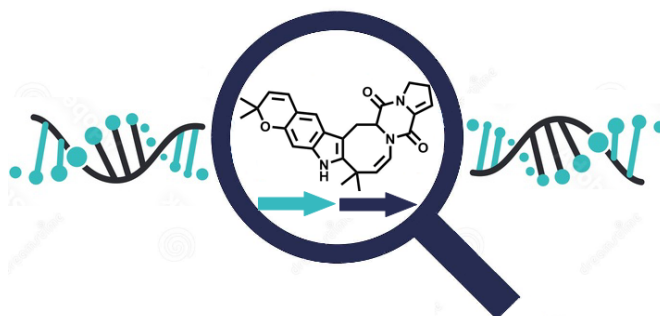


Министерство науки и высшего образования Российской Федерации
Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г. Б. Елякова
Дальневосточного отделения Российской академии наук
(ТИБОХ ДВО РАН)



ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ТЕХНОЛОГИИ В ИССЛЕДