассет, фланкированных короткими участками гомологии длиной менее 50 пар оснований. Помимо этого, *bet* катализирует рекомбинацию между геномной ДНК и короткими синтетическими олигонуклеотидами. Таким образом могут быть получены однуклеотидные замены, а также делеции и инсерции длиной в несколько нуклеотидов с эффективностью, достаточной для отбора рекомбинантов без прямой селекции. Доля рекомбинантных клонов может достигать 25% от общего числа клеток, благодаря чему могут быть получены одновременно несколько мутаций и их сочетания. Применение этой технологии ограничивается тем, что большинство типов некомплементарных пар распознается комплексом MutHLS, представляющим собой клеточную систему репарации неспаренных оснований (MMR), в результате чего видимая эффективность рекомбинации падает на два порядка. Поэтому, в рамках данной работы был разработан подход для временной и обратимой инактивации MMR. Для этого была получена хелперная плаزمиды pDL14, содержащая гены *gam*, *bet* и доминантный негативный аллель *mutS*^{K622A} из *Salmonella enterica* LT2 под контролем промотора оперона *rhaBAD*, регулируемого L-рамнозой. Экспрессия *mutS*^{K622A} приводит к образованию неактивного MutS, в тоже время способного к образованию дефектного комплекса с MutH и MutL. В результате этого активность MMR в клетке падает, что позволяет вводить любые типы замен. Было показано, что экспрессия *gam*, *bet* и *mutS*^{K622A} в диком штамме MG1655 позволяет достичь эффективности рекомбинации олигонуклеотидов, образующих наиболее чувствительную к действию MMR некомплементарную пару нуклеотидов G:G, сравнимой с таковой для штамма с делецией по *mutS*. В отсутствие индукции L-рамнозой базальный уровень экспрессии оперона *gam-bet-mutS*^{K622A} достаточно низок и не приводит к существенному увеличению

скорости накопления спонтанных мутаций. Благодаря этому подходу использование метода рекомбинации олигонуклеотидов не требует предварительной модификации целевого штамма путем инактивации генов MMR, которая дополнительно ведет к приобретению мутаторного фенотипа, недопустимого в ряде задач.

Второе значительное ограничение технологии λ Red-рекомбинации заключается в том, что подавляющее большинство хелперных плазмид, содержащих гены λ Red, в том числе наиболее популярные pKD46 и серия pSIM, получены на основе температурочувствительных вариантов ориджинов репликации pSC101 и RK2. Это необходимо для того, чтобы плазмиды можно было легко удалить из штамма после того, как экспрессия генов λ Red больше не требуется. С другой стороны, стабильное поддержание в клетках таких плазмид требует длительного культивирования при перmissive температуре, в результате чего в $\sim 1,5$ раза снижается скорость роста культуры. Это накладывает существенные ограничения на работу со многими медленно растущими мутантными штаммами. Для того, чтобы их обойти, на основе ориджина ColE1 был получен новый плазмидный вектор pQE-30del, стабильность которого контролируется составом питательной среды. Плазмида содержит вблизи последовательности ориджина сильный промотор $P_{T5/lacO}$, инициирующий транскрипцию в направлении гена RNAI, продукт которого представляет собой молекулу РНК, ингибирующую активность ориджина. Таким образом, активность $P_{T5/lacO}$ приводит к потере стабильности конструкции и появлению бесплазмидных клеток. Благодаря тому, что этот промотор находится под контролем репрессора LacI, репликация вектора зависит от присутствия в среде специфического индуктора – изопропил- β -D-1-тиогалактопиранозид. В его отсутствие pQE-30del стабильно поддерживается, а при добавлении репликация полностью ингибируется. Это вектор послужил основой уже упомянутой хелперной плазмиды pDL14, а также pDL17, которая не содержит *mutS*^{K622A} и предназначена для интеграции двунитевых фрагментов. Обе конструкции содержат аллель *lacI*^q, благодаря чему их стабильность не зависит от генотипа штамма.

Таким образом, в ходе проведенной работы были получены хелперные конструкции, свойства которых позволяют обойти основные ограничения технологии редактирования генома *Escherichia coli* с использованием системы гомологичной рекомбинации λ Red. Благодаря этому они могут служить удобным и эффективным инструментом как в области фундаментальных исследований биологии этого объекта, так и его биотехнологических применений.

Работа выполнена при финансовой поддержке государства (Государственное задание № 595-00004-18 ПР) с использованием УНУ – Национальный биоресурсный центр «Всероссийская коллекция промышленных микроорганизмов» НИЦ «Курчатовский институт» – ГосНИИгенетика.

Синтетическая биология — от генной инженерии к инженерной биологии

Патрушев М.В.

НИЦ «Курчатовский институт», Москва, пл. Курчатова, д. 1.

e-mail: maxpatrushev@yandex.ru

doi: 10.21519/0234-2758-2018-S-30

Управление функциями клеток, их развитием и поведением всегда представляло интерес для исследователей. На протяжении всего 20-го века попытки направленного изменения фенотипа ограничивались аппликацией какого-либо внешнего фактора, в результате чего клетки либо кратковременно изменяли свой фенотип, либо неконтролируемо меняли его. Между тем, для практического применения клеток в биотехнологии и медицине требовался фенотип с изначально просчитываемыми в конкретных условиях параметрами. Ситуация начала меняться с появлением синтетической биологии (СБ). Как и многие другие направления, СБ развивалась не линейно, временами представляя собой мировой тренд развития биотехнологий, временами переходя в стадию застоя. Определение для СБ также появилось не сразу. К сегодняшнему дню принято считать, что синтетическая биология — это область, в которой применяются методы и техники молекулярной биологии для формирования заданного поведения клеток на основе теоретически сконструированных регуляторных сетей. При этом для конструирования регуляторных сетей применяются инженерных подходы, т.е. сложные сети формируются из простых функциональных элементов (блоков), взаимодействующих друг с другом в зависимости от внешних условий. Особо стоит отметить, что попытки сделать биологию инженерной дисциплиной предпринимались достаточно часто, однако именно принципы синтетической биологии позволили в итоге сделать это.

Если зарождением СБ как отдельного направления можно считать 2000 г., то истоками она уходит к ставшей классической работе Жакоба и Мано, которая увидела свет в 1961 г. В ней авторы впервые показали наличие в естественных системах регуляторных сетей, способных отвечать на конкретные факторы внешней среды. Открытую регуляторную сеть они назвали *lac*-опероном. Простейшие с точки зрения современного исследователя взаимодействия в *lac*-опероне, во время их открытия были прорывом, особенно учитывая небольшой объем знаний о механизмах регуляции транскрипции, который имел место на тот момент.

В период с 1961 по 2000 гг происходило накопление знаний в области структурной и функциональной молекулярной биологии, появлялись новые технологии и методы. Особым этапом, в аспекте развития СБ, можно считать разработку технологий рекомбинантных ДНК и следующее за ним бурное развитие методов генной инженерии, положивших основу технологиям практической реализации инженерных принципов в синтетической биологии.

Условным началом эры синтетической биологии в современном ее понимании принято считать несколько работ. В 1995 году МакАдамс и Шапиро впервые вводят аналогию между электрическими и генетическими сетями, вводят термин “вентиль”, позаимствованный из языка Булевой логики и фактически вводят понятия схемотехники в генетику. Несмотря на то, что авторы в своей работе базируются на естественных генетических сетях, ее значение трудно переоценить, так как фактически был предложен язык описания сложных генетических сетей, что дало мощный толчок к дальнейшему развитию направления. В 2000 году группа под руководством Коллинза публикует работу в которой создает простую искусственную генетическую регуляторную сеть, основанную на использовании генов, промоторы которых репрессировали продуктами друг друга. Таким образом была получена первая бистабильная (находящаяся в двух стабильных состояниях), в зависимости от апплицируемого внешнего фактора, искусственная сеть. В это же время Эловитц и Лейблер представляют результаты работы по созданию осциллирующей искусственной цепи, функционирующей следующим образом: белок репрессор LacI ингибирует транскрипцию другого репрессора – tetR, который, в свою очередь, является ингибитором гена cl из фага лямбда. А продукт гена cl – ингибитор экспрессии lacI. Несложно заметить, что при “запуске” работы цепи, основанной на последовательной репрессии ее компонентов, будут наблюдаться осцилляции по принципу петли обратной связи. Осциллирующую регуляторную сеть на основе репрессии авторы назвали репресциллятором.

Дальнейшее развитие направления происходило бурными темпами, появилось большое количество работ, в которых авторы представляли результаты конструирования искусственных генетических сетей. При этом, экспериментальной “фабрикой” в подавляющем большинстве случаев служила *E. coli*. Важными вехами в развитии СБ стали работы, в которых продемонстрирована межклеточная искусственная генетическая сеть. Межклеточные сети у бактерий в дальнейшем стали более тонко настраиваться за счет использования “чувства кворума” (Quorum sensing), что позволило исследователям создавать еще более сложные сети. Работы по управлению поведением клеток млекопитающих начали появляться лишь в середине двухтысячных, в то время как дрожжи применялись для этих целей с начала нулевых, хоть и значительно уступали бактериям по количеству сконструированных для них сетей.

Природное разнообразие CRISPR Cas систем и их использование для редактирования геномов

Федорова Я.В.^{*}, Северинов К.В.

Сколковский Институт Науки и Технологий. 121205, Москва, ул. Нобеля, д. 3.
e-mail: femtokot@gmail.com

doi: 10.21519/0234-2758-2018-S-32-33

CRISPR Cas нуклеазы – это новый, эффективный и быстро развивающийся подход к изменению геномов прокариотических и эукариотических организмов. Изначально найденные в бактериях Cas нуклеазы являются частью иммунных CRSIRP Cas систем, защищающих клетки от проникновения в них чужеродных ДНК и РНК, таких как генетический материал бактериофагов или плазмиды. Работа CRSIRP Cas систем основана на действии Cas белков – нуклеаз, способных специфически вносить разрывы в ДНК и РНК и таким образом вести к их дальнейшей деградации. Специфическое распознавание мишени происходит за счет ее спаривания с направляющими РНК, длиной около 20 нуклеотидов, входящих в состав Cas-эффекторного комплекса. Изменение последовательности направляющей РНК позволяет “направить” Cas нуклеазы на разрезание конкретных последовательностей ДНК, что является удобным для изменения геномной ДНК живых организмов: внесенный двунитевой разрыв устраняется внутриклеточными системами репарации, что может быть использовано для вставки или делеции новых последовательностей.

CRSIRP Cas системы широко представлены в геномах бактериальных и архейных организмов. Их Cas –эффекторные комплексы отличаются разнообразием строения и функций. Так, системы делятся на два класса: с мульти белковыми эффекторными комплексами и с комплексами, представленными одной Cas нуклеазой. Последние, благодаря простоте строения, нашли применение в геномной инженерии.

Наиболее известными и изученными нуклеазами второго класса являются белки Cas9, нуклеазы, способные распознавать двунитевые ДНК-мишени посредством двух направляющих РНК: криспр РНК и трейсерной РНК. Для узнавания мишени этим белкам необходимо присутствие PAM последовательности, мотива из нескольких нуклеотидов, фланкирующего целевой сайт. Белки Cas9 из разных организмов имеют разные PAM последовательности. Так, Cas9 нуклеаза из *Streptococcus pyogenes* распознает PAM 5'NGG 3', что делает затруднительным использование SpCas9 для редактирования AT богатых геномов. Малоразмерные нуклеазы SaCas9 из бактерии *Staphylococcus aureus* и CjCas9 из *Campylobacter jejuni* имеют сложные PAM последовательности (5'-NNGRRT-3' и 5'-NNNNRYAC-3'), реже встречающиеся в ДНК живых организмов.

Нуклеазы Cas12a (Cpf1) также принадлежат к белкам второго класса, однако сильно отличаются от Cas9 белков своим строением и механизмом работы: в отличие от Cas9, Cas12a не требует присутствия трейсерной РНК, и также отличается по составу нуклеазных доменов (отсутствие HNH). Благодаря своей способности разрезать пре-криспр РНК на отдельные направляющие РНК, Cas12a нашли применение в мультиплексном редактировании генома (изменении сразу нескольких генов). Как и Cas9, белки Cas12a требуют для работы наличие PAM последовательностей, которые с одной стороны ограничивают выбор ДНК-мишеней, и с другой стороны повышают специфичность разрезания.

Кроме того, белки Cas12a оказались способны неспецифически деградировать однонитевые ДНК, после единичного специфического распознавания мишени. Это свойство Cpf1 позволило создать на его основе чувствительную систему детекции ДНК молекул DETECTR.

Еще одним примером белков второго типа является Cas13a, нуклеаза способная специфически узнавать РНК-мишени. Нуклеазная активность Cas13a обеспечивается за счет наличия двух HEPN доменов. РНК-деградирующая активность Cas12a была использована для создания системы детекции РНК молекул SHERLOCK.

Вышеперечисленные типы нуклеаз включают лишь часть биологического разнообразия CRISPR Cas систем, обнаруживаемых в геномах бактерий, архей и в метагеномных последовательностях. Биохимическая характеристика таких неизученных ранее последовательностей необходима для расширения спектра применения CRISPR Cas систем: новые типы белков могут послужить основой разработки различных инструментов биотехнологии, а изучение белков -ортологов известных типов позволит уменьшить ограничения использования систем, вызванные сложностью PAM последовательностей, размера нуклеаз или их температурных оптимумов работы.

Биохимическая характеристика CRISPR Cas систем второго класса предполагает определение механизмов их работы: последовательностей направляющих РНК, PAM мотивов, а также активных нуклеазных доменов эффекторных Cas нуклеаз.

Для определения направляющих РНК могут быть использованы как прямой биоинформатический анализ последовательностей, так и секвенирование малых РНК, экстрагированных их бактериальной культуры, несущей изучаемую CRISPR Cas систему.

Определение PAM последовательности белка является одним из основных этапов изучения Cas нуклеаз. Для решения этой задачи используют ДНК-библиотеки, несущие целевой сайт распознавания (протоспейсер), ограниченный рандомизированными последовательностями нуклеотидов. Такие библиотеки могут быть как плазмидными – при дальнейшем их использовании в экспериментах по заражению бактериальных культур, несущих изучаемую систему; так и двунитевыми ДНК библиотеками – при использовании их в качестве мишеней в *in vitro* реакциях порезки ДНК рекомбинатными формами исследуемых нуклеаз. Сравнение представленности нуклеотидов в разных позициях рандомизированной области до и после действия CRISPR Cas системы позволяет точно определить PAM последовательность изучаемого Cas белка.

Понимание механизмов работы CRISPR Cas систем, а также устройства эффекторных Cas комплексов, позволяет оценить их функциональность и найти применение Cas белкам в качестве новых инструментов биотехнологии и медицины. Специфически распознающая различные участки ДНК и РНК Cas-машинерия - это основа множества развивающихся методов, включающих редактирование геномов, активацию транскрипции генов, детектирование патогенов, а также визуализацию молекул ДНК и РНК в микроскопических исследованиях.

Исследования выполнены при финансовой поддержке Минобрнауки России, соглашение № 14.606.21.0006, идентификатор проекта RFMEFI60617X0006.

Направленное изменение внутриклеточных потоков углерода с помощью редактирования генома для решения задач метаболической инженерии

Голубева Л.И.* , Крылов А.А., Машко С.В.

ЗАО «Научно-исследовательский институт Аджиномото-Генетика» (ЗАО «АГРИ»).

117545, Москва, 1-й Дорожный проезд, д. 1, корп. 1.

e-mail: luba_golubeva@agri.ru

doi: 10.21519/0234-2758-2018-S-34-34

В настоящее время прочно закрепилось мнение, что «... Сочетание аналитических методов расчета потоков и их контроль с помощью методов молекулярной биологии, основанных на проведении соответствующих генетических модификаций, представляют собой саму сущность метаболической инженерии ...» [1]. Для количественной характеристики внутриклеточных потоков углерода микроорганизмов, растительных и животных клеток широко применим метод анализа метаболических потоков с использованием ^{13}C изотопов (^{13}C -Metabolic Flux Analysis, ^{13}C -MFA).

Целенаправленное перераспределение потоков в разветвленных метаболических путях играет важную роль в прикладной микробиологии и биотехнологии, когда высокоэффективный синтез продукта приводит к ухудшению роста или снижению активности штамма-продуцента. Переключение потоков может осуществляться за счет метаболически индуцируемой транскрипции генов рекомбинантных путей и/или подавления экспрессии ключевого гена/генов. Для прецизионного редактирования генома используется разнообразный инструментарий, основанный на рекомбинации и применяющийся совместно с CRISPR/Cas9 обусловленной системой контр-селекции.

В работе было показано, что модификация хромосомы штамма *E. coli* MG1655 путем интегрирования ИПТГ-индуцируемых встречных промоторов для подавления экспрессии гена *pgi*, кодирующего фосфоглюкоизомеразу (ФГИ), приводит к постепенному снижению активности фермента в зависимости от степени подавления экспрессии *pgi* гена. В результате поток углерода перераспределяется из пути Эмбдена-Мейергофа-Парнаса в сторону окислительной ветки Пентозофосфатного пути с медленной активацией пути Энтнера-Дудорова. Сходное перераспределение потоков, в результате снижения количества ФГИ, было предсказано на основании опубликованной кинетической модели центрального метаболизма *E. coli*, созданной с использованием метода метаболических ансамблей.

Ранее снижение скорости роста и поглощения глюкозы Δpgi мутанта *E. coli* связывали, прежде всего, с избыточным синтезом НАДФН за счет усиления потока через оксидативную ветку ПФП и лишь как второстепенный фактор рассматривали недостаточную способность ферментов ПФП катаболизировать глюкозу. В настоящей работе, сравнивая потребление НАДФН для производства биомассы и синтез НАДФН в известных реакциях потоки, в которых были определены методом ^{13}C -MFA, было показано, что именно «неэффективная» работа ферментов ПФП приводит к снижению роста в штамме, характеризующемся 6% остаточной активностью ФГИ и отсутствием сверхпродукции НАДФН.

1. Stephanopoulos G. N., Aristidou A. A., and Nielsen J. H. Metabolic engineering: principles and methodologies. San Diego: Academic Press, 1998. – С. 725.

Секция 4

Биокатализ. Промышленная ферментация

Скрининговые технологии для создания биокатализаторов *de novo*

Габибов А.Г.

Институт биоорганической химии имени академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, 117997, Москва, ул. Миклухо-Маклая, д. 16/10.

doi: 10.21519/0234-2758-2018-S-36-36

Методы комбинаторной химии и биологии обеспечили на рубеже веков существенный прогресс в области создания новых лекарственных средств и поиска новых потенциальных терапевтических агентов природного происхождения. Существующие на сегодня методы скрининга больших репертуаров, обеспечиваемых значительным биоразнообразием, не позволяют осуществить поиск нужных клонов достаточно эффективно. Нами предложены подходы, связанные с виртуальным скринингом возможных активных каталитических клонов ферментов и антител с помощью суперкомпьютера. При этом предложены алгоритмы анализа химических реакций с помощью QM/MM подходов. С помощью указанной технологии удалось изменить маршруты реакций и изменить стереоспецифичность биокатализаторов. Нами также предложен способ скрининг биоразнообразия с помощью микрофлюидных систем. Данный подход позволяет существенно ускорить процесс скрининга и сделать его более эффективным. Данный подход использован нами для поиска ферментов с модифицированной активностью, а также для поиска новых антибиотических веществ. Рост числа случаев инфицирования антибиотикорезистентными штаммами патогенов бросает вызов современным технологиям поиска новых лекарственных препаратов. Подходы комбинаторной химии, основанные на использовании химических библиотек и направленные на создание высокоаффинных низкомолекулярных лигандов терапевтически значимых молекулярных мишеней клеток человека, успешно зарекомендовали себя в области направленного создания высокоэффективных терапевтических агентов. В то же время, данные подходы зачастую сталкиваются с непреодолимыми трудностями при создании новых антибиотиков. Альтернативой химическим библиотекам являются природные соединения, отобранные в результате эволюции по таким важным характеристикам как широкая специфичность и эффективность. Вместе с тем, неограниченное использование природных антибиотиков и их аналогов приводит к лавинообразному накоплению генов устойчивости у бактерий. Поиск новых природных антибиотиков, в свою очередь, чрезвычайно осложнен в настоящее время проблемой “переоткрытия антибиотиков”, что ставит задачу поиска альтернативных высокопроизводительных платформ скрининга антибиотической активности, культивирования “некультивируемых” микроорганизмов, а также поиска новых кластеров биосинтеза антибиотиков, их активации и гетерологической экспрессии. Микрофлюидные технологии скрининга антибиотической активности на уровне единичных клеток представляют в связи с этим высокий интерес, так как позволяют объединить в рамках одной платформы технологии ультравысокопроизводительного скрининга, широкомасштабного секвенирования и геномного майнинга, открывая уникальные возможности для открытия новых антибиотиков.

Биокаталитические технологии синтеза акриловых мономеров

Лавров К.В.^{*}, Яненко А.С.

НИЦ «Курчатовский институт» – ГосНИИгенетика, 117545, Москва, 1-й Дорожный пр-д, д. 1.
e-mail: lavrov.ko@gmail.com

doi: 10.21519/0234-2758-2018-S-37-37

Акриловые мономеры широко применяются как сырьё для полимеров, используемых в нефтегазодобывающей, горной, текстильной, бумажной промышленности, в очистке сточных вод и многих других областях экономики. Существующие потребности России в таких полимерах не покрываются собственным производством мономеров и полимеров. Разработка оригинальных процессов получения мономеров необходима для ликвидации технологического отставания и создания задела патентно-независимых, опережающих технологий.

Акриловые мономеры содержат химически лабильную двойную связь, в связи с чем для их получения перспективны биокаталитические технологии, обеспечивающие проведение синтеза в более мягких условиях, чем во многих химических способах. Промышленное биокаталитическое получение акриламида из продуктов нефтепереработки, успешно вытесняющее традиционный сернокислотный способ, является впечатляющим примером преимущества биотехнологий.

ГосНИИгенетика является лидером в России и мире по разработке и внедрению биотехнологий производства мономеров, в т.ч. по получению растворов акриламида (до 50%) и акрилата аммония (до 30%). Ведутся передовые разработки для биокаталитического получения функционализированных акриловых мономеров, в т.ч. N-замещённых акриламидов – незаменимых и дорогостоящих компонентов, модифицирующих физико-химические свойства полимеров. Расширение спектра внедрённых и перспективных разработок создаёт основу для принципиального изменения организации производства мономеров.

Основой для этих разработок являются рекомбинантные штаммы бактерий *Rhodococcus* – сверхпродуценты необходимых для синтезов ферментов, постоянно совершенствуемые в ГосНИИгенетика. Изучение штаммового разнообразия, физиологии и генетики родококков, чтение и анализ геномов, конструирование инструментов для редактирования геномов, создание экспрессионного инструментария (векторов, промоторов) позволяют не только эффективно решать практические задачи, но и получать новые фундаментальные знания об этих малоизученных бактериях. Для расширения спектра получаемых мономеров используется скрининг природных ферментов с последующей экспрессией в родококках, а также моделирование и изменение трёхмерных структур изучаемых ферментов.

Комплекс проводимых научно-исследовательских и опытно-конструкторских разработок нацелен на создание новой микробной платформы для получения как акриловых мономеров, так и других соединений с помощью биокатализа.

Работа выполнена при поддержке Российского Научного Фонда (соглашение № 16-14-00216).

HTS-технология получения ферментных препаратов

Лисов А.В.^{1,2}, Белова О.В.¹, Лисова З.А.¹, Самойленко В.А.¹,
Андреева-Ковалевская Ж.И.¹, Захарова М.В.¹, Шадрин А.М.¹, Леонтьевский А.А.^{1,2,*}

¹ Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН (ИБФМ РАН),
142290, Московская обл., г. Пушкино, пр-т Науки, д. 5;

² Пушинский государственный естественно-научный институт, 142290, Московская обл.,
г. Пушкино, Проспект Науки, д. 3.
e-mail: leont@ibpm.pushchino.ru

doi: 10.21519/0234-2758-2018-S-38-38

Ферменты составляют одну из основ современной биотехнологии и активно применяются в различных областях производства. Без использования ферментов невозможно представить современные пищевую, текстильную промышленность, фармакологию, сельское хозяйство. Поэтому, как собственно поиск новых продуцентов ферментов, так и поиск новых способов их поиска производятся постоянно во всем мире. Наряду с природными продуцентами ферментных препаратов применяют рекомбинантные штаммы, которые обеспечивают получение большего количества фермента с большой степенью чистоты. В настоящее время активно проводится секвенирование геномов различных организмов. Наличие полных последовательностей геномов существенно облегчает биоинформационный поиск генов целевых ферментов для создания рекомбинантных штаммов.

В ИБФМ РАН была разработана технология поиска и получения новых ферментных препаратов микроорганизмов на основе способа «быстрого скрининга генов» (HTS-технология). Примером практической реализации такого подхода является разработка технологии получения новых ферментных препаратов на основе гидролаз, предназначенных для улучшения питательных свойств кормов животных. В качестве источников генетического материала были использованы бактерии, депонированные во Всероссийской коллекции микроорганизмов, для которых были опубликованы полные последовательности геномов. В работе использовали 23 штамма бактерий. С помощью биоинформационных методов в геномах бактерий были идентифицированы гены, кодирующие целлюлазы, бета-глюканазы и ксиланазы. Всего было идентифицировано более трёхсот целевых генов, кодирующих названные гидролазы. На основе последовательности генов были сконструированы праймеры для проведения ПЦР. С помощью ПЦР была проведена амплификация генов гидролаз, всего было клонировано более ста генов. С помощью клонированных генов были получены рекомбинантные продуценты на основе *P. pastoris*, после чего были наработаны препараты рекомбинантных гидролаз. Были изучены свойства рекомбинантных гидролаз: термостабильность, термооптимум, pH-оптимум и стабильность, удельная активность, субстратная специфичность. Анализ свойств гидролаз для разработки нового ферментного препарата позволил отобрать три фермента (целлюлолаза, бета-глюканаза, ксиланаза) с лучшими характеристиками. Для разработки нового ферментного препарата была проведена оптимизация продукции ферментов рекомбинантными продуцентами на основе *P. pastoris* в 100-л биореакторах. В результате был получен новый ферментный препарат с активностью ксиланазы 12000 Ед/гр, бета-глюканазы – 8000 Ед/гр, целлюлазы – 6000 Ед/гр и с выходом целевого белка до 20 г/л. Комплекс ферментов был иммобилизован на подходящем носителе, что обеспечило долговременное хранение без потери свойств ферментов. Разработанный способ получения технических препаратов ферментов, включающий цикл работ от обнаружения целевого гена, до отработки условий культивирования продуцента и получения готовой формы ферментного препарата, представляет выводить на рынок технологии получения любых ферментов.

Инженерия практически значимых ферментов

Тишков В.И.^{1,2,3,*}, Пометун А.А.^{2,3}, Атрошенко Д.Л.^{1,2}, Зарубина С.А.^{1,2,3},
Бойко К.М.³, Степашкина А.В.^{2,3}, Чубарь Т.А.^{1,2}, Савин С.С.^{1,2,3}

¹ Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Химический факультет, 119991 Москва, Ленинские горы, 1, стр.3.

² ООО «Инновации и высокие технологии МГУ», 109559 Москва, Цимлянская ул., 16, оф. 96.

³ Институт биохимии им. А.Н. Баха, Федеральный исследовательский центр "Фундаментальные основы биотехнологии" РАН, 117234 Москва, Ленинский просп., д. 33, корп. 2.

e-mail: vitishkov@gmail.com

doi: 10.21519/0234-2758-2018-S-39-39

Ферменты являются непревзойденными по своей каталитической активности и специфичности биокатализаторами. Однако природные ферменты практически не применяются на практике в силу дороговизны их получения, низкой стабильности, узким оптимумом pH активности, который очень часто далек от требования реального процесса. Высокая специфичность к природным молекулам одновременно является и одним из главных недостатков, т.к. многие лекарственные соединения являются аналогами природных. Активное развитие методов генетической инженерии и белкового дизайна позволило преодолеть вышеуказанные недостатки, а также создать новые подходы к получению принципиально новых биокатализаторов. В данном докладе будут приведены примеры по работе с рядом практически важных ферментов.

Отличительной особенностью нашей работы с каждым ферментом является комплексный подход. На основании биоинформационного поиска отбирается источник потенциально важного фермента. Ген каждого отобранного фермента клонируется и создается высокоэффективная система экспрессии в *E.coli*, а также методики выделения высокоочищенных препаратов. Одновременно начинаются работы по моделированию структуры, кристаллизации и определения реальной структуры с помощью РСА. Методом рационального дизайна находят перспективные положения для введения замен с целью направленного улучшения или изменения свойств. Наиболее перспективные замены объединяются в многоточечные мутанты.

1. **Формиатдегидрогеназа.** В случае ФДГ из патогенных бактерий *Staphylococcus aureus* оказалось, что этот фермент имеет удельную активность в 2-2,5 раза выше, чем все описанные ранее ФДГ. ФДГ из *O.parapolyomorpha* и сои имели самые низкие константы Михаэлиса по обоим субстратам. В случае ФДГ из *Pseudomonas* sp.101 получен фермент с измененной специфичностью от NAD^+ к $NADP^+$ и начаты эксперименты по созданию слитого белка с цитохром Р450 монооксигеназой BM3

2. **Оксидаза D-аминокислот.** Получены точечные и многоточечные мутанты с повышенной химической и температурной стабильностью, улучшенными каталитическими свойствами в реакции окисления цефалоспорина С, направленной специфичностью к определенным D-аминокислотам для создания биосенсоров для диагностики нейродегенеративных и других заболеваний

3. **Пенициллинацилаза.** Создана одноцепочечная форма фермента.

Работа выполнена при поддержке грантов РНФ 16-04-00043, 18-74-00146, РФФИ 17-04-01469, 17-04-01662, 18-34-00594, 15-54-78035-Итал_a, 17-04-01487a

Секция 5

**Микробные ассоциации
(микробиомы человека и животных,
микроценозы ризосферы)**

Плазмиды бактерий рода *Pseudomonas*

Боронин А.М.

Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН
142290 Московская область г. Пущино, Проспект Науки, 5
e-mail: boronin@ibpm.pushchino.ru

doi: 10.21519/0234-2758-2018-S-41-41

Бактерии рода *Pseudomonas* характеризуются большим разнообразием плазмид, включая плазмиды контролирующие деградацию персистентных органических соединений (D плазмиды). Классификация плазмид резистентности к антибиотикам (R плазмиды), обнаруженных в штаммах *P. aeruginosa* и D плазмид – в штаммах мезофильных псевдомонад, позволила нам обосновать наличие 14 групп несовместимости (Inc). Все изученные в нашей лаборатории плазмиды деградации нафталина и толуола относятся к IncP-7 и P-9 группам, образуя несколько подгрупп, а деградации капролактама к IncP-7, P-9 и P-2.

Плазмиды IncP-7 имеют узкий круг бактериальных хозяев, IncP-9 – широкий. На основании сравнения базовых репликационных выделено 9 подгрупп плазмид IncP-9 группы и 4 подгруппы IncP-7 плазмид.

Катаболические гены обычно организованы в опероны. Изученные нами генетические системы деградации нафталина состоят из двух оперонов, которые индуцируются салицилатом. В ряде случаев при изменении характера экспрессии с индуцибельного на конститутивный происходит расширение спектра утилизируемых субстратов. Комбинации НАН плазмиды-штаммы *Pseudomonas*, наиболее эффективно осуществляющие деградацию полициклических ароматических углеводородов использовали при разработке биопрепаратов для очистки окружающей среды.

Среди исследованных нами псевдомонад – деструкторов толуола преобладают плазмиды IncP-7 группы, содержащие ген толуол диоксигеназы в отличие от архетипа плазмид биodeградации толуола –pWW0, содержащей толуол монооксигеназу.

Описан новый тип CAP плазмиды, в составе которой обнаружен второй катаболический оперон, детерминирующий утилизацию салицилата – центрального метаболита утилизации многих ароматических соединений и определена нуклеотидная последовательность нового гена салицилат-1-гидроксилазы – *scpA*.

Многие бактерии, относящиеся к группе PGPR (стимулирующие рост растений ризобактерии) являются псевдомонадами, что позволяет использовать плазмиды резистентности к тяжелым штаммам, мышьяксодержащим соединениям или биodeградации полициклических ароматических углеводородов для получения штаммов, способных в условиях все чаще встречающегося комплексного загрязнения эффективно защищать растения от фитотоксического действия поллютантов и осуществлять деградацию загрязнителей.

У мезофильных псевдомонад, выделенных из почвы и очистных сооружений, обнаружен ряд R-плазмид, что говорит о том, что различные экологические ниши могут служить резервуаром генов резистентности к антибиотикам. Ряд R-плазмид относится к группе IncP-9, что вместе с уже имеющимися данными свидетельствует о широком распространении у псевдомонад плазмид этого типа.

Эволюция бактериального генома в системе симбиоза

Проворов Н.А.^{1,*}, Тихонович И.А.^{1,2}, Андронов Е.Е.^{1,2,3}

¹ ВНИИ сельскохозяйственной микробиологии, С.-Петербург, Пушкин, 196608, ш. Подбельского, д. 3.

² Санкт-Петербургский государственный университет, С.-Петербург, 199034, Университетская наб., д. 7/9.

³ Почвенный институт им. В.В. Докучаева, Москва, 109017, Пыжевский пер., 7, стр. 2.
e-mail: provorovnik@yandex.ru

doi: 10.21519/0234-2758-2018-S-42-42

Вступление в симбиоз с эукариотами – одна из основных стратегий эволюции бактерий, связанная с глубокими изменениями их геномов. Возникновение факультативных симбиозов обычно сопровождается увеличением бактериальных геномов и их преобразованием в многокомпонентные формы – разделением на несколько репликонов (кольцевые и линейные хромосомы, мегаплазмиды, хромиды). При этом возрастает генетическая пластичность бактерий, связанная с накоплением инсерционных и повторяющихся последовательностей ДНК, а также с расширением акцессорной части генома, основанном на интенсификации горизонтального переноса генов. Образование строго облигатных, не способных к автономному существованию симбионтов, напротив, сопровождается резким уменьшением размеров генома, которые у некоторых эндоцитобионтов насекомых составляют лишь 140-160 т.п.н. Наиболее глубокая редукция генома произошла при трансформации симбиотических бактерий в клеточные органеллы: некоторые из них (митосомы, многие гидрогеносомы, некоторые пластиды) лишены геномов, хотя частично сохраняют протеомную идентичность предковых бактерий.

Выявленные у симбиотических бактерий преобразования геномов сопровождаются формированием партнерами целостных систем наследственности – хологеномов и симбиогеномов. На примере N₂-фиксирующего бобово-ризобияльного симбиоза показано, что целостность симбиогенома основана на сигнально-рецепторных отношениях, которые определяют развитие клеточных структур и выполнение биохимических функций симбиоза. С использованием уникальной модели “*Vavilovia formosa* – *Rhizobium leguminosarum*” мы показали, что у ризобий эволюция систем симбиоза основана на стратегии “утраты и приобретения генов”, определяемой высокой мобильностью *sym*-генов в ассоциированных с растениями микробных сообществах. На поздних стадиях симбиогенеза эволюция хологенома основана на массивном переносе информационных макромолекул – продуктов действия генов (РНК, белков), а также на эндосимбиотическом переносе генов между органеллами и ядром. Происходящая при этом утрата генетической индивидуальности бактерий может быть описана с помощью моделей межвидового (симбионт→хозяин) альтруизма, определяющего преобразование холобионта в единый организм.

Характеристика симбиогенных преобразований генома позволила приступить к разработке методов симбиотической инженерии бактерий, основанной на усилении активности позитивных регуляторов симбиоза, на репрессии его негативных регуляторов, а также на введении новой наследственной информации, стимулирующей развитие макроорганизмов-хозяев.

Работа поддержана РФФ, грант 14-26-00094П.

Стендовые доклады

Секция 1

Структура и функции геномов микроорганизмов

Метакрилатредуктазы анаэробных бактерий

Архипова О.В.^{1,*}, Хохлова Г.В.¹, Микулинская Г.В.²

¹ Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН, 142290, Московская область, г. Пущино, просп. Науки, д. 5

² Филиал Института биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, 142290, Московская область, г. Пущино, просп. Науки, д. 6.

e-mail: aroksan@gmail.com

doi: 10.21519/0234-2758-2018-S-45-45

Метакрилат (2-метилпропеноат) — органическое, ненасыщенное, неприродное, токсичное соединение, присутствует в отходах метакрилатных производств. Использование метакрилата в качестве терминального акцептора электронов — уникальное свойство анаэробной ацетатокисляющей грамотрицательной бактерии *Geobacter sulfurreducens* AM-1 (класс *Deltaproteobacteria*; Галушко и др., 1994). Ферментный комплекс, восстанавливающий метакрилат, состоит из двух хромопротеидов: флавинодержавшей метакрилатредуктазы Mrd (50 кДа) и её физиологического донора электронов – тетрагемового цитохрома *c* Mcc (30 кДа). Mrd и Mcc были получены в чистом виде, их свойства изучены (Mikoulińska et al., 1999).

Целью работы было исследование метакрилатной редокс системы. Для достижения поставленной цели решали следующие задачи: 1) определение нуклеотидной последовательности и организации генов *mrd* и *mcc* в геноме *G. sulfurreducens* AM-1; 2) выявление организмов, имеющих гены-гомологи *mrd* и *mcc*; 3) поиск и исследование метакрилатвосстанавливающей активности у организмов-обладателей генов-гомологов *mrd* и *mcc*.

Гены *mrd* и *mcc* в геноме *G. sulfurreducens* AM-1 были идентифицированы на основе анализа аминокислотной последовательности их N-концов (Mikoulińska et al., 1999; Arkhipova et al., 2015). При биоинформационном анализе оперона метакрилатной редокс системы было показано, что несколько анаэробных микроорганизмов имеют гены с высокой степенью гомологии *mrd* и *mcc*, организованные в единый оперон с общими регуляторными элементами, как у *G. sulfurreducens* AM-1 (Arkhipova et al., 2015). В геномах анаэробных ацетатокисляющих грамотрицательных бактерий *Anaeromyxobacter dehalogenans* 2CP-1^T (класс *Deltaproteobacteria*) и *Denitrovibrio acetiphilus* DSM 12809^T (класс *Deferribacteres*) были найдены ближайшие гомологи генов *mrd* и *mcc* *G. sulfurreducens* AM-1 (Arkhipova et al., 2015). Для чистых культур *A. dehalogenans* 2CP-1 и *D. acetiphilus* DSM 12809 была показана периплазматическая метакрилатвосстанавливающая активность. Кроме того, *A. dehalogenans* и *D. acetiphilus* оказались способны восстанавливать фумарат: у *A. dehalogenans* фумаратредуктазный процесс – периплазматический, у *D. acetiphilus* – внутриклеточный. В клетках *D. acetiphilus* была обнаружена периплазматическая нитратредуктазная активность. Обсуждаются варианты соответствия между редуктазными активностями и генами гипотетических белков в геномах *A. dehalogenans* и *D. acetiphilus*.

Таким образом, *A. dehalogenans* и *D. acetiphilus* обладают периплазматической метакрилатвосстанавливающей активностью, что свидетельствует об их адаптационном потенциале, а также о перспективах использования в биоремедиации.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ №17-04-01068 «Анаэробная ферментная система, восстанавливающая метакрилат».

Структура и регуляция экспрессии *lux*-оперона морских светящихся психрофильных бактерий *Aliivibrio logei*

Манухов И.В., Мелькина О.Е., Хрульнова С.А., Завильгельский Г.Б.

НИЦ «Курчатовский институт» – ГосНИИгенетика, 117545, Москва, 1-й Дорожный пр-д, д. 1.
e-mail: manukhovi@mail.ru, compleanno@mail.ru, zavilgel@genetika.ru

doi: 10.21519/0234-2758-2018-S-46-47

Изолирована группа штаммов светящихся морских бактерий *Aliivibrio logei* (акватории Белого, Охотского и Берингова морей), относящихся к группе психрофильных бактерий: оптимальная температура роста около 15⁰С. Определены их биолюминесцентные характеристики. Показано, что экспрессия *lux*-генов регулируется системой “Quorum Sensing” (QS). Клонирован *lux*-оперон *A. logei* в клетках *Escherichia coli*, определены его структура и нуклеотидная последовательность.

Структура *lux*-оперона *A. logei* обнаруживает значительные отличия от таковой *lux*-оперона близкородственного вида светящихся морских мезофильных бактерий *A. fischeri*. В отличие от *lux*-оперона *A. fischeri*, содержащего одну копию гена *luxR* – активатора транскрипции, в составе *lux*-оперона *A. logei* имеется две копии гена *luxR* (*luxR1* и *luxR2*). В структуре *lux*-оперона *A. logei* также отсутствует ген *luxI* перед геном *luxC*, но непосредственно за геном *luxG* расположен фрагмент ДНК с генами *luxR2* –*luxI*:

luxR1* - *luxCDABEG*, *luxR2-luxI – оперон *A. logei*,

luxR* - *luxICDABEG – оперон *A. fischeri*.

Проведено сравнение активностей белков – регуляторов транскрипции генов *lux*-оперонов *A. fischeri* (LuxR) и *A. logei* (LuxR1 и LuxR2) в зависимости от концентрации аутоиндуктора (3-охо-С6-HSL, АИ-1), а также определены влияния шаперонов и протеаз на активность этих белков. Показано, что по основным параметрам (зависимость активности от концентрации АИ-1, термостабильность, необходимость для фолдинга шаперона GroEL/ES, чувствительность к Lon-протеазе) LuxR2 *A. logei* практически не отличается от LuxR *A. fischeri*. Белок LuxR1 *A. logei* менее активен (для его активации требуется на два порядка более высокая концентрация АИ-1), не подвержен влиянию Lon-протеазы, не требует для фолдинга шаперона GroEL/ES. При высоких концентрациях АИ белок LuxR1 стабилизирует белок LuxR2, который является основным регулятором, в клетках, мутантных по шаперонину GroEL/ES и в клетках с активной Lon-протеазой.

Проведен анализ влияния глобальных регуляторов CRP и H-NS на экспрессию генов *luxR*, *luxR1*, *luxR2* бактерий *A. fischeri* и *A. logei*. Показано, что экспрессия генов *luxR*, *luxR1*, *luxR2* практически полностью зависит от глобального регулятора CRP. В мутантном штамме *E. coli hns::kan* значительно усиливается (примерно в 100-1000 раз) экспрессия генов *luxR* *A. fischeri* и *luxR2* *A. logei*, в то время как экспрессия гена *luxR1* *A. logei* практически не меняется (усиление всего в несколько раз). Проведен анализ влияния белков-активаторов систем QS LuxR1 и LuxR2 *A. logei* на экспрессию генов *luxR1* и *luxR2*. Показано наличие «каскадного» механизма регуляции экспрессии генов системы QS у психрофильных бактерий *A. logei*. Синтезируемый с промотора P₁₁ белок LuxR1 в присутствии аутоиндуктора АИ-1 значительно усиливает транскрипцию гена *luxR2* (с промотора P₂₁) и, соответственно, синтез белка LuxR2, второго активатора системы QS.

Публикации:

1. Manukhov, I.V., Khrul'nova, S.A., Baranova, A., Zavilgelsky, G.B., 2011. Comparative analysis of the *lux* operons in *Aliivibrio logei* Kch1 (a Kamchatka isolate) and *Aliivibrio salmonicida*. J. Bacteriol. 193, 3998-4001.
2. Khrulnova S.A., Baranova A., Bazhenov S.V., Goryanin I.I., Konopleva M.N., Maryshev I.V., Salykhova A.I., Vasilyeva A.V., Manukhov I.V., Zavilgelsky G.B., 2016. Lux-operon of the Marine Psychrophilic Bacteria *Aliivibrio logei*: a Comparative Analysis of the LuxR1/LuxR2 Regulatory Activity in *Escherichia coli* cells. Microbiology. 162, 717-724.
3. Konopleva M.N., Khrulnova S.A., Baranova A., Ekimov L.V., Bazhenov S.V., Goryanin I.I., Manukhov I.V. 2016. A combination of luxR1 and luxR2 genes activates Pr-promoters of psychrophilic *A. logei* lux-operon independently of chaperonin GroEL/ES and protease Lon at high concentrations of autoinducer. Biochem Biophys Res Commun. 2016 Apr 8. 473 (4): 1158-62. doi: 10.1016/j.bbrc.2016.04.032.
4. Мелькина О.Е., Горянин И.И., Завильгельский Г.Б. 2017. Гистон-подобный белок H-NS участвует в негативной регуляции систем Quorum Sensing у грам-отрицательных бактерий. Генетика, 53, 165-172.

Филогенетический анализ бета-галактозидаз LAC аскомицетовых дрожжей

Наумова Е.С.^{1,*}, Лютова Л.В.^{1,2}, Шнырёва А.В.² Наумов Г.И.¹

¹ НИЦ «Курчатовский институт» – ГосНИИГенетика, 117545, Москва, 1-й Дорожный пр-д, д. 1; тел.: +7 (495) 314-81-73, e-mail: lena_naumova@yahoo.com

² Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, 119234, г. Москва, Ленинские горы, д. 1

doi: 10.21519/0234-2758-2018-S-47-47

Фермент бета-галактозидаза (лактаза) широко распространен в тканях растений и животных, однако крайне редко встречается у дрожжей. Благодаря присутствию фермента бета-галактозидазы молочные дрожжи *Kluyveromyces lactis* и *K. marxianus* способны ферментировать лактозу. Полимерные локусы *LAC* дрожжей *K. lactis* имеют сложную структуру и состоят из двух тесно связанных структурных генов *LAC4* (бета-галактозидазы) и *LAC12* (ген пермеазы лактозы) и регуляторной последовательности (Dickson & Riley 1989; Fairhead & Dujon 2006, Naumov, 2008).

Мы провели сравнительный филогенетический анализ аминокислотных последовательностей бета-галактозидазного гена *LAC4* дрожжей *Kluyveromyces*, *Debaryomyces*, *Scheffersomyces* и *Sugiyamaella*. Поиск гомологичных α -глюкозидаз у изученных родов дрожжей осуществляли в GenBank с использованием программного обеспечения BLAST. Филогенетический анализ выявил значительные различия между белками *LAC4* дрожжей *Kluyveromyces*, *Scheffersomyces*, *Sugiyamaella* и *Debaryomyces*. С другой стороны, белки *LAC4* дрожжей *Kluyveromyces* разделились на две различные подгруппы, соответствующие экологическому происхождению штаммов: молочные продукты и природные источники. Группа молочных штаммов гетерогенна и включает как дрожжи *K. lactis*, так и *K. marxianus* (98% идентичности), что указывает на общее происхождение их генов *LAC4*.

Исследование выполнено при финансовой поддержке совместным российско-тайваньским грантом РФФИ (№ 18-54-52002-МНТ).

Филогенетический анализ α -глюкозидаз MAL и IMA аскомицетовых дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*, *Lachancea* и *Kluveromyces*

Наумова Е.С.^{1,*}, Боровкова А.Н.^{1,2}, Шнырёва А.В.², Наумов Г.И.¹

¹ НИЦ «Курчатовский институт» – ГосНИИгенетика, 117545, Москва, 1-й Дорожный пр-д, д. 1; тел.: +7 (495) 314-81-73, e-mail: lena_naumova@yahoo.com

² Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Ленинские горы, 1-12, Москва 119234

doi: 10.21519/0234-2758-2018-S-48-48

Генетика ферментации α -глюкозида мальтозы, важной для производства хлеба, кваса, пива, пищевого и технического спирта, имеет большое фундаментальное и прикладное значение. У эукариотических микроорганизмов опероноподобная структура впервые была обнаружена на примере мальтозных полимерных (множественных) локусов MAL, состоящих из одного регуляторного и двух структурных генов: пермеазы мальтозы и α -глюкозидазы мальтазы (Needlemanetal., 1984; Наумов, Юркевич, 1985). Международный проект (Goffeauetal., 1996) по секвенированию и аннотированию генома генетической линии *S. cerevisiae* S288C позволил обнаружить наряду с известными мальтазными генами MAL12 и MAL32 новое близкородственное им семейство изомальтазных генов IMA1–IMA5 (Наумов, Наумов, 2010; Brownetal., 2010; Testeetal., 2010).

Принимая во внимание общепринятую концепцию полной дупликации генома (ПДГ) у дрожжей рода *Saccharomyces*, проведен сравнительный анализ множественных α -глюкозидаз MAL и IMA генетической линии *S. cerevisiae* S288C и α -глюкозидаз протоплоидных (геномы которых не прошли дупликации) дрожжей родов *Kluveromyces* и *Lachancea*. Показано, что только некоторые изоформы MAL и IMA дрожжей *Kluveromyces* и *Lachancea* находятся в близком филогенетическом родстве с α -глюкозидазами MAL12, MAL32 и IMA1–IMA4 дрожжей *S. cerevisiae* S288C, тогда как другие более близки дивергентной IMA5. Полученные результаты согласуются с концепцией ПДГ, согласно которой дрожжи *Saccharomyces*, *Kluveromyces* и *Lachancea* возникли от общего протоплоидного предка и поэтому могут иметь общие близкородственные α -глюкозидазы MAL и IMA. Уровень сходства аминокислотных последовательностей изомальтаз IMA1–IMA4 дрожжей *S. cerevisiae* S288C и изомальтаз *L. dasiensis*, *L. fantastica*, *L. fermentati*, *L. lanzarotensis*, *L. meyersii*, *L. quebecensis*, *L. thermotolerans* составляет 75–100%, мальтазы MAL этих же видов идентичны на 75–99%. При этом, α -глюкозидазы MAL и IMA независимо дивергировали в каждом роде, виде и даже штамме.

Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект №17-04-00309).

Молекулярно-генетические особенности пектиназных генов *PGU* дрожжей *Saccharomyces bayanus*

Наумова Е.С.^{1,*}, Шаламитский М.Ю.², Наумов Г.И.¹

¹ НИЦ «Курчатовский институт» – ГосНИИгенетика, 117545, Москва, 1-й Дорожный пр-д, д. 1; тел.: +7 (495) 314-81-73, e-mail: lena_naumova@yahoo.com

² Всероссийский национальный научно-исследовательский институт виноградарства и виноделия “Магарач” РАН, Ялта 298600, Россия

doi: 10.21519/0234-2758-2018-S-49-49

Пектиназа (эндо-полигалактуроназа) является одним из основных ферментов, осуществляющих расщепление высокомолекулярных пектиновых веществ растительного происхождения. Отметим большое значение этого фермента для осветления соков из ягод и плодов, а также виноградного сусла и вина. Пектиназа может также определять фитопатогенную активность дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* на виноградной лозе (Gognies et al. 2002). В виноделии встречаются два биологических вида *Saccharomyces*: *S. cerevisiae* и *S. bayanus*. Специфической экологической нишей последних дрожжей является ферментация вина при низких температурах. Эти дрожжи характеризуются высокой пектинолитической активностью (Panon et al. 1995; Naumov et al. 2001). У штаммов *S. cerevisiae* независимого происхождения хорошо известен одиночный ген *PGU1*, кодирующий эндо-полигалактуроназу (Fernandez-Gonzalez et al. 2004; Divol & Rensburg, 2007; Eschstruth & Divol 2011), тогда как пектиназные гены дрожжей *S. bayanus* практически не изучены.

Мы провели молекулярно-генетическое изучение пектиназных генов у 60 штаммов дрожжей *Saccharomyces bayanus*, выделенных из различных ферментационных процессов и природных источников в разных регионах Европы и в США. В отличие от штаммов *S. cerevisiae*, имеющих по одному гену *PGU*, у дрожжей *S. bayanus* выявлено три дивергентных гена *PGU1b*, *PGU2b* и *PGU3b*, нуклеотидные последовательности которых сходны на 86.1–95.7%. С помощью молекулярного картирования и Саузерн-гибридизации гены *PGU1b*, *PGU2b* и *PGU3b* картированы, соответственно, в хромосомах 1, 4 и дуплете хромосом 8/9. Показано, что генотип *PGU1b PGU2b PGU3b* характерен для всех изученных штаммов *S. bayanus*. По-видимому, высокая пектинолитическая активность этих дрожжей связана с наличием в их геноме нескольких полимерных генов *PGU*.

Исследование выполнено по Госзаданию №595-00004-18ПР.

Гемолизин II *Bacillus cereus*

Солонин А.С.*^а, Ковалевская Ж.И., Нагель А.С., Сиунов А.В., Бударина Ж.И.

Институт Биохимии и физиологии микроорганизмов РАН им Г.К. Скрыбина,
Лаборатория молекулярной микробиологии, 142290, МО, г. Пущино, просп. Науки 5.
e-mail: solonin.a.s@ya.ru

doi: 10.21519/0234-2758-2018-S-50-50

Группа бактерий *B. cereus sensu lato* охватывает к настоящему моменту девять близкородственных видов, которые имеют практически идентичную хромосомную ДНК и отличающиеся по составу плазмидных ДНК. Эта группа наряду с патогеном насекомых *B. thuringiensis* включает два патогенных для человека вида *B. anthracis*, известного как опасный патоген, вызывающий сибирскую язву и *B. cereus*, вызывающий диаррейный и эметический синдромы, а также заболевания глаз, нервной системы, маститы, сепсис, пневмония, эндокардит, менингит, энцефалит и другие болезни у человека. Особенно часто патологии, определяемые *B. cereus* проявляются у людей с ослабленной иммунной системой на фоне других серьезных заболеваний. *B. cereus* синтезирует ряд токсинов, которые способствуют развитию инфекции. Гемолизин II (HlyII) является одним из основных факторов патогенности *B. cereus*. HlyII *B. cereus* секретируется бактериями в окружающую среду в форме мономера. Мономеры HlyII взаимодействуют с клеточными мембранами, олигомеризуются с образованием открытых трансмембранных гекса-, гепта- и октамерных структур – нанопор. Ионы и другие низкомолекулярные вещества начинают свободно проникать через нанопоры, вследствие чего нарушается гомеостаз и клетки гибнут, как за счет некроза, так и апоптоза. Уникальной особенностью HlyII *Bacillus cereus* является наличие С-концевого домена, отсутствующего у всех исследованных к настоящему моменту порообразующих бактериальных токсинов. Несмотря на то, что функциональная роль С-концевого домена неизвестна, нами продемонстрировано, существование гемолизина II, лишённого С-концевого домена, в бактериальной клетке невозможно. Гемолизин II способен атаковать клетки млекопитающих, преодолевая гликокализ, а также дафнии и харовые водоросли, которые существуют в той же экологической нише, что и *B. cereus*. Экспериментами на харовых водорослях, имеющих экзо-скелет, не позволяющий крупным молекулам достигать мембраны, продемонстрировано, что формирование поры HlyII происходит в мембранах после проникновения мономерных форм. Кроме того, показано, что эффективность гемолиза, определяемого этим токсином, зависит от природы источника эритроцитов. Максимальный уровень гемолитической атаки наблюдали на эритроцитах кролика, тогда как минимальный зафиксирован на эритроцитах мыши. Эритроциты человека и крысы атакуются приблизительно одинаково, и их чувствительность занимает промежуточное значение. Эти наблюдения могут указывать либо на наличие специфического рецептора в мембранах млекопитающих, либо на зависимость эффективности одного или нескольких этапов порообразования от липидного состава атакуемой мембраны.

Регуляция гена гемолизина II *Bacillus cereus*

Солонин А.С., Ковалевская Ж.И., Шадрин А.М., Нагель А.С., Сиунов А.В.,
Бударина Ж.И.

Институт Биохимии и физиологии микроорганизмов РАН им Г.К. Скрыбина,
Лаборатория молекулярной микробиологии, 142290, МО, г. Пущино, просп. Науки, д. 5.
e-mail: solonin.a.s@ya.ru

doi: 10.21519/0234-2758-2018-S-51-51

B. cereus синтезирует ряд токсинов, которые способствуют развитию инфекции. Гемолизин II (HlyII) - порообразующий цитолитический токсин является одним из основных факторов патогенности *B. cereus*. Экспрессия гена гемолизина II (*hlyII*) контролируется первичным регулятором HlyIIR. Кроме того, ген *hlyII* регулируется глобальным регулятором Fug, а в аэробных условиях может быть задействована система ResD-ResE. В работе приводится определение индивидуальных вкладов каждого из этих регуляторов в активность промотора *hlyII*. Установлены молекулярные механизмы репрессии транскрипции каждым регулятором. Нами было обнаружено наличие UP элемента в составе промоторно-операторного района, нарушение которого приводит к резкому снижению уровня транскрипции гена *hlyII*. В этом случае участия репрессора HlyIIR в регуляции этого гена не обнаруживается. Все выше сказанное относится к негативной регуляции, однако нет сведений о том, как активируется экспрессия гена *hlyII*. Выращивание *B. cereus* в среде, в которую добавлена плазма крови человека, приводит к увеличению общей гемолитической активности несколько десятков раз. Использование репортерного гена бета-галактозидазы под контролем *hlyII* промотора в рекомбинантных бациллярных штаммах и ПЦР в режиме реального времени в природном штамме *B. cereus* 771 показало, что экспрессия гена *hlyII* увеличивается в 100 раз в присутствии даже незначительного количества плазмы крови человека (5%) в культуральной среде. При выращивании рекомбинантного штамма *B. cereus*, нокаутированного по гену регулятора *hlyIIR*, регуляции экспрессии гемолизина II при выращивании на среде с плазмой не обнаружено. Таким образом, можно предположить, что плазма содержит индуктор, который может взаимодействовать с HlyIIR напрямую или запускает механизм внутри клетки, приводящий к изменению его способности связываться с оператором, и репрессор уже не может блокировать транскрипцию *hlyII*. То есть, попадая в макроорганизм, бактерии значительно увеличивают экспрессию гена *hlyII*, продукт которого вызывает лизис клеток, что обеспечивает бактериальные клетки питательными веществами. Обработка плазмы крови протеиназой К приводит к существенному падению её индуцирующей способности. Фракционирования плазмы крови с целью обнаружения индуктора позволило определить, что в переносе индуктора участвует альбумин. Кроме того замечена возможность фосфорилирования белка HlyIIR в клетках *B. cereus*, что также может в значительной степени изменять эффективность специфического узнавания репрессором промоторно-операторной области. Изучение механизмов регуляции экспрессии микробных токсинов является чрезвычайно важным для понимания основ инфекционного процесса и необходимым для разработки эффективных способов борьбы с инфекциями, вызываемыми бактериями и для подавления заболеваний макроорганизмов.

Поиск новых генов *Escherichia coli*, участвующих в транспорте L-треонина, и изучение их влияния на уровень продукции L-треонина

Выборная Т.В., Мокрова С.С., Юзбашев Т.В.

НИЦ «Курчатowski институт» – ГосНИИГенетика, 117545, Москва, 1-й Дорожный пр-д, д. 1.

e-mail: tatyana-vybornaya@yandex.ru

doi: 10.21519/0234-2758-2018-S-52-52

В современной биотехнологии важнейшую роль играет конструирование и использование штаммов-продуцентов незаменимых аминокислот в том числе L-треонина. В качестве микроорганизма, продуцирующего треонин в мировой практике были попытки использовать бактерии *Corynebacterium glutamicum*, *Serratia marcescens*, *Providencia rettgeri*, однако безусловными лидерами по продуктивности оказались штаммы *Escherichia coli*.

Природные штаммы *E. coli* обладают всеми необходимыми для синтеза треонина ферментами, однако синтезируют его лишь в количестве, достаточном для жизнедеятельности микроорганизма. Для создания промышленного штамма-продуцента треонина требуется осуществлять глубокую реконструкцию метаболических путей синтеза генетическими методами. Общая стратегия генно-инженерного конструирования штамма-продуцента треонина может включать следующие этапы: усиление транспорта глюкозы в клетку; усиление пути синтеза треонина; инактивацию боковых метаболических путей; блокирование деградации треонина в клетке; усиление транспорта треонина из клетки; блокирование транспорта треонина в клетку.

В настоящее время известно три транспортера треонина. Два гена *E. coli* (*sstT* и *tdcC*) кодируют транспортеры, специфически транспортирующие в клетку треонин и серин. Около 40% треонина поступают в клетку через неспецифическую транспортную систему LIVI (гены *livJ*, *livM*, *livF* и *livH*), которая может также переносить ряд других аминокислот включая лейцин, изолейцин, валин, аланин, серин и гомосерин.

В представленной работе обнаружен новый ген, участвующий в транспорте треонина. Основываясь на функции, ген назван *tupA* (threonine uptake protein). Изучено влияние делеции исследуемого гена на скорость поглощения клетками C^{14} -треонина. Сравнительный анализ гена *tupA* с известными транспортерами показал низкую гомологию между исследуемыми генами, что косвенно свидетельствует об обнаружении нового семейства транспортеров аминокислот. Проверено влияние делеции $\Delta tupA::SC$ на продукцию треонина в штамме B1175 из лабораторной коллекции ВКПМ. По результатам проведенной ферментации установлено, что введение делеции гена *tupA* оказывает положительный эффект на уровень продукции треонина.

Работа выполнена при финансовой поддержке государства в лице Минобрнауки России (Уникальный идентификатор проекта – RFMEFI61017X0011) с использованием УНУ – Национальный биоресурсный центр «Всероссийская коллекция промышленных микроорганизмов» НИЦ «Курчатowski институт» – ГосНИИГенетика.

Секция 2

**Метаболическая инженерия
суперпродуцентов клеточных
метаболитов (аминокислоты,
органические кислоты, витамины)**

Резюме метаболической инженерии продуцента фенилаланина *Escherichia coli*

Дорошенко В.Г., Машко С.В.

Научно-исследовательский институт Аджиномото-Генетика (ЗАО «АГРИ»),
1-й Дорожный проезд, д. 1-1, Москва 117545; тел.: +7 (495) 314-81-73.
e-mail: vera_doroshenko@agri.ru

doi: 10.21519/0234-2758-2018-S-54-54

Производство низкокалорийного подсластителя аспартама (N-L-а-аспартил-L-фенилаланина 1-метиловый эфир), входящего в рецептуру известных напитков, включая «Кока-Кола», стимулировало разработку продуцента Фен. Идеология конструирования штаммов *E. coli* основывалась на хорошо изученном биосинтезе ароматических аминокислот в кишечной палочке и изложена в многочисленных обзорах (Дорошенко с соавт., 2014). Продуценты фенилаланина *E. coli* были ауксатрофами по тирозину. Последний признак предотвращал побочную продукцию Тир, являющуюся следствием почти идентичных (за исключением двух последних реакций) путей синтеза Тир и Фен в *E. coli*. Для ключевых ферментов биосинтеза Фен, регулирующихся по типу обратной связи, ДАНР-синтазы и хоризматсинтазы/префенатдегидратазы были получены эффективные мутации, снимающие ретроингибирование (Kikuchi et al., 1997, Патент EP 0488424B1). Амплифицировали гены биосинтеза Фен из хоризмата, общего ароматического пути и гены ферментов общего метаболизма, ответственные за пулы фосфоенолпирувата и эритрозо-4-фосфата.

При усовершенствовании продуцента Фен в ЗАО «АГРИ» были разработаны некоторые новые подходы, которые были опубликованы. Решающим для создания высокоактивных штаммов-продуцентов аминокислот *E. coli*, в том числе и Фен, явилось открытие транспортных систем, способных с различной специфичностью экспортировать из клетки разные аминокислоты (Лившиц, 2006). Среди двух первоначально идентифицированных экспортеров Фен YedA и YddG, последний был охарактеризован как экспортер ароматических аминокислот (Doroshenko et al., 2007).

Ауксотрофия по Тир ставила продукцию Фен в прямую зависимость от себестоимости Тир. С помощью модулирования уровня белка TugA с использованием механизма деградации неполноценных белков при транс-трансляции был получен продуцент Фен, не нуждающийся в Тир и не продуцирующий его в качестве примеси (< 0,1%) (Doroshenko et al., 2010A).

При усилении ДАНР-синтазы за счет увеличения числа копий гена *aroG4* в хромосоме было замечено снижение активности промотора P_{aroG} в стационарной фазе, являющейся основной продуктивной фазой при используемом процессе с подпиткой глюкозой. Для поддержания активности ДАНР-синтазы в стационарной фазе был успешно использован промотор фосфорного регулона P_{pstS} (Doroshenko et al., 2010B). Выбор промоторов фосфорного регулона был сделан на основе изучения эффекта лимитации по фосфору на продукцию Фен. Штаммы, содержащие P_{pstS} -*aroG4* и P_{phoA} -*aroG4* в виде дополнительных копий, продуцировали больше Фен из глюкозы в ферментации без подпитки, чем штамм с P_{aroG} -*aroG4*. Основной синтез Фен в первых двух штаммах индуцировался после индукции Pho-регулона, происходившей во второй половине экспоненциальной фазы роста, когда накопление биомассы составляло не более 70% от конечной величины. На этом примере продемонстрирована возможность метаболической регуляции синтеза Фен в *E. coli*.

Анализ метаболических потоков в штаммах *E. coli*, основанный на ГХ-МС измерении распределения ^{13}C изотопов в протеиногенных аминокислотах, РНК и гликогене

Ковалева Е.С., Шепелин Д.Д., Голубева Л.И., Бабошин М.А., Шуплецов М.С., Машко С.В.

ЗАО «Научно-исследовательский институт Аджиномото-Генетика» (ЗАО «АГРИ»).
117545, Москва, 1-й Дорожный проезд, д. 1 корп. 1, e-mail: ekaterina_kovaleva@agri.ru

doi: 10.21519/0234-2758-2018-S-55-55

В настоящее время ^{13}C -анализ метаболических потоков (^{13}C Metabolic Flux Analysis, ^{13}C -MFA) представляет собой мощный инструмент для количественной характеристики метаболизма углерода в различных организмах, что играет ключевую роль в системной биологии и метаболической инженерии.

^{13}C -MFA основан на использовании субстрата, меченного стабильными изотопами углерода – ^{13}C , которые распределяются по продуктам метаболизма в зависимости от активности соответствующих метаболических путей. Массовое изотопное распределение (Mass Isotopomer Distribution, MID) является основной измеряемой характеристикой насыщения клеточных метаболитов тяжёлыми изотопами. С этой точки зрения метод газовой хроматографии–масс-спектрометрии (ГХ–МС), обладая высокой чувствительностью, надёжностью, точностью и воспроизводимостью, позволяет получить достаточно информации о распределении изотопной метки для расчёта метаболических потоков.

Большинство ^{13}C -MFA исследований базируются на ГХ–МС измерениях протеиногенных аминокислот (ПА) – стабильного и легкодоступного пула метаболитов, который содержит в себе информацию о 8 из 12 интермедиатах центрального метаболизма. Набор измеряемых на ГХ–МС аминокислот отражает распределение меченых изотопов в 7 центральных метаболитах, лишь один из которых представляет верхнюю часть метаболизма, что может существенно ухудшить разрешение потоков в этой области. Поэтому становится актуальным вопрос о насыщении дополнительными экспериментальными данными для обеспечения высокой точности и воспроизводимости при расчёте потоков.

Ранее было показано, что информация о меченности глюкозы из гликогена и рибозы из РНК может быть использована для улучшения разрешения потоков в верхней части метаболизма. В данной работе этот подход был применен для исследования мутантов *E. coli* по оксидативной ветке Пентозофосфатного пути – *Δzwf* и *Δgnd*. С этой целью нами был адаптирован и оптимизирован метод для экстракции и ГХ-МС анализа мономеров рибозы и глюкозы.

В результате работы было показано, что добавление информации о меченности сахаров значительно увеличивает точность и разрешение рассчитанных потоков. Совместное использование данных по ПА, рибозе и глюкозе позволило статистически достоверно определить отсутствие потока через 6-фосфоглюконатдегидрогеназную реакцию в *Δgnd* мутанте, чего не достигалось при использовании только ПА. Применение данного подхода особенно актуально в условиях постоянного увеличения сложности метаболических моделей и некоторой вариативности набора измерений в различных экспериментах.

С другой стороны, совместное использование более дешёвого субстрата и дополнительной информации о меченности РНК и гликогена позволяет существенно уменьшить стоимость эксперимента без значительного ухудшения разрешения потоков.

Программные средства для построения и анализа сложных моделей микробного метаболизма и микробных сообществ

Лашин С.А.^{1,2,*}, Матушкин Ю.Г.^{1,2}, Клименко А.И.¹, Афонников Д.А.^{1,2}, Казанцев Ф.В.¹, Лихошвай В.А.¹, Мустафин З.С.¹, Колчанов Н.А.^{1,2}

¹ Федеральный исследовательский центр институт цитологии и генетики СО РАН, г. Новосибирск, пр. Академика Лаврентьева 10

² Новосибирский Государственный Университет, г. Новосибирск, ул. Пирогова 1
e-mail: lashin@bionet.nsc.ru

doi: 10.21519/0234-2758-2018-S-56-56

В работе приводится описание программного комплекса «**Гаплоидный эволюционный конструктор 3D**» (**ГЭК 3D** [1,2], <http://evol-constructor.bionet.nsc.ru/>), предназначенного для компьютерного моделирования эволюции и функционирования микробных сообществ с учётом их пространственной организации. В основе ГЭК 3D лежит агентно-ориентированная многоуровневая модель, учитывающая следующие уровни биологической организации: генетический, метаболический, клеточный, популяционный и экологический. Для каждого уровня реализованы библиотеки подмоделей, что позволяет исследовать комплексную модель, комбинируя различные сочетания подмоделей между собой. Наиболее представленной является библиотека метаболических подмоделей, в которой содержатся как простые модели отдельных метаболических реакций, так и сложные модели метаболических систем.

В работе также приводится описание Интернет-доступного программного комплекса **МАММОТh** [3] (<http://mammoth.biomodsgroup.ru>), содержащем базу данных и средства построения комплексных моделей молекулярно-генетических систем бактерий, часть из которых также представлена в ГЭК 3D.

В заключительной части работы приводится описание **Портала биоресурсных коллекций микроорганизмов** [4] (<http://www.biores.cytogen.ru/microbes/>), созданного в рамках единой информационной системы биоресурсных коллекций институтов ФАНО России (<http://www.biores.cytogen.ru>). Портал является площадкой, на которой организации-держатели коллекций могут разместить информацию о единицах хранения своих коллекций, а также другие данные по коллекциям, включая ссылки на собственные каталоги. Для автоматизации работы с порталом реализован также доступ к базе данных посредством программного протокола **REST API**.

[1] Lashin S.A. et al (2014) NEC 2.0: improved simulation of the evolution of prokaryotic communities // Математическая биология и биоинформатика 9 (2), 585-596.

[2] Klimenko A.I. et al (2016) Bacteriophages affect evolution of bacterial communities in spatially distributed habitats: a simulation study // BMC microbiology 16 (1), S10.

[3] Kazantsev F.V. et al (2018) MAMMOTH: a new database for curated MAtheMatical Models of bioMOlecular sysTems // J bioinf. comp. biol. 16 (01), 1740010.

[4] Казанцев Ф.В. и др. (2018) Протокол работы с информационной системой по биоресурсным коллекциям институтов ФАНО России на примере коллекции микроорганизмов // Вавиловский журнал генетики и селекции 22 (2), 279-284.

Направленная регуляция активности промотора нитрилгидратазы в экспрессионной системе в бактериях *Rhodococcus rhodochrous*

Шемякина А.О.^{*}, Гречишникова Е.Г., Новиков А.Д., Калинина Т.А., Лавров К. В., Глазунов А.В., Яненко А.С.

НИИЦ «Курчатовский институт» – ГосНИИГенетика, 117545, Москва, 1-й Дорожный пр-д, д. 1
e-mail: haletod@rambler.ru

doi: 10.21519/0234-2758-2018-S-57-57

Бактерии рода *Rhodococcus* перспективны для создания новых катализаторов, используемых в биотехнологии. На сегодняшний день коммерциализированы процессы получения акриловых мономеров, витаминов, фармацевтических субстанций с помощью биокатализаторов на основе клеток *Rhodococcus*, содержащих высокие внутриклеточные концентрации необходимых ферментов, и разрабатывается ряд новых процессов.

Экспрессионная система в бактериях *Rhodococcus*, сконструированная нами ранее, основана на сильном промоторе генов нитрилгидратазы (Р-НГ) из *R. rhodochrous* М8, и обеспечивает синтез целевого фермента до 50% от растворимых внутриклеточных белков, что является одним из лучших показателей для бактерий в целом, и самым высоким уровнем для родококков. В настоящей работе изучена возможность направленного регулирования активности этого промотора. Для этого использовался штамм *R. rhodochrous* М33, содержащий гены нитрилгидратазы под контролем Р-НГ, и его производные, содержащие под контролем Р-НГ гены металлонеинзависимых ферментов - ациламидазы *aam* из *R. erythropolis* ТА37 и нитриказы *nitC1* из *Alcaligenes denitrificans* С-32. Для оценки активности Р-НГ использовался RT-qPCR и активности указанных репортёрных ферментов. Активность промотора изучалась в динамике, при выращивании культур в жидких питательных средах.

Было показано, что активность Р-НГ независимо индуцируется амидами (в т.ч. мочевиной), ионами кобальта, и, кроме того, подвержена катаболитной репрессии-дерепрессии. В результате, путём комбинирования в питательной среде недорогих компонентов, оказалось возможным выращивать клетки с удельной активностью в диапазоне трёх порядков (от 0.01 до 6-7 единиц). Индукция Р-НГ нарастала при использовании следующих добавок в минимальную питательную среду: 1) глюкоза, аммоний; 2) глюкоза, мочевина; 3) глюкоза, мочевина, кобальт; 4) ацетат, мочевина, кобальт. Дополнительно было показано, что профили индукции Р-НГ кобальтом и мочевиной различаются. При добавке кобальта активность Р-НГ начинает нарастать сразу (ещё до первой генерации клеток), а эффект мочевины проявляется только при переходе культуры в стационарную фазу роста. Относительные уровни мРНК хорошо коррелировали с активностями репортёрных ферментов.

Использование сильных и одновременно хорошо регулируемых промоторов является важным компонентом успеха при разработке бактериальных продуцентов. Экспрессионный инструментарий для бактерий *Rhodococcus* недостаточно разработан для полноценного использования этих бактерий в современной биотехнологии. Представленные результаты создают базис для эффективного конструирования как биокатализаторов, так и продуцентов метаболитов на основе этих бактерий.

Финансирование: работа выполнена при поддержке Российского Научного Фонда (соглашение № 16-14-00216).

Использование коринебактериальных штаммов – продуцентов лизина как платформы для создания продуцентов разветвлённых аминокислот

Шереметьева М.Е., Ануфриев К.Э., Каменева С.В., Яненко А.С.

НИЦ «Курчатовский институт» – ГосНИИгенетика, 117545, Москва, 1-й Дорожный пр-д, д. 1.
Лаборатория молекулярной биотехнологии, e-mail: m.e.sheremetieva@gmail.com

doi: 10.21519/0234-2758-2018-S-58-58

В условиях растущего населения интенсификация животноводства – проблема, стоящая перед сельским хозяйством всего мира. Решить её невозможно без повышения питательной ценности кормов, достигаемой при помощи кормовых добавок. Важнейшие из добавок – незаменимые аминокислоты, в том числе аминокислоты с разветвлённой боковой цепью (валин, изолейцин и лейцин), применение которых ведёт к повышению качества мяса и позволяет использовать корма с меньшим содержанием сырого белка. Производство таких аминокислот в России пока отсутствует; его внедрение – существенный элемент продовольственной безопасности нашей страны.

Основной способ получения аминокислот – биотехнологический, представляющий собой ферментацию сахаров при помощи штаммов-продуцентов (микроорганизмов с искусственными изменениями генетической программы, приводящими к сверхсинтезу целевых продуктов). Почвенная бактерия *Corynebacterium glutamicum*, безопасная для человека и животных, изученная в метаболическом отношении и простая для выращивания, крайне привлекательна с точки зрения создания продуцентов на её основе.

В нашей лаборатории методами метаболической инженерии были разработаны штаммы – продуценты лизина, несущие генетические модификации, направленные не только на активацию ферментов, ответственных за биосинтез целевого продукта, но и на усиление метаболических путей, в которых образуются необходимые предшественники и кофакторы. К таким путям относятся гликолиз и пентозофосфатный восстановительный путь (источники пирувата и НАДФН, соответственно), повышенная активность которых очень выгодна и для продукции валина. Кроме того, для продуцентов лизина отработан протокол ферментации, а их клеточная стенка содержит изменения, многократно повышающие эффективность трансформации, что облегчает дальнейшие манипуляции с геномом. Нашей задачей было оценить возможность перенаправления потоков метаболитов в клетках от биосинтеза лизина к биосинтезу валина, и, следовательно, использования продуцентов лизина как платформы для создания продуцента валина.

В качестве базового был избран штамм, имеющий сниженную продукцию по лизину, но сохранивший остальные перечисленные качества. Результатом модификаций, одна из которых (*ΔilvA*) привела к прекращению образования изолейцина – процесса, конкурирующего с биосинтезом валина за ферменты и субстраты, а другая (мутация в гене *ilvN*) сняла ретроингибирование первого из этих ферментов, стало появление у клеток способности продуцировать валин, причём продукция достигала 80 г/л за 72 часа. Недостатком штамма было заметное образование лизина (40-50 г/л), однако после замены одного из генов (*lysC*), кодирующих ферменты биосинтеза лизина, геном дикого типа этот показатель уменьшился вдвое.

Таким образом, проведённые эксперименты показали, что штаммы *C. glutamicum* – продуценты лизина обладают прекрасным потенциалом для создания на их основе штаммов – продуцентов валина, а также родственных аминокислот, в синтезе которых задействованы те же самые субстраты и ферменты.

Микробиологический синтез молочной кислоты кислотоустойчивыми дрожжами *Schizosaccharomyces pombe* при низких значениях рН

Шутов А.В., Фёдоров А.С., Синеокий С.П.

НИЦ «Курчатовский институт» – ГосНИИГенетика, 117545, Москва, 1-й Дорожный пр-д, д. 1.
e-mail: artiomka666@gmail.com

doi: 10.21519/0234-2758-2018-S-59-59

Молочная кислота является не только важной частью метаболизма, но и широко используемым веществом во многих отраслях промышленности. На сегодняшний день рынок молочной кислоты стабильно растет, и она находит применение в новых сферах, что приводит к поискам новых способов получения, стремлению к удешевлению производства.

В промышленных масштабах этот процесс, основанный на биоконверсии углеводсодержащего сырья, ведется уже почти век. Используются в основном культуры молочнокислых бактерий *Lactobacillus*. Процесс биоконверсии осуществляется в различных режимах культивирования, как в периодическом, так и в непрерывном, но чаще всего подразумевает необходимость контроля уровня рН путем подтитровки или постоянным удалением молочной кислоты из ферментационного раствора. Поддержание постоянного уровня рН в таком процессе приводит к получению вместе с молочной кислотой огромного количества неликвидного гипса как побочного продукта процесса выделения, который никак не утилизируется.

В связи с этим был разработан процесс получения молочной кислоты путем микробиологической конверсии глюкозы кислотоустойчивой культурой дрожжей *Schizosaccharomyces pombe*, который не требует применения титранта, а процесс выделения целевого продукта не сопряжен с получением большого количества побочных продуктов. Достигнута концентрация молочной кислоты в культуральной жидкости более 100 г/л, при концентрации побочных продуктов (глицерин, этанол) – не более 20 г/л суммарно, конверсия – 55%. Конечный рН культуральной жидкости 2,5 – 2,7, при котором не менее 95% молочной кислоты находится в форме свободной кислоты.

Секция 3

Методы редактирования геномов микроорганизмов

Адаптация метода интеграции рекомбинантной ДНК в бактериальную хромосому факультативного метилотрофа *Methylobacterium extorquens* AM1

Горшкова Н.В., Плеханова Н.С.*, Лобанова Ю.С., Токмакова И.Л., Стойнова Н.В.,
Машко С.В.

ЗАО «Научно-исследовательский институт Аджиномото-Генетика» (ЗАО «АГРИ»),
117545, Москва, 1-й Дорожный проезд, д.1 корп.1, e-mail: Natalia_Plekhanova@agri.ru

doi: 10.21519/0234-2758-2018-S-61-61

Methylobacterium extorquens представляет собой факультативную метилотрофную α -протеобактерию, способную оптимально адаптироваться к занимаемым экологическим нишам благодаря способности использовать в качестве источника углерода и энергии помимо метанола соединения, содержащие C-C-связи, такие как этиламин (C₂), пируват (C₃) и сукцинат (C₄).

Способность данного факультативного метилотрофа к утилизации различных субстратов подразумевает большой потенциал его использования для различных биотехнологических процессов, таких как биосинтез аминокислот, полисахаридов, кормового белка и иных продуктов. Примечательно, что для данного микроорганизма характерна низкая скорость роста на C₂ и C₄ субстратах, что существенно осложняет работу с этим микроорганизмом в лабораторных условиях.

Целью работы являлась разработка генно-инженерных подходов для редактирования генома *M. extorquens* AM1. В ходе работы были оптимизированы состав среды и параметры культивирования штаммов *M. extorquens* AM1, что позволило существенно (~ в три раза) увеличить скорость роста культуры по сравнению со скоростью роста в традиционно используемых для данного организма условиях. При помощи адаптивной эволюции были отобраны клоны, способные к более эффективной по сравнению со штаммом дикого типа утилизации сукцината натрия в качестве основного источника углерода.

Для интеграции рекомбинантной ДНК в геном *M. extorquens* AM1 была использована би-компонентная система транспозиции бактериофага Mu, разработанная ранее для *Escherichia coli* и адаптированная для *Methylophilus Methylophilus* и *Corynebacterium glutamicum* (Akhverdyan et al., 2011, Gorshkova et al., 2018). Эта система включала в себя две плазмиды: «хелперную», с репликоном широкого круга хозяев и термоиндуцибельными генами белков транспозиции MuAB и «интегративную», с mini-Mu(LE^{ex}R)-модулем, содержащим L- и R-концевые участки ДНК фага Mu, а также энхансер транспозиции E, который мог быть удален в результате Cre/*lox*-зависимой сайт-специфической рекомбинации. В качестве селективных маркеров использовались гены антибиотической устойчивости и ген флуоресцентного белка YFP. Возможность эффективной транспозиции mini-Mu элементов из интегративной плазмиды, а также в результате внутривнутрихромосомальной амплификации была подтверждена совокупностью генетических и биохимических методов, а также с помощью изучения флуоресценции целевых интегрантов.

**Свойства ДНК-геликазы, кодируемой геном
uvrD Deinococcus radiodurans R1,
при клонировании в клетках *Escherichia coli* K-12**

Гулевич Е.П., Кузнецова Л.В., Киль Ю.В., Вербенко В.Н.*

Петербургский институт ядерной физики им. Б.П. Константинова НИЦ «Курчатовский институт», 188300, Ленинградская обл., г. Гатчина, мкр Орлова роща, д. 1.

e-mail: verbenko_vn@pnpi.nrcki.ru

doi: 10.21519/0234-2758-2018-S-62-62

Ген *uvrD* кодирует геликазу II, которая играет важную роль в эксцизионной репарации нуклеотидов, коррекции ошибочно-спаренных оснований и репликации ДНК у прокариот. Известно также о ее участии в репарации брешей в ДНК по механизму RecFOR-зависимой рекомбинационной репарации. Вместе с тем её вклад в рекомбинационную репарацию ДНК может быть недооценен из-за наличия в *Escherichia coli* активного RecBCD-зависимого пути рекомбинационной репарации. У крайне радиоустойчивой бактерии *Deinococcus radiodurans* функционирует единственный RecFOR-путь рекомбинационной репарации, и на этом фоне вклад геликазы II как в репарацию одонитевых брешей, так и наиболее опасных повреждений – двунитевых разрывов ДНК, является определяющим

Целью этой работы стало клонирование репаративной геликазы *uvrD* бактерии *D. radiodurans* в клетках *E. coli* и изучение её способности комплементировать мутации в различных геликазах и восстанавливать радиоустойчивость данного микроорганизма.

Фрагмент геномной ДНК радиоустойчивой бактерии *Deinococcus radiodurans* с геном *uvrD*, кодирующим ДНК-геликазу II, был клонирован в клетках модельного объекта – *Escherichia coli* K-12. Плазмида pCR 2.1-*uvrD*⁺ восстанавливает радиорезистентность к ультрафиолетовому свету мутантных клеток *E. coli uvrD*⁻, *helD*⁻ и *rep*⁻, дефектных по репаративной геликазе II, геликазе IV и репликативной геликазе Rep, соответственно, практически до уровня дикого типа AB1157 (*uvrD*⁺) и, в меньшей степени, штамма с мутацией в гене *recQ*, кодирующем ключевую геликазу рекомбинационной репарации RecQ. Защитный эффект также замечен при облучении штаммов с плазмидой γ -лучами. Выравнивание первичной последовательности геликазы II *D. radiodurans* с 4 геликазами *E. coli* с использованием программы BLASTP НЦБИ (США) показало, что идентичность составляет 35% для пары UvrD_{Dr}/UvrD_{Ec}, 38% для UvrD_{Dr}/Rep_{Ec} и 27% для UvrD_{Dr}/HelD_{Ec}. Однако характерные мотивы геликазы II, представленные семью элементами, оказались весьма консервативными и практически совпадают у геликаз UvrD_{Dr}, UvrD_{Ec}, Rep_{Ec} и HelD_{Ec}. Особый случай представляет геликаза RecQ_{Ec}, относящаяся к другому семейству, у которой из всей последовательности только один небольшой участок на С-конце, присущий всем геликазам, совпадает с UvrD_{Dr}. Несмотря на это, субстратная специфичность UvrD *D. radiodurans* в значительной степени совпадает с предпочтениями RecQ *E. coli*. Таким образом, установлены широкие функциональные возможности геликазы UvrD *D. radiodurans*.

Редактирование генома микроводоросли *Chlamydomonas reinhardtii* с использованием технологии CRISPR-Cas9

Сизова И.А.¹, Kelterborn S.², Hegemann P.², Вербенко В.Н.¹

¹ Петербургский институт ядерной физики им. Б.П. Константинова НИЦ «Курчатовский институт», Россия, 188300, Ленинградская обл., г. Гатчина, мкр Орлова роща, д. 1;

² Institute of Biology, Experimental Biophysics, Humboldt Universität Berlin, Berlin, Germany.
e-mail: sizova_ia@pnpi.nrcki.ru, irinasiz@yahoo.com

doi: 10.21519/0234-2758-2018-S-63-63

Одноклеточная микроводоросль *Chlamydomonas reinhardtii* (хламидомонада) — один из самых популярных модельных организмов для изучения фотосинтеза, структуры и функций сенсорных фоторецепторов, фотоповедения, а также перспективный объект для биотехнологии. Созданы трансгенные штаммы, накапливающие активные эукариотические белки в хлоропласте. Актуальной задачей является конструирование клеток, экспрессирующих трансгены в ядре, у которых происходит корректное гликозилирование и секреция синтезированных белков млекопитающих. Для фундаментальных исследований и создания штаммов с заданными свойствами для биотехнологии необходимо использовать современные методы редактирования геномов. Ранее для хламидомонады мы разработали протоколы направленной инактивации генов с использованием цинк-пальцевых нуклеаз (Sizova et al., 2013) и рибонуклеопротеинового комплекса CRISPR Cas9-gRNA (Greiner et al., 2017) и инактивировали 25 фоторецепторных и других генов, мутации в которых не имеют селективируемого фенотипа. Секвенирование показало, что при расщеплении ДНК нуклеазой Cas9 точная репарация двухцепочечных разрывов (ДЦР) путем гомологичной рекомбинации (ГР) с внесенной в клетку донорной ДНК наблюдается только у 10 % мутантных клеток, так как ГР часто сопровождается внедрением дополнительных фрагментов векторной ДНК или хромосомы по сайтам разрыва. Целью работы является получение новых знаний о путях репарации у *Chlamydomonas* и повышение частоты и точности генных модификаций с использованием нуклеазы Cas9. Для этого использовали подход, основанный на манипуляциях с генами репарации путем негомологичного воссоединения концов NHEJ. Мы приготовили ноль-мутанты по генам KU70, KU80 ключевых белков канонического cNHEJ и гену POLQ ДНК полимеразы Theta альтернативного пути altEJ репарации NHEJ. Клетки, содержащие различные ноль-аллели ku80, ku70, polQ, охарактеризовали по частоте интеграции маркерных плазмид и донорной ДНК по участкам расщепления нуклеазой Cas9, в случайные точки генома, спектрам мутаций, а также по уровню устойчивости к ДНК-повреждающим агентам зеоцину и метилметансульфонату. Полученные результаты показали, что у *Chlamydomonas reinhardtii* главным белком, ответственным за сайт-направленный мутагенез и репарацию разрывов, произведенных нуклеазой Cas9, является ДНК полимеразы Theta. Инактивация генов KU80, KU70 или POLQ не увеличивает частоту и точность Cas9-индуцированных модификаций генов.

Разработка системы редактирования генома *Corynebacterium glutamicum* и её использование для создания штаммов, обладающих сверхпродукцией L- лизина

Шустикова Т.Е., Леонова Т.Е., Калинина Т.И., Токмакова И.П., Герасимова Т.В., Дербиков Д.Д., Рябченко Л.Е., Каменева С.В., Яненко А.С.

НИЦ «Курчатовский институт» – ГосНИИГенетика, 117545, Москва, 1-й Дорожный пр-д, д. 1.
e-mail: l.gyabchenko@mail.ru

doi: 10.21519/0234-2758-2018-S-64-64

Создание штаммов-продуцентов аминокислот, включая продуценты L-лизина, предполагает глубокую реконструкцию метаболизма клеток путем направленной модификации генома с помощью методов редактирования.

Разработана система введения направленных модификаций генома клеток *C. glutamicum*, основанная на гомологичной рекомбинации. Система позволяет осуществлять все типы модификаций: делеции, инсерции, замещения регуляторных областей. Секвенирование участков, в которых произошли модификации, продемонстрировало высокий уровень специфичности рекомбинационных событий. Из более 100 полученных модификаций только в 1 случае обнаружены незапланированные перестройки.

Разработанная система была использована для направленной модификации генома клеток *C. glutamicum* с целью создания штамма-суперпродуцента L-лизина. В первую очередь были модифицированы анаэробные пути, вовлеченные в процесс образования оксалоацетата – важнейшего предшественника лизина. Известно, что оксалоацетат в клетках *C. glutamicum* может синтезироваться различными путями, основными из которых являются карбоксилирование пирувата с помощью пируват карбоксилазы (ген *pus*) и карбоксилирование фосфоенолпирувата с помощью фосфоенолпируват карбоксилазы (ген *pps*). Получение и анализ мутантов, у которых заблокированы пути карбоксилирования (*pps*, *pus*), показал, что существенное снижение синтеза лизина наблюдалось при инактивации гена *pps*. По-видимому, именно этот путь образования оксалоацетата является основным в штамме-продуценте.

Для конструирования штамма-суперпродуцента лизина с использованием методов редактирования были модифицированы свыше 20 генов. Эти модификации затронули все этапы синтеза лизина, начиная с транспорта субстрата (глюкозы) в клетку и заканчивая терминальными стадиями синтеза L-лизина. Для направленной реконструкции метаболизма были использованы различные виды модификаций: делеции генов (*psk*, *lysI*, *avtA*, *alaT*, *roh*, *ldh*, *sugCD*, *pgi*, *msc*), амплификации (*ddh*), замены нуклеотидов, приводящие к устойчивости ферментов к ретроингибированию (*lysC*, *pps*) или снижению их активности (*mur*), а также к ослаблению трансляции за счет изменения старт-кодона (*icd*) или наоборот к усилению трансляции за счет изменения фактора элонгации G. Для изменения уровня экспрессии ряда генов (*lysC*, *ddh*, *lysA*, *dapB*, *tkt* и др.) осуществляли замену их промоторов на конститутивные промоторы разной силы (промоторы генов *sod*, *eftu*, *leuC*). К увеличению синтеза лизина также приводила инактивация некоторых генов регуляторов – *ltbR*, *sugR*.

Созданный с помощью метаболической инженерии штамм, в геном которого было внесено 12 выбранных модификаций, способен накапливать свыше 200 г лизина за 50 часов культивирования в 42 л ферментере на среде с глюкозной патокой, полученной из зерна пшеницы. В настоящее время с использованием созданного штамма организовано промышленное производство важнейшей кормовой добавки – лизин сульфата на ЗАО «Завод премиксов №1», Белгородская обл. в объеме 55 тыс. тонн, что покрывает около 30% всех потребностей животноводства в России.

Секция 4

Биокатализ. Промышленная ферментация

Рациональное конструирование металлокарбоксипептидазы Т с измененной селективностью

Акпаров В.Х.^{1,*}, Тимофеев В.И.², Халиуллин И.Г.³, Константинова Г.Е.¹,
Ракитина Т.В.², Подшивалов Д.Д.⁴, Швядас В.К.⁴

¹ НИЦ «Курчатовский институт» – ГосНИИГенетика, 117545, Москва, 1-й Дорожный пр-д, д. 1.

³ НИЦ «Курчатовский Институт», 123182 Москва, пл. Академика Курчатова, д.1.

³ Московский физико-технический институт (государственный университет), Лаборатория ионной и молекулярной физики, Россия 141700, Московская область, Долгопрудный, Институтский пер.,9.

⁴Институт физико-химической биологии имени А.Н.Белозерского МГУ им. М.В.Ломоносова, 119991, Москва, Ленинские Горы 1/40.

e-mail: valery.akparov@yandex.ru

doi: 10.21519/0234-2758-2018-S-66-66

Проведено систематическое изучение взаимосвязи между организацией активного центра ряда металлокарбоксипептидаз и субстратной специфичностью ферментов. С использованием рентгеноструктурного анализа определены структуры высокого разрешения комплексов карбоксипептидаз Т из *Thermoactinomyces vulgaris* (КПТ) и панкреатической карбоксипептидазы В (КПВ), а также их мутантов с ингибиторами-аналогами основного и переходного состояния расщепления аргинин-, глутамил-, лейцил- и фенилаланин-содержащих субстратов. Анализ полученных структурных и кинетических данных показал, что важнейшую роль в определении субстратной специфичности родственных ферментов играют подвижная петля активного центра, включающая остатки Leu254 и Trp255, консервативные остатки Asp263 и Leu211, являющиеся фактором дискриминации гидрофобных и заряженных субстратов, а также фиксированные молекулы воды. Дистантной детерминантой субстратной специфичности КПТ являются структурные ионы кальция. Показана корреляция эффективности катализа различных субстратов от длин водородных связей между атомами, имитирующими атомы расщепляемой связи в стабильном аналоге тетраэдрическом переходного комплекса, и каталитическим остатком Glu277. Пространственные структуры КПТ в комплексах были параметризованы с помощью силового поля AMBER и построена расчетная модель, правильно воспроизводящая структуры комплексов мутантов КПТ с ингибиторами. С учетом полученной информации созданы мутанты микробной КПТ, превосходящие по селективности панкреатическую КПВ и пригодные для конверсии рекомбинантного проинсулина в инсулин.

Работа выполнена при поддержке гранта РНФ17-14-01256.

Получение L-лактатоксидазы из дрожжей *Yarrowia lipolytica* в биореакторах

Бирюкова Е.Н., Аринбасарова А.Ю., Меденцев А.Г.

Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН
142290, г. Пушкино, пр-т Науки, д. 5; e-mail: biryukovae05@rambler.ru

doi: 10.21519/0234-2758-2018-S-67-67

L-лактатоксидаза (КФ 1.1.3.15) – флавиновый фермент, катализирующий окисление L-лактата до пирувата с восстановлением кислорода до пероксида водорода. На основе лактатоксидазы созданы биосенсоры, используемые в медицине, виноделии и производстве продуктов питания. Фермент широко применяется для определения содержания L-лактата в крови и других физиологических жидкостях человека при различных патологических состояниях. Содержание метаболита является также важным показателем при производстве вина, молочных и мясных продуктов.

Фермент обнаружен у бактерий *Aerococcus viridans* [1], *Streptococcus faecalis* [2], *Pediococcus* sp. [3], *Mycobacterium smegmatis* [4], а также у гриба *Geotrichum candidum* [5]. Был разработан способ получения L-лактатоксидазы с использованием в качестве продуцента бактерий *Acetobacter suboxydans* var. *muciparum* frateur N CIB 5595 [6].

Способность к синтезу L-лактатоксидазы была также обнаружена у дрожжей *Yarrowia lipolytica* [7].

Цель работы - получение L-лактатоксидазы при культивировании дрожжей *Y. lipolytica* в биореакторах лабораторного типа.

В работе использовали дрожжи *Y. lipolytica* ВКМ Y-2378, полученные из ВКМ (ИБФМ РАН). Продуцент был отобран в результате скрининга штаммов *Y. lipolytica*. Дрожжи выращивали в условиях погруженного культивирования в биореакторах усовершенствованной конструкции на основе АНКУМ-2М. Показано, что в оптимальном режиме при использовании комбинированной среды роста, содержащей глюкозу (2%) и L-лактат (1%), продуктивность достигала $3.2 \text{ E} \times \text{л}^{-1} \times \text{ч}^{-1}$, накопление фермента - 75 Е/л.

L-лактатоксидаза была выделена из культуральной жидкости и очищена в 251 раз до гомогенного состояния с использованием гидрофобной и ионообменной хроматографии с выходом 45%. Удельная активность составляла 55.3 Е/мг белка, что более чем в 40 раз выше таковой у фермента из *A. suboxydans* [6]. Кроме того, используемый в нашей работе субстрат (L-лактат) является стандартным (контролируемым) в отличие от субстрата роста *A. suboxydans* - молочной сыворотки.

Молекулярная масса L-лактатоксидазы определена как 200-230 кДа, фермент является тетрамером - денатурирующий электрофорез в ПААГе показал наличие одной полосы в области 50-56 кДа. рН-Оптимум L-лактатоксидазы определен как 7.0 - 8.5. Показана строгая специфичность к L-лактату, фермент не окислял fumarat, пируват, сукцинат, аскорбат, дигидроксиацетон, гликолат, D-лактат, а также D, L-аланин и D,L-2-гидроксипутират.

1. Duncan et al. // Biochem. Biophys. Res. Commun. 1989. V. 164. P. 919-926. 2. Takemori et al. // J. Biol. Chem. 1968. V. 243. P. 313-319. 3. Tzanetakis et al. // J. Dairy Sci. 1989. V. 72. P. 859-863. 4. Atsusi et al. // J. Ferment. Bioeng. 1998. V. 85. P. 507-510. 5. Sullivan P.A. et al. // Biochem. J. 1977. V. 165. P. 375-383. 6. Лукошявичене Н.Н. и др. Патент SU №1521774 А1, 15.11.1989 г. 7. Бирюкова и др. //Микробиология. 2009. Т. 78. С. 716-718.

Новая эндо-1,3(4)-β-глюканаза из бактерий *Paenibacillus jamilae* Bg1

Борщевская Л.Н., Гордеева Т.Л.* , Калинина А.Н., Синеокий С.П., Федоров А.С.

НИЦ «Курчатовский институт» – ГосНИИгенетика, 117545, Москва, 1-й Дорожный пр-д, д. 1.
e-mail: tatiana.gordeeva@mail.ru

doi: 10.21519/0234-2758-2018-S-68-68

Эндо-1,3(4)-β-глюканаза является ферментом, катализирующим гидролитическое расщепление β-1,3- или β-1,4-связей в β-глюканах.

β-глюканы представляют собой водорастворимые некрахмальные полисахариды. Они являются естественным компонентом клеточных стенок ячменя – основного компонента комбикормов для сельскохозяйственных животных. β-глюканы действуют как антипитательные агенты, препятствуя усвоению питательных веществ в гастроэнтеральном тракте моногастричных животных, что приводит к нарушению процессов пищеварения.

Наиболее эффективным способом снижения негативного влияния β-глюкана является применение ферментных препаратов эндо-1,3(4)-β-глюканаза, получаемых микробиологическим синтезом.

Необходимость поиска новых ферментов для сельского хозяйства обусловлена интенсивно возрастающими потребностями современного животноводства и птицеводства. Основное место на рынке РФ занимают импортные ферментные препараты, тогда как выпуск отечественных препаратов весьма ограничен.

Поиск новых эндо-1,3(4)-β-глюканаз с промышленно-ценными характеристиками для импортозамещения ферментных кормовых добавок является актуальной задачей.

В нашей лаборатории был проведен скрининг природных микроорганизмов, в результате которого был выделен новый бактериальный штамм *Paenibacillus jamilae* Bg1 (ВКПМ В – 13093), проявляющий β-глюканазную активность. Ген *bg11* из штамма *Paenibacillus jamilae* Bg1, кодирует секретлируемую эндо-β-1,3(4)-D-глюканазу Bg1 (Е.С. 3.2.1.6), состоящую из 213 аминокислот и 28 аминокислотных остатков предполагаемого сигнального пептида. Была проведена гетерологичная экспрессия гена *bg11* в промышленно используемых дрожжах *Pichia pastoris*, выделен и охарактеризован рекомбинантный фермент. Нуклеотидная последовательность гена *bg11* и аминокислотная последовательность зрелого белка Bg1 имеют наибольшую гомологию с последовательностями эндо-1,3(4)-β-глюканазы *Paenibacillus polymyxa* (90% и 90% соответственно). Рекомбинантный белок Bg1 показал высокую удельную активность, рН и термостабильность, а также устойчивость к пищеварительным ферментам. Характеристики нового фермента позволяют считать его перспективным для использования в кормопроизводстве, а способность гена *bg11* эффективно экспрессироваться в дрожжах *Pichia pastoris* открывает возможность создания высокопродуктивного промышленного штамма.

Работа выполнена при финансовой поддержке государства в лице Минобрнауки России (Уникальный идентификатор проекта -RFMEFI60717X0179) с использованием УНУ – Национальный биоресурсный центр «Всероссийская коллекция промышленных микроорганизмов» НИЦ «Курчатовский институт» – ГосНИИгенетика.

Новая эндо-1,4-ксилаза из бактерий *Bacillus pumilus XylPum41*

Калинина А.Н., Борщевская Л.Н., Гордеева Т.Л., Синеокий С.П.

НИЦ «Курчатовский институт» – ГосНИИгенетика, 117545, Москва, 1-й Дорожный пр-д, д. 1.
e-mail: anna.kalininaa@yandex.ru

doi: 10.21519/0234-2758-2018-S-69-69

Эндо-1,4-ксилаза является ферментом, катализирующим гидролитическое расщепление 1,4- β -связей в ксиланах.

Ксилан – основной представитель гемицеллюлоз в зерне и твердой древесине, является вторым по распространенности после целлюлозы возобновляемым полисахаридом в природе. Это комплексный полисахарид, основная цепь которого состоит из β -1,4-ксилопиранозильных остатков. Ксиланы, являясь одними из основных антинутриентов, содержащихся в кормовом сырье, препятствуют усвоению питательных веществ в ЖКТ моногастричных животных.

Наиболее эффективным способом снижения негативного влияния ксилана при производстве комбикормов является применение ферментных препаратов эндо-1,4-ксилаз.

Устойчивый рост производства животноводства и птицеводства требует разработки высококачественных комбикормов, в состав которых входят ферментные кормовые добавки. Основное место на рынке РФ занимают импортные кормовые ферментные препараты, тогда как выпуск отечественных весьма ограничен.

Поиск новых эндо-1,4-ксилаз, разработка высокоактивных отечественных рекомбинантных штаммов-продуцентов кормовых ферментов и масштабируемых технологий ферментации для импортозамещения ферментных кормовых добавок является актуальной задачей.

Был проведен скрининг природных микроорганизмов, в результате которого был выделен новый бактериальный штамм *Bacillus pumilus XylPum41*, проявляющий эндо-ксилазную активность. Ген *xylP* из штамма *Bacillus pumilus XylPum41*, кодирует секретлируемую эндо-1,4- β -ксилазу XylP (Е.С. 3.2.1.8), состоящую из 202 аминокислот и 27 аминокислотных остатков предполагаемого сигнального пептида. Была проведена гетерологичная экспрессия гена *xylP* в промышленно используемых дрожжах *Pichia pastoris*, выделен и охарактеризован рекомбинантный фермент. Нуклеотидная последовательность гена *xylP* и аминокислотная последовательность зрелого белка XylP имеют наибольшую гомологию с последовательностями эндо-1,4- β -ксилазы *Bacillus subtilis* (77% и 85%, соответственно). Рекомбинантный белок XylP показал высокую удельную активность, рН и термостабильность, а также устойчивость к пищеварительным ферментам и белковым ингибиторам ксиланаз. Характеристики нового фермента, а также способность гена *xylP* эффективно экспрессироваться в дрожжах *Pichia pastoris* позволяют считать его перспективным для использования в кормопроизводстве.

Работа выполнена при финансовой поддержке государства в лице Минобрнауки России (Уникальный идентификатор проекта - RFMEFI60717X0180) с использованием УНУ – Национальный биоресурсный центр «Всероссийская коллекция промышленных микроорганизмов» НИЦ «Курчатовский институт» – ГосНИИгенетика.

Лух-биосенсоры для исследования активности шаперонов в клетках *Bacillus subtilis*

Гнучих Е.Ю.¹, Кессенних А.Г.², Завильгельский Г.Б.,¹ Манухов И.В.^{1,2,*}

¹ НИЦ «Курчатовский институт» – ГосНИИгенетика, 117545, Москва, 1-й Дорожный пр-д, д. 1, Лаборатория генетики бактерий

² Московский физико-технический институт, Лаборатория молекулярной генетики, Московская обл., г. Долгопрудный.

e-mail: manukhovi@mail.ru

doi: 10.21519/0234-2758-2018-S-70-70

Бактериальные люциферазы используются в качестве модельных белков для исследования процессов фолдинга и рефолдинга белков как *in vivo*, так *and in vitro* [1]. Для исследования этих процессов *in vivo* в грам-положительных бактериях *Bacillus subtilis* в настоящей работе были сконструированы ярко светящиеся штаммы, несущие гены бактериальных люцифераз. Репортерные гены люцифераз были получены из морских психрофильных бактерий *Photobacterium leiognatii* и мезофильных *Vibrio harveyi*, из наземных мезофильных бактерий *Photorhabdus luminescens*, а также из светлячка *Luciola mingrellica*. В качестве промоторов для экспрессии *lux*-генов использовались конститутивные промоторы генов *ymdA* [2] (кодирует эндорибонуклеазу - RNase Y) и мутантный вариант этого промотора *PymdA-mut3*, *fbaA* (фруктозо-бифосфат альдолаза)[2], *repA* (репликон pLF1311) [3] и два индуцируемых промотора гена *xylA* (ксилозоизомеразы) с CRE и без CRE элемента [4]. Температурный оптимум люминесценции, использованных в настоящей работе люцифераз, различается от 24 до 39°C. В клетках *B. subtilis* термоинактивация люминесценции происходит сообразно термоустойчивости организмов из которых клонированы гены люцифераз: наиболее термочувствительна люцифераза из психрофильных бактерий *P. leiognatii*, а люцифераза из мезофильных *P. luminescens* самая термостабильная. Термоинактивация люцифераз *in vivo* показывает, что в клетках *B. subtilis* люциферазы гораздо более термостабильны, чем в клетках *Escherichia coli*. Сходные кинетики термоинактивации люминесценции *B. subtilis* и *E. coli* достигаются при температурах различающихся на 4-5 градусов. Подобный феномен наблюдается как для термочувствительной люциферазы из *P. leiognatii*, так и для более стабильной из *P. luminescens*.

Термостабильность люцифераз в клетках *E. coli*, существенно выше, чем *in vitro*. Этот феномен объясняется способностью люцифераз к DnaK-зависимому рефолдингу после термоинактивации [5]. В клетках *B. subtilis* по сравнению с клетками *E. coli* уровень и скорость рефолдинга термоинактивированных люцифераз резко снижен, несмотря на повышенную термостабильность. Рефолдинг термоинактивированных люцифераз в клетках *B. subtilis* не превышает 0,5-2% от начального уровня люминесценции и в отличие от клеток *E. coli*, не зависит от шаперона *DnaKJ*. Делеция по Триггер Фактору, который способен осуществлять DnaK-независимый рефолдинг в *E. coli* также не приводит к снижению рефолдинга в клетках *B. subtilis*. Таким образом, можно предположить наличие факторов в клетках *B. subtilis*, создающих условия для работы люцифераз при повышенных температурах и реализующих небольшой рефолдинг, не связанный с шапероном DnaKJ и Триггер Фактором.

Публикации:

1. Schroder, H., Langer, T., Hartl, F.-U. and Bukau, B. DnaK, DnaJ and GrpE form a cellular chaperone machinery capable of repairing heat-induced protein damage. (1993) EMBO J. 12, 4137-4144.
2. Guiziou S, Sauveplane V, Chang HJ, Clerke C, Declerck N, Jules M, Bonnet J. A part toolbox to tune genetic expression in *Bacillus subtilis*. Nucleic Acids Res. 2016;44(15):7495–7508.
3. Aleshin VV, Semenova EV, Doroshenko VG, Jomantas YV, Tarakanov BV, Livshits VA. The broad host range plasmid pLF1311 from *Lactobacillus fermentum* VKM1311. FEMS Microbiol Lett. 1999;178(1):47–53.
4. Kraus A, Hueck C, Gartner D, Hillen W. Catabolite repression of the *Bacillus subtilis* xyl operon involves a cis element functional in the context of an unrelated sequence, and glucose exerts additional xylR-dependent repression. J Bacteriol. 1994;176: 1738–1745.
5. Zavilgelsky GB, Kotova VY, Mazhul MM, Manukhov IV. Role of Hsp70 (DnaK-DnaJ-GrpE) and Hsp100 (ClpA and ClpB) chaperones in refolding and increased thermal stability of bacterial luciferases in *Escherichia coli* cells. Biochemistry (Mosc) 2002;67(9):986–92.

Структурно-функциональные особенности бактериолитических белков Л1 и Л5 *Lysobacter* sp. XL1

Кудрякова И.В.^{1*}, Габдулхаков А.Г.², Тищенко С.В.², Сузина Н.Е.¹,
Шишкова Н.А.³, Цфасман И.М.¹, Афошин А.С.¹, Васильева Н.В.¹

¹ Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН, 142290, Московская область, г. Пущино, пр-т Науки, д. 5.

² Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт белка РАН, 142290, Московская область, г. Пущино, ул. Институтская, д. 4.

³ Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии, 142279, Московская обл., Серпуховский р-н, пос. Оболенск
e-mail:kudryakovairina@yandex.ru

doi: 10.21519/0234-2758-2018-S-72-72

Внеклеточные бактериальные литические ферменты гидролизуют пептидогликан конкурентных бактерий, в т.ч. устойчивых к антимикробным препаратам. Такая специфичность действия делает эти белки ценными для медицины в качестве альтернативы антибиотикам, что определяет актуальность их изучения. Грамотрицательная бактерия *Lysobacter* sp. XL1 секретирует в окружающую среду пять бактериолитических ферментов Л1-Л5, на основе которых создан высокоэффективный антимикробный препарат наружного применения Лизоамидаза. Среди ферментов комплекса обращают на себя внимание две гомологичные бактериолитические сериновые протеазы Л1 и Л5, которые при этом отличаются по ряду биохимических свойств и топогенезу. Для понимания причин различий в свойствах гомологичных белков были проведены структурные исследования и дополнительная биохимическая характеристика. Структурный анализ выявил, что пространственные структуры этих белков идентичны на 63 %. При этом в ферменте Л5 выявлены структурные области, имеющие принципиальные отличия от эквивалентных областей гомолога. Интересные результаты были получены при сокристаллизации белка Л1 с ингибитором сериновых протеаз АЕBSF. Обнаружено, что часть молекул белка взаимодействует с ингибитором по ранее не описанному механизму, позволяющему предположить обратимое ингибирование. Биохимические эксперименты подтвердили результаты структурных исследований. Аналогичные результаты получены для фермента Л5. Данное исследование является начальным для понимания работы активных центров этих белков, а особенно механизмов их взаимодействия с пептидогликаном в процессе гидролиза. Также была установлена уникальная способность фермента Л5 агрегировать в амилоидоподобные фибриллы. Это позволило объяснить возможное влияние белка Л5 на везикулообразование. Начаты работы по изучению лечебного действия белка Л5 на модельную стафилококковую инфекцию у беспородных белых мышей. Показано, что при использовании белка Л5 в комплексе с экзополисахаридом *Lysobacter* sp. XL1 происходит снижение обсеменённости почек экспериментальных животных на два порядка. Результаты свидетельствуют о перспективности поиска «правильной» формулы лекарственного препарата на основе фермента Л5.

Каталитические и антимикробные свойства L,D-пептидогликангидролаз бактериофагов T5, RB43, RB49

Микулинская Г.В.* , Чернышов С.В., Шадрин В.С., Шаврина М.С.

Филиал Института биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, 142290, Московская область, г. Пушкино, пр. Науки, д. 6.

e-mail: mikulinskaya@bibch.ru

doi: 10.21519/0234-2758-2018-S-73-73

Эндолизины бактериофагов – ферменты (гидролазы, реже лиазы), разрушающие пептидогликан клеточной стенки бактерии-хозяина для выхода фагового потомства. Будучи примененными извне, эти ферменты способны вызывать осмотический лизис и гибель бактериальной клетки и потому являются потенциальными антибактериальными средствами, чей механизм действия альтернативен таковому антибиотиков. Антибиотикорезистентность многих бактериальных патогенов - причина повышенного внимания к эндолизинам.

Нами были идентифицированы, клонированы и экспрессированы гены эндолизинов колифагов T5 (*Siphoviridae*), RB43 и RB49 (*Myoviridae*). Продукты генов были очищены до электрофоретической гомогенности и охарактеризованы биохимически. Все они по субстратной специфичности – L-аланоил-D-глутаматпептидазы, содержащие в активном центре цинк и относящиеся к M15 семейству пептидаз. Для эндолизина бактериофага T5 была показана активация ионом Ca^{2+} , поддерживающим каталитически активную открытую конформацию белковой глобулы. Несмотря на различия в строении и биохимических свойствах (удельной активности, рН-оптимуме, чувствительности к компонентам буфера и ионной силе), все три фермента характеризуются устойчивостью к воздействию высоких температур: сохраняют от 25 до 70% ферментативной активности после 30-минутного прогрева при 90°C.

Изучение антибактериальных свойств этих ферментов *in vitro* показало, что они эффективно лизируют пермеабелизованные хлороформом клетки грамотрицательных бактерий, чей пептидогликан относится к типу A1γ, а также живые клетки ряда грамположительных бактерий с пептидогликаном типа А. Среди них не только *Bacillus megaterium*, чей пептидогликан идентичен таковому грамотрицательных бактерий, но и *B. licheniformis* (пептидогликан ацетилирован по D-Glu), *B. subtilis* (ацетилирована мезо-диаминопимелиновая кислота), *Cellulomonas flavigena* (пептидогликан относится к типу A4β). Значительное влияние на подверженность лизису оказывает стадия роста культуры: скорость гидролиза клеток в экспоненциальной фазе роста в 3-200 раз выше, чем в стационарной.

Количественный анализ бактерицидного действия эндолизина бактериофага T5 на клетки *Escherichia coli* *in vitro* в сочетании с катионными агентами в нетоксичных концентрациях, пермеабелизующими внешнюю мембрану (полимиксином В, грамицидином D, поли-L-лизином, хлоргексидином и мирамистином) продемонстрировал выраженный синергический эффект: уменьшение количества колониеобразующих единиц на 4-6 порядков по сравнению с контролем.

Малый размер, высокая активность и конформационная стабильность открывают для L,D-пептидогликангидролаз бактериофагов T5, RB43, RB49 перспективы применения в качестве биомедицинского препарата.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 18-04-00492.

Новые эндо-ксилоглюканаза и лихеназо-подобная эндо-(1,4)-β- глюканаза из *Aspergillus cervinus*: изоляция генов, гетерологичная экспрессия и биохимическая характеристика

Рыков С.В.^{1†}, Березина О.В.^{1†*}, Корнбергер П.², Херлет Дж.², Цурин Н.В.¹,
Зверлов В.В.^{2,3}, Яроцкий С.В.¹

¹ НИЦ «Курчатовский институт» – ГосНИИГенетика, 117545, Москва, 1-й Дорожный пр-д,
д. 1

² Департамент микробиологии, Технический Университет г. Мюнхена, Эмиль-Раманн штр. 4,
85354, Фрайзинг, Германия

³ Институт молекулярной генетики РАН, пл. Ак. Курчатова, д. 2, 123182, Москва.

† Равноценное участие

e-mail: mashchenko@yandex.ru, тел/факс: +7 (495) 315-04-01 / 315-05-01

doi: 10.21519/0234-2758-2018-S-74-75

Хотя грибы рода *Aspergillus* являются общепризнанным источником промышленных гликозил-гидролаз, до настоящего времени не было охарактеризовано ни одной карбогидразы из малоизученного вида *Aspergillus cervinus*.

Гены двух новых гемицеллюлаз были идентифицированы нами в несеквенированном геноме *A. cervinus* с использованием методов RACE и FPNI-PCR и экспрессированы в *Pichia pastoris*, а рекомбинантные ферменты очищены и охарактеризованы. Белки AsCeGH12A и AsCeGH12B размером 25 кДа имеют 62% гомологии аминокислотной последовательности и принадлежат к семейству 12 гликозил-гидролаз. Максимальная активность AsCeGH12A была зарегистрирована на β-глюкане ячменя и составила 2119 Ед/мг белка; активность на лихенане и СМС составила 754 Ед/мг и 211 Ед/мг, соответственно, тогда как активности фермента на ксилоглюкане и ламинарине обнаружено не было. Таким образом, AsCeGH12A был классифицирован как лихеназо-подобная эндо-(1,4)-β-глюканаза (ЕС 3.2.1.4). У фермента была также обнаружена дополнительная транс-гликозилирующая активность при использовании лихенана в качестве субстрата.

Экстремально высокая активность AsCeGH12B на ксилоглюкане из семян тамаринда составила 12430 Ед/мг белка, при этом фермент не был активен по отношению к другим полисахаридам. Олигосахариды XXXG, XXLG/XLXG и XLLG, образовавшиеся в результате эндогидролиза ксилоглюкана, были идентифицированы в качестве конечных продуктов реакции, поэтому AsCeGH12B был классифицирован как эндо-ксилоглюканаза (ЕС 3.2.1.151). Оба фермента имели максимальную активность при 55 °С, рН 5.0. Время полуинактивации AsCeGH12A при 50 °С, рН 5.0, составило 31 мин, однако фермент оставался стабилен при рН 3.0. Время полуинактивации AsCeGH12A при 55 °С, рН 5.0, составило 5 мин, тогда как при рН 3.0 фермент инактивировался практически сразу. Время полуинактивации AsCeGH12B при 55 °С, рН 5.0 составляло 158 минут, а при 50 °С фермент сохранял 100% активности в течение, по меньшей мере, 2 часов.

Гомологичное моделирование пространственных структур AsCeGH12A и AsCeGH12B позволило идентифицировать аминокислотные остатки, потенциально ответственные за катализ и связывание субстрата, в активном центре, а также выявить структурные особенности, определяющие чрезвычайно высокую удельную активность

эндо-ксилоглюканазы AsCeGH12B и различия в субстратной специфичности между AsCeGH12A и AsCeGH12B.

Высокие удельная активность и термостабильность новых гемицеллюлаз из *A. cervinus* делают их перспективными кандидатами для использования в биотехнологии, например, в качестве добавок для улучшения качества кормов или для осахаривания растительной биомассы.

Точечные мутации в глюкансвязывающем домене глюкансукразы штамма NRRL B512-F вызывают нарушение связывания с декстраном G-75 и замедление подвижности в условиях электрофореза в ПААГ

Пручковский Д.А., Чеперегин С.Э., Козлов Д.Г.

НИЦ «Курчатовский институт» – ГосНИИГенетика, 117545, Москва, 1-й Дорожный пр-д., д. 1.
e-mail: dg_kozlov@genetika.ru

doi: 10.21519/0234-2758-2018-S-75-75

Глюкансукразы семейства 70 гликозидгидролаз (ЕС. 2.4.1.5) относятся к внеклеточным ферментам, катализирующим синтез глюканов из сахарозы. Большинство глюкансукраз имеют С-концевой глюкансвязывающий домен (ГСД), способный выполнять функцию аффинного модуля, пригодного для использования при очистке рекомбинантных белков. Такой модуль в силу высокой аффинности к декстрану (K_d от 3,6 до 13,5 нмоль) и доступности декстрановых смол может служить относительно недорогой альтернативой другим известным тагам. Ранее для указанных целей был разработан домен GBD-7 глюкансукразы штамма NRRL B512-F [Suwannarangsee et al, 2007]. К его недостаткам следует отнести относительно низкую растворимость при экспрессии в *E. coli* и протеолитическую инактивацию при секреции в дрожжах.

С целью изучения влияния на растворимость и деградацию белка в *E. coli* и дрожжах, соответственно, в составе GBD-7 были сконструированы одиночные и двойная аминокислотные замены лизина на аланин в положении -48 и лизина на аспарагиновую кислоту в положении -38 относительно С-конца ГСД дикого типа. Проведённый анализ показал, что ни одна из одиночных мутаций не привела к секреции активного ГСД в дрожжах или к увеличению растворимости в *E. coli*. В то же время, несмотря на то, что оба одиночных мутанта сохранили способность к связыванию с декстраном G-75, двойной мутант утратил ее полностью. При этом как обе одиночные, так и двойная мутация сопровождалась существенным замедлением подвижности ГСД в 15% ПААГ в денатурирующих редуцирующих условиях. Вместе взятое, это свидетельствует о том, что остатки лизина в положениях -48 и -38 ГСД принимают участие в стабилизации его фолда, проявляющееся даже в условиях белкового фореа и определяющее связывание с декстраном.

Выделение, очистка и характеристика внутриклеточной аминоацилазы *Escherichia coli*

Епремян А.С., Епремян А.Р.

НПЦ „Армбиотехнология” НАН Республики Армения, 0056 Ереван, ул. Гюрджяна, д. 14.
e-mail: hasmikepremyan54@mail.ru

doi: 10.21519/0234-2758-2018-S-76-76

Фермент аминоацилаза [КФ3.5.1.14] катализирует гидролиз N-ацилированных аминокислот. Этот фермент содержится в почках животных, продуцируется некоторыми грибами, дрожжами и др. микроорганизмами. Аминоацилазы как в нативном, так и в иммобилизованном виде используются в промышленных масштабах для получения оптически активных аминокислот.

Однако, в отличие от сравнительно хорошо изученных внеклеточных аминоацилаз, внутриклеточные аминоацилазы охарактеризованы недостаточно. В связи с этим, актуальными задачами являются выделение, очистка и характеристика внутриклеточной аминоацилазы *Escherichia coli*. Для выделения исследуемого фермента использован штамм *E. coli* LGE 36, характеризующийся повышенным образованием внутриклеточной аминоацилазы. Схема выделения и очистки фермента включает получение клеточного экстракта, осаждение нуклеиновых кислот сульфатом стрептомицина, фракционирование сульфатом аммония при 55-80% насыщении, двукратную ионообменную хроматографию на ДЭАЭ- целлюлозе при рН 7.0 и рН 6.0 соответственно. Удельная активность полученного фермента возросла в 32 раза, выход активности составил 40%.

Исследование физико-химических свойств внутриклеточной аминоацилазы *E. coli* показало, что рН оптимум активности фермента по гидролизу N-ацетил-Д, L-метионина составляет 7.0. Оптимальным для стабильности фермента рН является интервал 6.0-7.5. Температурный оптимум фермента лежит при 37°C. Полная инактивация внутриклеточной аминоацилазы *E. coli* п-хлормеркурбензоатом указывает на присутствие существенной для активности фермента свободных SH-групп. Выделенный фермент ингибируется этилендиаминтетрауксусной кислотой, что свидетельствует о металлозависимости внутриклеточной аминоацилазы *E. coli*. Изучение субстратной специфичности исследуемого фермента показало, что внутриклеточная аминоацилаза *E. coli* эффективно гидролизует производные большинства алифатических аминокислот. Среди них лучшими субстратами являются ацетилпроизводные орнитина, лизина, метионина, аланина, валина, лейцина др. Полученные результаты показывают, что внутриклеточная аминоацилаза *E. coli* обладает широкой субстратной специфичностью. Отличительной особенностью исследуемого фермента является способность внутриклеточной аминоацилазы предпочтительно и с высокой скоростью гидролизовать ацетилпроизводные диаминокислот – орнитина и лизина.

Таким образом, можно заключить, что по разработанному нами методу выделена внутриклеточная аминоацилаза *E. coli* LGE36. Изучены наиболее важные физико-химические и каталитические свойства исследуемого фермента.

Клонирование и первичная характеристика новой бета-галактозидазы из гипертермофильного археона

Сергеев В.Р.^{1,2}, Горбунов Н.И.^{1,2}, Киль Ю.В.¹, Рычков Г.Н.^{1,2,*}

¹ Петербургский институт ядерной физики НИЦ «Курчатовский институт»,
188300, Ленинградская обл., г. Гатчина, Орлова роща, д. 1.

² Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого,
195251, г. Санкт-Петербург, ул. Политехническая, д. 29

e-mail: rychkov_gn@pnpi.nrcki.ru

doi: 10.21519/0234-2758-2018-S-77-77

Фермент β -D-галактозидаза (Е.С. 3.2.1.23) катализирует реакцию гидролитического расщепления β -O-гликозидной связи в природных (включая лактозу) и синтетических β -галактозидах, а также способен осуществлять реакцию трансгликозилирования. Наиболее широкое применение β -D-галактозидазы нашли в биотехнологических процессах, связанных с конверсией лактозы, в особенности для производства низколактозной молочной продукции и синтеза галактоолигосахаридов.

В сравнении с мезофильными ферментами применение в производстве термоустойчивых аналогов при повышенных температурах имеет ряд существенных преимуществ, а именно: снижается риск бактериального заражения продукта, продукты и субстраты имеют лучшую растворимость, растворы характеризуются меньшей вязкостью, катализатор имеет более продолжительное время жизни, увеличивается скорость реакции.

Мы клонировали, секвенировали и экспрессировали в клетках *E. coli* ген β -галактозидазы из гипертермофильной археи *Desulfurococcus amylophilus*. Для исследования физико-химических и каталитических свойств нативного фермента мы провели экспрессию белка без концевых меток, исключая их возможное влияние на структуру и активность фермента. В результате очистки на финальной стадии гель-фильтрации (HPLC) чистота препарата белка составила 95-98%.

По данным SDS-PAGE электрофореза в денатурирующих условиях молекулярная масса β -галактозидазы соответствует расчётным 111 кДа; при неполной денатурации препарата наблюдается зона с аномальной подвижностью, что может свидетельствовать о существовании фермента в димерной форме. Изофокусировка в ПААГ даёт значение изоэлектрической точки фермента pI=5,3.

При pH=6 β -галактозидаза демонстрирует гидролитическую активность по отношению к oNPG и лактозе, фермент активен в широком диапазоне температур от 30 до 100°C и в диапазоне pH от 2,5 до 8,0 единиц; pH-оптимум \approx 5,0. Для реакции ферментативного гидролиза oNPG при увеличении температуры от 30°C до 70°C значение K_m незначительно зависит от температуры, а скорость реакции увеличивается в 6,2 раза, что соответствует энергии активации 9,2 ккал/моль. Фермент характеризуется высокой термостабильностью: для реакции гидролиза лактозы при pH=5 температурный оптимум составляет примерно 100°C.

Гомологичным моделированием структуры каталитического домена β -галактозидазы, показали, что в сравнении с ферментом *Trichoderma reesei* наблюдается укорочение неструктурированных петель и удлинение альфа-спиралей.

Разработка биокаталитического метода синтеза цефазолина

Скляренко А.В., Сидоренко А.И.^{*}, Яроцкий С.В.

НИЦ «Курчатовский институт» – ГосНИИГенетика, 117545, Москва, 1-й Дорожный пр-д, д. 1.

e-mail: nougatanna@yandex.ru

doi: 10.21519/0234-2758-2018-S-78-78

Цефазолин (ЦЕЗ) является важным представителем β -лактамовых антибиотиков и относится к классу цефалоспоринов-кислот. Данный противомикробный препарат обладает широким спектром действия и входит в перечень основных лекарственных средств Всемирной организации здравоохранения. ЦЕЗ традиционно получают методом химического синтеза путем ацилирования аминогруппы 7-амино-3-[2-метил-1,3,4-тиадиазол-5-ил]-тиометил]-3-цефем-4-карбоновой кислоты (ТДА) активированными производными 1(Н)-тетразолилуксусной кислоты (ТЗУК) в неводной или водно-органической среде.

В России в настоящее время отсутствует промышленное производство субстанций β -лактамовых антибиотиков, в том числе ЦЕЗ, в связи с чем актуальной задачей является разработка отечественных технологий их синтеза. Современной тенденцией в области получения β -лактамов является замена химических технологий на биокаталитические процессы, что позволяет снизить экологическую нагрузку на окружающую среду, а так же повысить чистоту получаемых препаратов.

В данной работе для осуществления биокаталитического ацилирования ТДА метиловым эфиром ТЗУК использовали разработанный ранее биокатализатор (БК) на основе синтетазы цефалоспоринов-кислот из рекомбинантного штамма *E. coli* ВКПМ В-12316.

Создание конкурентоспособной технологии синтеза ЦЕЗ требует разработки условий биокаталитической трансформации, обеспечивающих хорошую эксплуатационную стабильность БК при высоком выходе процесса и высоком содержании целевого антибиотика в конечной реакционной смеси. Использование высокой исходной концентрации ключевого субстрата – ТДА лимитируется его низкой растворимостью при нейтральном и слабощелочном рН, оптимальном для действия БК. Сравнительное изучение закономерностей трансформации ТДА в ЦЕЗ и рН-зависимости растворимости ТДА в условиях, моделирующих состав реакционной смеси позволило разработать высокоэффективный метод синтеза ЦЕЗ. Использование эффекта перенасыщения растворов ТДА и регулирование рН реакционной смеси по оптимальному ступенчатому градиенту обеспечило возможность увеличения начальной концентрации ТДА до 150-200 мМ без осаждения субстрата, осложняющего процесс синтеза. При этом трансформацию ТДА в ЦЕЗ осуществляют с выходом 92-95 %. Высокое содержание целевого антибиотика (65–85 мг/мл) в конечной реакционной смеси является предпосылкой для разработки эффективного процесса его выделения и создания экономически выгодной биокаталитической технологии производства ЦЕЗ. Апробация разработанного метода синтеза ЦЕЗ в биореакторе объемом 1 л показала высокую эксплуатационную стабильность БК, остаточная активность которого после 25-го цикла составила (83 ± 2) % от исходного значения.

Получение высокоактивных вариантов рекомбинантной фосфолипазы A₂ *Streptomyces violaceoruber* в дрожжах

Чеперегин С.Э., Санникова Е.П., Мальшева А.В., Клебанов Ф.А., Глазунов А.В., Козлов Д.Г.

НИИЦ «Курчатовский институт» – ГосНИИГенетика, 117545, Москва, 1-й Дорожный пр-д, д. 1.
e-mail: lab20@genetika.ru

doi: 10.21519/0234-2758-2018-S-79-79

Фосфолипаза A₂ (ФЛА₂) находит применение во многих отраслях промышленности, в частности, используется для улучшения эмульгирующих свойств яичного желтка. В России ФЛА₂ не производится и является одним из наиболее востребованных и дорогостоящих ферментов. Основным препятствием на пути разработки эффективных дрожжевых продуцентов является токсичность высокоактивных вариантов фермента, связанная с его действием на фосфолипиды клеточных мембран. В этой связи предыдущие разработки, включая продуценты ФЛА₂ индийской кобры *Naja naja naja* [1] и ФЛА₂ штамма 2917 *S. violaceoruber* [2], были связаны с получением низкоактивных ферментов. За основу для конструирования продуцентов в настоящей работе была выбрана высокоактивная ФЛА₂ штамма А-2688 *S. violaceoruber* [3]. На основе данной ФЛА₂ была разработана коллекция модифицированных вариантов, содержащих аминокислотные замены, N- и C-концевые удлинения, а также инактивированные сайты N-гликозилирования. В результате скрининга из этой коллекции отобраны варианты ФЛА₂, обладающие высоким уровнем секреции, характерным для низкоактивных ферментов, и имеющие удельную активность, минимум, на порядок превосходящую показатели низкоактивных ФЛА₂. В присутствии повышенных концентраций ионов кальция отобранные ферменты показывают высокую активность на яичном желтке. Отобранные модифицированные варианты ФЛА₂ позволяют удешевить производство и последующее внедрение высокоактивных ФЛА₂ в различные отрасли промышленности.

Список использованной литературы:

1. Lefkowitz L.J., Deems R.A. Dennis E.A. Expression of group IA phospholipase A₂ in *Pichia pastoris*. Identification of a phosphatidylcholine activator site using site-directed mutagenesis // *Biochemistry*. 1999. V. 38. Issue. 43. PP. 14174-14184.
2. Liu A, Yu XW, Sha C, Xu Y *Streptomyces violaceoruber* Phospholipase A₂: Expression in *Pichia pastoris*, properties, and application in oil degumming // *Appl Biochem Biotechnol*. 2015. V. 175. Issue. 6. P. 3195-3206.
3. Sugiyama M, Ohtani K, Izuhara M, Koike T, Suzuki K, Imamura S, Misaki H. A Novel prokaryotic phospholipase A₂. Characterization, gene cloning, and solution structure // *The Journal of Biological Chemistry*. 2002. V. 277. N. 22. P. 20051-20058.

Секция 5

**Микробные ассоциации
(микробиомы человека и животных,
микроценозы ризосферы)**

Разнообразие прокариот и эукариотических микроорганизмов в кислых шахтных дренажных водах

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

Институт биоинженерии, ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН
119071, г. Москва, Ленинский просп. д. 33, стр. 2.

e-mail: gruevg@yandex.ru

doi: 10.21519/0234-2758-2018-S-81-81

Мы исследовали таксономический состав эукариотических и прокариотических микроорганизмов, обитающих в кислых шахтных дренажных водах в Бурятии и Алтайском крае. Кислые шахтные дренажи – широко распространенные экстремальные экосистемы, образующиеся в результате окисления сульфидных руд и характеризующиеся высоким содержанием растворенных ионов тяжелых металлов и низкими значениями pH. Объектами исследования были микробные сообщества дренажных вод заброшенной шахты вблизи г. Закаменск ($E_h = +480$ mV, $T = 6,6$ °C, $pH = 3,23$), карьера месторождения полиметаллических руд Озерное, Бурятия ($E_h = +500$ mV, $T = 13,2$ °C, $pH = 2,85$) и дренажных вод в месте складирования отходов добычи руды около г. Змеиногорск, Алтайский край ($E_h = +264$ mV, $T = 25$ °C, $pH = 3,41$). Таксономический состав прокариот и эукариот в микробных сообществах определяли в результате высокопроизводительного секвенирования фрагментов генов 16S рРНК и 18S рРНК. Полученные результаты показывают, что биоразнообразие организмов, обитающих в таких экстремальных экосистемах, невелико. Среди прокариот доминируют бактерии семейств *Gallionellaceae* и *Acidithiobacillaceae*, широко распространенные в подобных экосистемах. Биоразнообразие эукариот оказалось значительно ниже, среди них были обнаружены грибы класса *Leotiomycetes* и золотисто-бурые водоросли семейства *Chromulinaceae*. Детальный состав исследованных микробных сообществ будет представлен в докладе.

Работ поддержана грантом РФФИ 18-34-00356.

Частота встречаемости микрофлоры в организме человека в условиях Кольского Севера

Завадская Т.С.*, Михайлов Р.Е., Белишева Н.К.

Научно-исследовательский центр медико-биологических проблем адаптации человека
в Арктике – филиал Кольского научного центра РАН
184209, Мурманская область, г. Апатиты, Академгородок, ул. Ферсмана, д. 16 а.
e-mail: Green.myrtal@mail.ru

doi: 10.21519/0234-2758-2018-S-82-82

В последние десятилетия микробиом человека привлекает все большее внимание. Широко известно, что триллионы бактерий обитающих в организме играют ключевую роль в функциональном состоянии организма, влияя на его иммунитет и предрасположенность к отдельным заболеваниям.

Цель работы – выявить частоту встречаемости микроорганизмов в биологических средах детского и взрослого населения Кольского Севера на основе ежесуточной оценки представленности микрофлоры в пробах мокроты, мочи, цервикальной жидкости и др. (19 типов биологических сред) с 2008 по 2017 г.г. Результаты анализов (от 33803 человек) получены на основе исследований в бактериологической лаборатории городской больницы Апатитско-Кировского района Мурманской области.

В определенных биологических средах, в частности, в моче у мужчин и женщин, обнаружен параллелизм в росте отдельных представителей микрофлоры. Выявлена синхронность в частоте встречаемости *Staphylococcus epidermidis* в урине мужчин и женщин, а также синхронность частоты встречаемости этих бактерий с встречаемостью *Streptococcus* негем., *Proteus vulgaris*, *Staphylococcus hominis*, *Enterococcus aerogenes*. Выявлена групповая встречаемость таких микроорганизмов, как *Streptococcus mitis*, *Staphylococcus intermedius*, *Enterococcus durans* и *Streptococcus* негем в моче у мужчин и женщин, а также сопряженность их роста с дифтероидами, *Pseudomonas aeruginosa* в моче у мужчин, с *E. Coli*, *Klebsiella mobilis*. *Proteus mirabilis* и др. в моче у женщин. Полученные данные подтверждают явление параллелизма в росте микрофлоры разных штаммов впервые открытое С.Т. Вельховером.

На основе сравнительного анализа можно заключить, что наибольшая частота встречаемости представителей микрофлоры типична для мокроты, слизи из зева, цервикальной жидкости, что свидетельствует о достаточно высокой степени контаминации указанных сред патогенной микрофлорой и потенциальным риском для здоровья ее присутствия в биологических средах. Параллелизм в росте отдельных представителей микрофлоры создает не только дополнительный риск для здоровья, но также побуждает изучать возможные риски, обусловленные совместными эффектами воздействия на организм отдельных представителей микрофлоры.

Влияние факела попутного газа на биологические свойства верхнего слоя почвы

Квиткина А.К.^{*}, Журавлева А.И., Дударева Д.М.

Институт физико-химических и биологических проблем почвоведения РАН.

142290, Московская обл., г. Пушкино, ул. Институтская, д. 2

e-mail: aqvia@mail.ru

doi: 10.21519/0234-2758-2018-S-83-83

Для прогнозирования глобальных изменений климата требуются исследования экосистем, подвергающихся постоянному или периодическому воздействию факелов попутного газа. Целью нашей работы было определить влияние факела на биологические свойства верхнего слоя почвы.

Мы предположили, что иссушающее воздействие факела инициировало адаптацию микробного сообщества к воздействию температуры и влажности и повлияло на скорость базального дыхания почвы, биомассу почвенных микроорганизмов (определяли методом субстрат-индуцированного дыхания) и активность почвенных гидролитических внеклеточных ферментов (определяли методом флюорогенно-меченых субстратов).

Нами были исследованы изменения микробного сообщества по мере удаления от факела попутного газа в окрестностях г. Покачи (170 км к северу от г. Нижневартовск, ХМАО, на постоянной пробной площади УрО РАН) в 2017 г. Факельная установка эксплуатируется с 1985 г. Преобразованная территория представляет собой сосновый молодняк (произрастают брусника, черника, зеленые мхи, лишайники) на подзолистых почвах. Образцы почв отобраны на расстоянии 70 м от факела (зона I), 90 м (зона III), 130 м (зона VII) с глубины 1 - 3 см в 5 повт.

Средняя температура почвы снижалась, а влажность почвы повышалась по мере удаления от факела. По мере удаления от факела увеличивалась скорость базального дыхания, микробная биомасса и соотношение «базальное дыхание/СИД» (метаболический коэффициент). При этом увеличивалось и содержание органического углерода в почве. Таким образом, рабочая гипотеза об угнетающем воздействии факела на биологическую активность почвы подтвердилась.

Для подзолистых почв, удаленных от факела, наблюдалось характерное увеличение активности глюкозидазы, фосфатазы, хитиназы и лейцинаминопептидазы от I зоны к самой удаленной VII зоне. Активность фосфатазы оказалась максимальной по сравнению с другими ферментами, и в 3 раза активность фосфатазы увеличивалась от первой к VII зоне. Близость факела в целом, ингибировала активность гидролитических ферментов.

Для установления влияния факела на состав микробного сообщества в дальнейшем планируется провести анализ структуры микробного сообщества самой ближней и самой дальней зоны воздействия, секвенирование ДНК бактериальной и грибной биомассы и биоинформационный анализ структуры микробного сообщества.

Работа выполнена по гранту РФФИ 17-04-01933.

Определение биodeградативного потенциала новых почвенных штаммов-деструкторов поллютантов

Поливцева В.Н.* Борзова О.В., Присяжная Н.В., Сузина Н.Е., Соляникова И.П.

Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН,
142290, Московская обл., г. Пущино, проспект Науки, д. 5.

e-mail: polivtseva@ibpm.pushchino.ru

doi: 10.21519/0234-2758-2018-S-84-84

Загрязнение органическими поллютантами стоит на третьем месте по распространённости после радиоактивного и загрязнения компонентами нефти. Бензоат и его производные широко используются в пищевой промышленности как консерванты и как компоненты нескольких препаратов. Почва, из-за широкого использования гербицидов, содержит значительные количества хлорбензоатов. Фенолы являются одним из наиболее распространенных загрязнений, поступающих в поверхностные воды со стоками предприятий.

Целью работы было выделение новых штаммов, активных в отношении различных загрязнителей, в том числе фенола. В ходе работы были использованы 12 образцов почв, отобранных в различных регионах (Вьетнам (ризосфера незагрязнённой почвы), Брянск почва рядом с нефтяным месторождением в Казахстане (НМК) Таур, НМК Арыскуп, НМК Кумколь, НМК Хайркедды, Саратов (Почва нефтеперерабатывающего завода (НПЗ), Пущино (ризосфера загрязнённой и незагрязнённой нефтепродуктами почвы)).

Из имеющихся образцов почв были выделены новые бактерии-деструкторы и создана коллекция микроорганизмов, состоящая из 76 штаммов. Из полученной коллекции были выделены 16 штаммов, способных расти на бензоате натрия (БН) как на агаризованной, так и в жидкой питательной среде E-MSM. Кроме того, в ходе работы были изучены биodeградативные возможности 7 штаммов-деструкторов, выделенных ранее и отнесённых при идентификации к роду *Rhodococcus*. В ходе дальнейшей работы была проведена оценка способности микроорганизмов к росту на агаризованной питательной среде E-MSM с добавлением 3-хлорбензоата (ЗХБК), 2-хлорбензоата и фенола (Ф). Из полученной коллекции были отобраны 5 штаммов, способных расти на агаризованной и жидкой средах при добавлении 3-хлорбензоата в концентрации до 1 г/л. Были исследованы МАЛДИ-спектры всех 23 штаммов, выращенных на БН, ЗХБК, Ф и богатой агаризованной среде LB. Установлено, что белковые профили значительно отличались у представителей различных таксономических групп.

Работа была поддержана РФФИ грант № 18-34-00964 «Разработка подходов повышения метаболического потенциала бактерий-деструкторов техногенных токсикантов и создание на их основе высокоэффективных препаратов для биоремедиации территорий, подвергшихся загрязнению».

Микробный метаболизм природных и синтетических органофосфонатов: практическая значимость и роль в глобальном круговороте фосфора

Свиридов А.В.^{*}, Шушкова Т.В., Ермакова И.Т., Эпиктетов Д.О., Леонтьевский А.А.

Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН.

142290, Московская обл., г. Пушкино, проспект Науки, д. 5.

e-mail: alhummen@rambler.ru

doi: 10.21519/0234-2758-2018-S-85-85

Фосфор является одним из важнейших элементов для живых систем; основная его часть в биосфере представлена в виде органических фосфатов, содержащих фосфодиэфирную связь (C-O-P⁵⁺). Органофосфонаты (ОФ), в составе которых фосфор связан с углеродным скелетом прямой углерод-фосфорной (C-P³⁺) связью, в течение длительного времени считались рудиментами бескислородного периода развития Земли, не играющими значительной роли в природе. Однако по современным данным ОФ могут выступать не только как компоненты мембран или антибиотики, но и как форма запасаания фосфора в морских, пресноводных и почвенных экосистемах и тем самым принимать участие в глобальном круговороте этого элемента. Основную роль в синтезе и катаболизме ОФ играют микроорганизмы, прежде всего, прокариоты. По данным метагеномных исследований, гены ферментов биосинтеза ОФ встречаются в 10% геномов бактерий и архей; гены путей катаболизма ОФ обнаруживаются в 30-40% геномов. Также значительные количества ОФ поступают в окружающую среду как ксенобиотики в составе хелатирующих агентов и пестицидов, среди которых наиболее распространен гербицид глифосат (ГФ). Биохимия и экология ОФ активно изучаются, но целостная картина путей метаболизма этих соединений в почвенных и водных микробиотах не сформирована. Исследования данной тематики весьма актуальны с фундаментальной и прикладной точки зрения.

Накопление в окружающей среде синтетических ОФ, таких как ГФ, и продукта его разложения аминотетилфосфоновой кислоты (АМФК), представляют значительные экологические риски в силу токсичности этих соединений для растений и животных и устойчивости к химическому и ферментативному гидролизу. Основной вклад в деструкцию синтетических ОФ вносят бактерии, обладающие специализированными ферментными системами (C-P лиаза, фосфонатаза, ГФ-оксидоредуктаза) и способные формировать эффективные ассоциации биодеструкторов ОФ в условиях почв и водоемов.

В нашей лаборатории составлена коллекция из 40 чистых культур бактерий-деструкторов ОФ, выделенных из почв, загрязненных ГФ либо метилфосфоновой кислотой. Отобраны представители рода *Ochrobactrum*, демонстрирующие лучшие биодеструктивные характеристики в отношении ОФ среди описанных в литературе бактерий. Впервые у бактерии дикого типа *Achromobacter* sp. Kg 16 обнаружен механизм ацетилирования ГФ по иминному азоту, обеспечивающий его эффективную детоксикацию. Показано существование особой ГФ-специфичной формы бактериальной C-P лиазы. Впервые получены данные о существовании множественных форм фосфонатаз, показана возможность их участия в процессах деструкции ГФ и АМФК. В полевых и лабораторных экспериментах продемонстрирована возможность применения исследованных бактерий для ремедиации загрязненных ОФ сред и очистки промышленных сточных вод.

Ассоциации плазмидосодержащих штаммов для очистки нефтезагрязненных территорий

Фунтикова Т.В.¹, Валентович Л.Н.², Захарова М.В.¹, Пунтус И.Ф.¹, Филонов А.Е.¹

¹ Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрябина» РАН. 142290, Московская обл., г. Пущино, проспект Науки, д. 5.

² Институт микробиологии НАН Беларуси, 220141 г Минск, ул. Купревича. д. 2.

doi: 10.21519/0234-2758-2018-S-86-86

Применение ассоциаций штаммов бактерий для очистки почв и вод представляет собой экологически безопасный и перспективный подход для ликвидации последствий разливов нефти и нефтепродуктов. К настоящему времени накоплен значительный экспериментальный материал, показывающий, что процесс биodeградации поллютантов бактериями часто контролируются плазмидными генами. Кроме того, наличие конъюгативных плазмид биodeградации в клетках микроорганизмов-нефтедеструкторов может обеспечить перенос катаболических генов в клетки аборигенных микроорганизмов, расширяя их деградативный потенциал и повышая эффективность очистки. Целью данной работы была разработка новых перспективных биопрепаратов на основе плазмидосодержащих штаммов для эффективной очистки экосистем от нефтяных загрязнений.

Для выявления наличия плазмид в штаммах микроорганизмов, выделенных ранее из нефтезагрязненных почв, использовали метод пульс-электрофореза, который показал, что все исследуемые эффективные штаммы-нефтедеструкторы рода *Rhodococcus* содержат плазмиды размером от 20 до 1000 т.п.н., а в двух штаммах содержится по две плазмиды размерами 150 и 300 т.п.н. На основе этих штаммов были созданы микробные ассоциации для деградации нефти. С использованием капиллярной газожидкостной хроматографии была проведена количественная оценка остаточного содержания 13 различных ПАУ (с количеством колец от 3 до 6), а также изучены особенности утилизации н-алканов в образцах, полученных после деградации высоких концентраций нефти (15%) исследуемыми микробными ассоциациями. Показано, что добавление деструктора ПАУ *Pseudomonas putida* BS3701(pBS1141, pBS1142) к ассоциации, состоящей из двух родококков, привело к увеличению убыли н-алканов в 2 раза, а убыли ароматики в 3 раза. В процессе работы геномная ДНК штамма *Pseudomonas putida* BS3701 была секвенирована с использованием набора для выделения ДНК QIAGEN DNeasy Blood and Tissue Kit (Cat No./ID: 69506). Для приготовления библиотеки ДНК использовался набор Illumina Nextera XT (FC-131-1024) и MuSeek Library Preparation Kit, Illumina compatible (ThermoFisher K1361). Секвенирование проводилось на приборе Illumina MiSeq с использованием наборов реагентов «MiSeq Reagent Kit v2 (500-cycle)» MS-102-2003. Аннотация проводилась с помощью программы RAST (<http://rast.nmpdr.org/>) с дальнейшей ручной корректировкой. Сборка была очень затруднена тем фактом, что плазмиды имеют в своём составе повторяющиеся элементы, а плазида pBS1142(54 501 п.н.) несёт в своём составе повторяющийся фрагмент (17 658 п.н.) от более крупной плазмиды pBS1141 (107 388 п.н.). Показано, что последовательность хромосомы штамма BS3701(6 339 849 п.н.) сходна с хромосомой *Pseudomonas* sp. JY-Q (<http://www.pseudomonas.com/strain/show/4106>).

Секция 6
Биофармацевтика

Разработка методик выделения рекомбинантных белков медицинского назначения

Асраркулова А.С., Коваленко А.О.*

НИЦ «Курчатовский институт» – ГосНИИГенетика, 117545, Москва, 1-й Дорожный пр-д, д. 1.
e-mail: gertrude-mcfuzz@mail.ru

doi: 10.21519/0234-2758-2018-S-88-88

Лаборатория химии белка ГосНИИГенетика специализирована на разработке методик выделения рекомбинантных белков медицинского назначения.

Выделение таких белков, основанное на обычных методах белковой химии, имеет ряд особенностей: (1) фармакологические белки должны быть очень высокой чистоты (95–98%); (2) в схеме выделения должны отсутствовать те методы аффинной хроматографии, применение которых сопряжено с риском загрязнения готового продукта хотя бы следовыми количествами токсических веществ. Это, в том числе, относится к металлоаффинной хроматографии, широко используемой для первичной очистки рекомбинантных белков, содержащих His-таг; (3) число используемых стадий должно быть по возможности сведено к минимуму, чтобы не увеличивать себестоимость продукта; (4) продукт не должен содержать более, чем 5ЕЭ/кг/час эндотоксина из грамм-отрицательных продуцентов.

В результате проведенных экспериментов были выделены в чистом виде такие белки как: соматотропин (гормон роста), рм-ГПП-1 (биомодифицированный глюкагоноподобный пептид человека, активен против диабета второго типа), аспарагиназа Was 79 (активна против острого лимфобластного лейкоза), метионин-гамма-лиаза из *Clostridium sporogenes* (широкая антиопухолевая активность), рекомбинантный белок УВ-1 человека (предотвращает развитие болезни Альцгеймера), эндолизин из бактериофага К *Staphylococcus aureus* (активен против штаммов *S. aureus*, включая устойчивые к большинству известных антибиотиков).

Выделенные белки имели чистоту от 95 до 100% и содержание эндотоксина менее допустимой нормы. На их основе были разработаны готовые лекарственные формы, прошедшие доклинические исследования.

Антистафилококковая β -литическая протеаза *Lysobacter capsici*

Афошин А.С.^{1,*}, Кудрякова И.В.¹, Торопыгин И.Ю.², Васильева Н.В.¹

¹ Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина» РАН, 142290, Московская обл., г. Пущино, проспект Науки, д. 5.

² Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича, 119121, Москва, ул. Погодинская, д. 10, стр. 8.

e-mail: alex080686@mail.ru

doi: 10.21519/0234-2758-2018-S-89-89

В настоящее время одной из ключевых проблем здравоохранения является увеличение резистентности штаммов *Staphylococcus aureus* ко всем известным антибиотикам. Так, согласно данным Европейского центра по профилактике и контролю заболеваний, инфекции, возникающие в области хирургического вмешательства, вызванные *S. aureus*, составляют 20,3%. При этом, согласно отчету о внутрибольничных инфекциях в отделениях интенсивной терапии, 23% изолятов *S. aureus* устойчивы к оксациллину. В связи с этим, является актуальным поиск новых антибактериальных агентов, альтернативных антибиотикам и не вызывающих адаптации патогенных штаммов.

Штамм *Lysobacter capsici* продуцирует ряд внеклеточных бактериолитических и антифунгальных агентов. Для выделения бактериолитических ферментов этой бактерии была разработана многоступенчатая схема очистки. В результате был выделен белок, обладающий бактериолитической активностью и идентифицированный с помощью MALDI-TOF как β -литическая протеаза (EC 3.4.24.32). Оптимизация процессов культивации и очистки позволила получить данный белок с концентрацией 1 мг/л.

Установлено, что оптимальными условиями для проявления бактериолитической активности являются: pH – 9, температура – 50⁰С, температура полуинактивации – 57⁰С, концентрация буфера – 5 мМ. Ингибиторный анализ показал, что фермент полностью теряет свою активность при использовании ФМСФ в концентрации 10 мМ, пХМБ – 5 мМ, 1,10 – фенантролин – 5 мМ. Также показано, что фермент гидролизует живые клетки *S. aureus* 55 (MRSA) с высокой эффективностью (минимальная ингибирующая концентрация составляет - 15 мкг/мл).

Разработана гетерологичная система для экспрессии гена β -литической протеазы *L. capsici* на основе штамма *E. coli* BL21(DE3) и плазмиды рЕТ – 19mod. Подобраны условия для рефолдинга рекомбинантной β -литической протеазы из телец включения.

Дальнейшее изучение β -литической протеазы *L. capsici* будет направлено на установление пространственной структуры, антимикробного потенциала и перспективы применения в качестве лекарственного антимикробного средства.

Препараты на основе синтетических пептидов для экстренной и профилактической медицины

Воюшина Т.Л.* , Дубовская С.И., Котлова Е.К., Яроцкий С.В.

НИЦ «Курчатовский институт» – ГосНИИГенетика, 117545, Москва, 1-й Дорожный пр-д, д. 1.
e-mail: tvoyushina@genetika.ru

doi: 10.21519/0234-2758-2018-S-90-90

Система свертывания крови в нормальном состоянии находится в динамическом равновесии, которое организовано серией механизмов «прямой» и «обратной» связи и их активность может изменяться в широких пределах из-за генетических особенностей или экзогенных воздействий на организм. При смещении гемостатического баланса за рамки физиологических норм возникают условия для развития патологических кровотечений или тромбозов. Большинство ферментов, регулирующих агрегатное состояние крови, относится к классу трипсиноподобных сериновых протеиназ, поэтому чтобы влиять на одно звено сложного каскадного процесса системы гемостаза, не вмешиваясь в другие регуляторные механизмы свертывания крови, важно подобрать специфичные и селективные ингибиторы для каждого конкретного фермента.

В лаборатории химии белка синтезированы пептидные производные, представляющие собой специфические ингибиторы ключевых ферментов системы свертывания крови – тромбина, фактора X и плазмина. Подобные соединения достаточно устойчивы при хранении, они легко усваиваются в организме, превращаясь в нетоксичные вещества, поэтому их применение в качестве лекарственных препаратов весьма перспективно.

На основе короткого пептида, связывающегося с активным центром плазмина, создан антифибринолитический препарат **Афкостат гель** - гемостатическое средство для местного применения, превосходящее по эффективности зарегистрированный в РФ препарат «Активтекс АКФ» и сопоставимое с лекарственным препаратом «Тромбокол», действующим веществом в котором являются тромбоциты из донорской крови. В рамках Госконтракта № 16.N08.12.1020 при поддержке Министерством образования и науки РФ завершены доклинические исследования препарата Афкостат гель.

Биомишенями другого синтетического дипептида являются ключевые компоненты системы коагуляционного гемостаза – фактор свертывания крови Ха и тромбин. Прямое ингибирование этих ферментов позволяет одновременно заблокировать как внешний, так и внутренний пути коагуляции и приостановить процесс тромбообразования. Разрабатываемый в соответствии с Госконтрактом № 14.N08.11.0144 препарат, относящийся к группе антикоагулянтов, проходит доклинические испытания и предназначен для превентивной терапии ишемического инсульта и системных эмболий. Готовая лекарственная форма представляет собой таблетку для перорального применения и будет использоваться для курсового лечения заболеваний, связанных с повышенным тромбообразованием.

Изучение стабильности кристаллов и растворов акадезина при хранении

Куваев Т.А., Антонова С.В. *, Демина Н.Г., Румянцева Н.Ф.

НИИЦ «Курчатовский институт» – ГосНИИГенетика, 117545, Москва, 1-й Дорожный пр-д, д. 1.
e-mail: antonovasvetlanavladimirovna@gmail.com

doi: 10.21519/0234-2758-2018-S-91-91

Акадезин (AICAR) – природное соединение, аналог и предшественник аденозина. Будучи активатором протеинкиназы, активируемой АМР (АМРК), акадезин имеет широкий терапевтический потенциал, поскольку он нормализует углеводный и липидный обмен и ограничивает пролиферацию опухолевых клеток [1–3]. Известна его эффективность в предупреждении сахарного диабета второго типа, нельзя переоценить его роль и при лечении хронических и острых лейкозов. Все эти факторы обусловили большой интерес к изучению свойств нуклеозида акадезина, методам его получения и количественного определения.

Цель настоящей работы – исследование стабильности акадезина в различных условиях хранения.

Нами было проведено изучение температурной и светостабильности акадезина. В анализируемой литературе [4] приведены данные о сроке хранения кристаллов акадезина при температуре -18°C в течении 1 года. В нашем исследовании изучалась стабильность кристаллов акадезина и их водных растворов в темноте и на свету, при температуре 40°C в течении 1,5 лет. Периодически отбирались пробы из подготовленных на хранение образцов и анализировались методом тонкослойной хроматографии с денситометрией [4]. По результатам исследования акадезин показал стабильность при температуре 40°C как в темноте так и на свету, в течении 1,5 лет.

Литература:

1. Rutter GA, Da Silva Xavier G, Leclerc I. Roles of 5'-AMP-activated protein kinase (AMPK) in mammalian glucose homeostasis. – *Biochemical Journal*, 2003, v.375(2), p.1–16.
2. Fediuc S., Anthony N.M, So M., Mirpourian M., Perry R.L., Ceddia R.B. Prolonged AICAR-induced AMP-kinase activation promotes energy dissipation in white adipocytes: novel mechanisms integrating HSL and ATGL. – *Journal of Lipid Research*, 2009, v.50(4), p. 704–715.
3. Swinnen J.V., Beckers A., Brusselmans K., et al. Mimicry of a cellular low energy status blocks tumor cell anabolism and suppresses the malignant phenotype. – *Cancer Research*, 2005, v.65, p.2441–2448.
4. Антонова С., Тяглов Б., Барсуков Е., Демина Н., Румянцева Н., Эрраис Лопес Л., Королькова Н., Лобанов К., Шакулов Р., Миронов А. / Количественный хроматографический анализ культуральных жидкостей штаммов-продуцентов акадезина// *Аналитика*. 2012. № 3 (4). С. 18-23.

Создание лекарственного препарата на основе литического фермента бактериофага для лечения глазных инфекций

Свиридов Б.В., Горбань Е.А., Дворянчикова Т.К., Коваленко А.О., Яроцкий С.В.

НИЦ «Курчатовский институт» – ГосНИИГенетика, 117545, Москва, 1-й Дорожный пр-д., д. 1.
e-mail: sviridov@genetika.ru

doi: 10.21519/0234-2758-2018-S-92-93

С каждым годом всё острее стоит проблема возникновения устойчивых к действию антибиотиков штаммов патогенных микроорганизмов. В связи с этим разработка альтернативных методов борьбы с резистентными к антибиотикам бактериями представляется актуальной задачей. Одним из таких методов является использование бактериофагов, а также их ферментов. В частности ранее на основе пептидогликан-лизирующих ферментов бактериофагов создан лекарственный препарат против *Pseudomonas aeruginosa*.

В институте ГосНИИГенетика был создан штамм-продуцент эндопептидазного домена литического фермента бактериофага К, активно лизирующего бактерии *Staphylococcus aureus*. Представляется перспективным применение данного фермента для лечения и профилактики инфицирования *Staphylococcus aureus* при повреждениях глаза.

Целью данной работы является создание лекарственного препарата, способного бороться с глазными инфекциями *Staphylococcus aureus*.

На основании анализа литературных данных в качестве объекта исследования был выбран эндопептидазный домен литического фермента бактериофага К. Соответствующий ген был клонирован в экспрессионный вектор для *Escherichia coli* (вектор pET24a под контролем промотора T7 РНК-полимеразы).

Была отработана методика культивирования штамма-продуцента в ферментёрах. Биосинтез проводили в ферментёре при температуре 37⁰С, парциальном давлении кислорода в среде – не менее 20 %, рН 7,0, продолжительность биосинтеза – 22 часа. Питательная среда содержала пептона-140 соевого (P140, “Amresco”) – 1,2%; дрожжевого экстракта 0207/0-MG-L (“Springer”) – 2,4% г; глюкозы – 1%; сульфата аммония – 0,33%; пеногаситель A210 (Sigma) - 0,1 мл, вода – остальное.

В процессе ферментации производили добавки питательных веществ: через 3 ч после начала ферментации – в ферментер стерильно вносили 10 мл 50 % стерильного раствора глюкозы, 60 мл 50 % стерильного раствора глицерина и 50 мл 20 % стерильного раствора лактозы.

Разрушение клеток после завершения культивирования проводили на дезинтеграторе APV 1000 проводили при давлении 970 бар за 4 цикла с охлаждением между циклами до 15⁰С.

Наличие активности в образцах проверялось по изменению оптической плотности суспензии клеток *Staphylococcus aureus* при длине волны 590 нм (OD₅₉₀) на фотоэлектрокалориметре КФК-2МП при 25⁰С. Литический фермент разрушает пептидогликан бактерий, вызывая их лизис. В результате понижается оптическая плотность суспензии при длине волны 560 нм. Показано, что выделенный из лизата клеток штамма-продуцента и хроматографически очищенный эндопептидазный домен способен эффективно разрушать клетки *Staphylococcus aureus*.

На основе очищенного фермента создан лекарственный препарат, который включает в себя (на 5 мл водного раствора): 2,5 мг литического фермента, 13 мг Na₂HPO₄, 0,9 мг лимонной кислоты, 35 мг NaCl, 10 мг гипромеллозы, 20 мг декспантенола, 0,2 мг бензалкония хлорида, 40 мг повидона. Показано, что созданный препарат сохраняет антибактериальную активность как минимум в течение месяца при хранении при +4⁰С.

Таким образом, в ходе исследований установлено, что рекомбинантный эндопептидазный домен литического фермента бактериофага К, продуцируемый *Escherichia coli*, способен *in vitro* разрушать клетки *Staphylococcus aureus*. Дальнейшей задачей является изучение активности лекарственного препарата на основе данного фермента при лечении глазных инфекций *Staphylococcus aureus*.

Секция 7

Другая тематика

Исследование влияния гипогеомагнитных полей на биологические объекты

Беликова Ю.А.^{*}, Васильева О.В., Песков Т.В.

Научно-исследовательский центр «Курчатовский институт» – Центральный научно-исследовательский институт конструкционных материалов «Прометей»,
191015, Санкт-Петербург, Шпалерная ул., д. 49.

e-mail: prometey_35otdel@mail.ru

doi: 10.21519/0234-2758-2018-S-95-95

Постоянно оказываемое воздействие слабых и сверхслабых внешних магнитных полей Земли на биологические объекты, создает необходимость исследования магнитобиологических эффектов в условиях низкочастотных электромагнитных полей [1]. Кроме того, при организации долгосрочных пилотируемых космических полетов особое внимание должно уделяться изучению влияния на космонавтов таких внешних факторов, которые обладают большой проникающей способностью и существенно отличаются от «земных условий». В первую очередь, речь должна идти о влиянии сверхслабых низкочастотных магнитных полей на сердечно-сосудистую систему человека.

Данных, подтверждающих наличие биологического действия подобных полей, достаточно [2, 3], однако сам механизм воздействия поля достоверно не известен. Таким образом, на сегодняшний день одной из наиболее актуальных задач является установление механизмов воздействия слабых внешних электромагнитных полей на биологические объекты. Решение данной задачи может позволить в перспективе защитить жизнь и здоровье человека.

Для понимания биологического действия ослабленного геомагнитного поля НИЦ «Курчатовский институт» – ЦНИИ КМ «Прометей» были разработаны и изготовлены «магнитовакуумные» камеры различной конфигурации с различными рабочими характеристиками. В данной работе представлены результаты совместных исследований НИЦ «Курчатовский институт» – ЦНИИ КМ «Прометей» с различными медицинскими учреждениями по изучению особенностей воздействия гипогеомагнитных полей на живые системы.

Литература:

1. Сурма С.В., Щеголев Б.Ф., Васильева О.В., Рубанова Н.С., Цырлин В.А. Слабые низкочастотные магнитные поля в биологии и медицине // Бюллетень ФЦСКЭ, экспериментальная медицина. 2011. С. 25-29.
2. Polk C. Biological effects of low-level low-frequency electric and magnetic fields // IEEE Trans. on Educ. 1991. Vol. 34. P. 243–249.
3. Berg H., Zhang L. Electrostimulation in cell biology by low-frequency electromagnetic fields // Electro-Magnetobiol. 1993. Vol. 12. P. 147–163.

Микроорганизмы – от антибиотиков до наночастиц

Воейкова Т.А.^{1,*}, Журавлева О.А.^{1,2,*}, Булушова Н.В.¹, Вейко В.П.³,
Исмагулова Т.Т.⁴, Лупанова Т.Н.⁵, Лобастов С.Л.⁶, Дебабов В.Г.¹

¹ НИЦ «Курчатовский институт» – ГосНИИгенетика, Москва, Россия

² Аграрно-технологический институт РУДН, Москва, Россия

³ ФИЦ Биотехнологии РАН, Институт биохимии им. А.Н. Баха РАН, Москва, Россия

⁴ МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

⁵ Институт биологии гена РАН, Москва, Россия

⁶ НИЦ «Курчатовский институт» – ИРЕА, Москва, Россия

e-mail: voeikova.tatyana@yandex.ru; zhuravlevaolga@gmail.com

doi: 10.21519/0234-2758-2018-S-96-96

Биогенные наночастицы в природе.

Биогенные наночастицы естественной природы в живых организмах.

Микроорганизмы как биокатализаторы синтеза наночастиц металлов, оксидов, сульфидов металлов.

Биологические методы «зеленого синтеза» наночастиц, основанные на использовании микроорганизмов, экстрактов растений и других биообъектов, могут стать альтернативой традиционным физико-химическим методам. Метод выгодно отличается малыми энергетическими затратами, экологически безопасен, масштабируем. Биогенные наночастицы стабильны в водных суспензиях, что обусловлено наличием белков и других биомакромолекул на их поверхности.

Наночастицы сульфидов металлов широко используются во многих областях промышленности, а применение в биомедицине стало возможным благодаря активным исследованиям их оптических свойств.

В НИЦ «Курчатовский институт – ГосНИИгенетика» разработан простой и экологически чистый способ получения наночастиц сульфидов серебра, кадмия и цинка (NpAg_2S , NpCdS и NpZnS) с использованием различных штаммов микроорганизмов.

- определены характеристики наночастиц (форма, распределение по размеру, уровень люминесценции, гидродинамический радиус, дзета-потенциал);
- разработан метод получения концентрированных водных суспензий наночастиц (1–4 мг/мл);
- идентифицированы белки на поверхности наночастиц, являющиеся белками внешней мембраны клеток – белки рецепторов, поринов, флагеллинов;
- состав белков зависит от штамма, использованного для получения наночастиц;
- существует избирательность сорбции определенных белков на наночастицы;
- проведена иммобилизация наночастиц на поверхность различных полимерных материалов для создания полимерных нанокомпозитов, с применением естественных биогенных наночастиц.

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 16-04-00471).

Кодоны не для белков: сдвиг предпочтений аминокислот и кодонов в районах промоторов и сайтов связывания транскрипционных факторов нужен для их электростатических свойств

Осипов А.А.

Институт Высшей Нервной Деятельности и Нейрофизиологии РАН, Москва, ул. Бутлерова 5А,
e-mail: aosypov@gmail.com

doi: 10.21519/0234-2758-2018-S-97-97

ДНК сильно заряжена, и электростатические взаимодействия с белками важны для регуляции транскрипции.

Электростатический потенциал распределен неравномерно вдоль ДНК, коррелирует с GC%, видом последовательности и ее контекстом. Сайты связывания транскрипционных факторов расположены в областях с высоким электростатическим потенциалом, многократно превышающих размер белка. Распределение электростатического потенциала на поверхностях молекул транскрипционных факторов отражает структуру сайтов связывания. Промотеры в среднем имеют высокое значение профиля электростатического потенциала [1,2].

Сотни сайтов связывания транскрипционных факторов лежат в областях кодирования белков, процент их не очень высок, но значителен. Некоторые области кодирования белка также содержат промоторы для генов, в основном расположенных на противоположной цепи.

Мы обнаружили, что в таких разных бактериях, как *E. coli*, *B. subtilis* и *Corynebacterium glutamicum*, существует сдвиг предпочтений кодонов и даже аминокислот вокруг промоторов и сайтов связывания транскрипционных факторов, охватывающий несколько сотен кодонов, и что этот сдвиг обусловлен физическими свойствами рассматриваемых кодонов, обеспечивающих правильные электростатические аттракторы для белков, регулирующих транскрипцию.

Полученные данные требуют серьезного пересмотра концепции молекулярной эволюции. Выявленная несинонимичность синонимичных замен может привести к неправильной оценке судьбы последовательностей, включая неправильное использование молекулярных часов и ошибочные оценки специфических мутаций. Смещение предпочтений аминокислот приводит к еще более важному сдвигу в концепции естественного отбора белков. Он обосновывает представление о ДНК не только как о тексте для реализации первого шага Центральной догмы молекулярной биологии, но и сложном органе наследственности, который выполняет разные, порой противоречивые, требования.

Работа поддержана грантом РФФИ 16-04-01865.

Литература:

1. Osypov A.A., et al (2010) DEPPDB – DNA Electrostatic Potential Properties Database. *Electrostatic Properties of Genome DNA // JBCB*, 8(3): 413-25.
2. Osypov A.A., et al (2012) DEPPDB – DNA Electrostatic Potential Properties Database. *Electrostatic Properties of Genome DNA elements // JBCB*, 10(2) 1241004.

Нетермическое воздействие терагерцового излучения на генетические системы микроорганизмов

Пельтек С.Е.¹, Брянская А.В.¹, Банникова С.В.¹, Горячковская Т.Н.¹, Демидова Е.В.¹, Демидов Е.А.¹, Мещерякова И.А.¹, Розанов А.С.¹, Старостин К.В.¹, Слынько Н.М.¹, Уварова Ю.Е.¹, Шеховцов С.В.¹, Колчанов Н.А.¹, Винокуров Н.А.², Попик В.М.²

¹ Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики СО РАН,

² Институт ядерной физики им. Г. И. Будкера СО РАН

doi: 10.21519/0234-2758-2018-S-98-98

Проведен анализ реакции мезофильных и экстремофильных микроорганизмов на нетепловое воздействие терагерцового излучения (ТГц) новосибирского лазера на свободных электронах. Анализ транскриптома облученных и контрольных клеток выявил активацию генов, контролирующих структуру клеточной стенки, генов переноса ионов через клеточную мембрану и метаболизма органических субстратов. С помощью электронно-микроскопического анализа показано, что облученные клетки *E. coli* с ТГц усиливают неравномерность расположения пилей на поверхности бактерий, а также заставляют пили склеиваться и образовывать их 2-3-слойные пучки.

В этом исследовании мы также провели протеомный анализ общей фракции растворимых белков микроорганизмов после воздействия ТГц-излучения. Показано, что в ответ на воздействие ТГц в протеоме клеток *E. coli* меняют экспрессию 42 белка. На основании результатов анализа протеома облученных и контрольных клеток был создан биосенсор *E. coli* / *glnA-gfp*, который реагирует на воздействие на ТГц. Используя этот и другие биосенсоры, было показано, что системы, чувствительные к окислительному стрессу и присутствию ионов металлов, реагируют на действие ТГц, а система, чувствительная к присутствию антибиотиков, не реагирует.

Результаты протеомного анализа реакции на ТНЗ на экстремофильные бактерии *Halorubrum* так же указывают на изменение экспрессии генов, контролирующих регуляцию компонентов клеточной стенки.

Разработка тест-систем для диагностики возбудителей бактериозов и микозов овощных культур методом ПЦР

Сидоренко А.В. *, Барейко А.А., Валентович Л.Н., Купцов В.Н., Пилипчук Т.А., Титок М.А., Коломиец Э.И.

Институт микробиологии Национальной академии наук Беларуси,
220141, Минск, ул. акад. Купревича, 2, Республика Беларусь
e-mail: nastyasid.vbc@mail.ru

doi: 10.21519/0234-2758-2018-S-99-99

Большую угрозу продовольственной безопасности представляют болезни сельскохозяйственных культур, ежегодный экономический ущерб от которых достигает десятков миллиардов долларов США. Главная причина значительных потерь урожая от заболеваний бактериальной и грибной этиологии – поздняя или неправильная диагностика возбудителя, и, как следствие, ошибки при выборе средств защиты растений и несвоевременная обработка. Вышесказанное обуславливает необходимость разработки высокоспецифичных и чувствительных диагностических тест-систем. Наиболее перспективными в настоящее время считаются диагностические системы на основе полимеразной цепной реакции (ПЦР), превосходящей традиционные методы по специфичности, чувствительности, производительности анализа.

С целью создания ПЦР тест-системы для диагностики бактериозов и микозов овощных культур в геномах экономически значимых фитопатогенных бактерий (10 видов) и грибов (12 видов) выявлены высококонсервативные и специфичные генетические локусы, кодирующие факторы патогенности, на основании нуклеотидных последовательностей которых разработан набор высокоспецифичных праймеров. Подтверждена эффективность использования сконструированных праймеров для идентификации фитопатогенов целевых видов после выделения в чистую культуру, а также для их детекции в почве, воде, растительном и семенной материале (в количестве $\geq 10^2$ – 10^3 КОЕ/г). Создана тест-система для экспресс-диагностики бактериальных и грибных возбудителей заболеваний томата и огурца в режиме стандартной мультиплексной ПЦР и ПЦР в реальном времени, позволяющая одновременно детектировать 4-5 патогенов.

Работа выполнена в рамках мероприятия 72 «Разработать и внедрить определитель грибных и бактериальных возбудителей болезней сельскохозяйственных растений на основе ДНК-типирования» подпрограммы 1 «Инновационные биотехнологии-2020» ГП «Научные технологии и техника» (2016-2020).

Бактерицидные покрытия для изделий медицинского назначения

Шишкова М.Л., Васильев А.Ф.

Научно-исследовательский центр «Курчатовский институт» – Центральный научно-исследовательский институт конструкционных материалов «Прометей»,
191015, Санкт-Петербург, Шпалерная ул., д. 49.

e-mail: npk3@crism.ru

doi: 10.21519/0234-2758-2018-S-100-100

В современной медицине (травматология, ортопедия, стоматология) широкое применение нашли искусственные материалы, используемые для восстановления поврежденных органов или тканей. Такие материалы (имплантаты) восполняют дефицит живой ткани, чаще всего костной, продолжительное время сохраняя свою работоспособность. Однако имплантаты на основе титана и титановых сплавов не обладают достаточными бактерицидными свойствами, биосовместимостью и остеоинтергацией. В результате появляется опасность возникновения воспалительных процессов, смещения имплантата и его отторжения. Решением данной проблемы является модификация поверхности имплантата за счёт использования керамических антибактериальных биосовместимых покрытий [1-3].

Проведены работы по возможностям использования технологий микроплазменного, магнетронного и ионно-плазменного напыления, в том числе для медицинских инструментов, включающие напыление керамических покрытий нитридов и оксинитридов титана и циркония; разработаны покрытия с нанокристаллической структурой. Наиболее эффективные бактерицидные свойства по отношению ко всем исследованным видам бактерий отмечены у покрытия из оксинитрида титана, антибактериальный эффект резко проявляется уже через 30 минут контакта с бактериями. Установлено, что достигнутый бактерицидный эффект вызван воздействием химических элементов, диффундирующих из покрытий в жидкую среду. По всем изученным показателям, характеризующим общетоксическое, кожно-резорбтивное, местно-раздражающее, аллергенное, тератогенное и другие виды действия, покрытия не являются опасными для живого организма. Наряду с бактерицидными свойствами исследованные покрытия имеют высокую коррозионную стойкость в условиях высокотемпературной стерилизационной обработки медицинских инструментов.

Список использованных источников:

1. Уорден К. Новые интеллектуальные материалы и конструкции. Свойства и применение. Москва: Техносфера, 2006. - 224 с.
2. Иванов С.Ю. Новое поколение биоконпозиционных материалов для замещения дефектов костной ткани / С.Ю. Иванов, Л.И. Гиллер, А.Ф. Бизяев [и др.] //Новое в стоматологии. – 1999. - №5. - С.47-50.
3. Тапальский Д.В., Осипов В.А., Сухая Г.Н., Ярмоленко М.А., Рогачев А.А., Рогачев А.В. Биосовместимые композиционные антибактериальные покрытия для защиты имплантатов от микробных биопленок // Проблемы здоровья и экологии. – 2013, Т. 36, № 2, С. 129-134.

Рег. № 1306 от 28.06.99. Выдано Госкомпечать России

Издатель: Федеральное государственное бюджетное учреждение «Государственный научно-исследовательский институт генетики и селекции промышленных микроорганизмов Национального исследовательского центра «Курчатовский институт» (НИЦ «Курчатовский институт» – ГосНИИГенетика)
Москва, 117545, 1-ый Дорожный проезд., дом 1

Подписано в печать 24.09.2018 г. Формат бумаги 90 x 60
Бумага офсетная. Офсетная печать. Печ. л. 12,75. Тираж 200 экз.

Заказ №

Отпечатано с готового оригинал-макета в ООО «Типография Гарт»
105082, Москва, М. Почтовая, 12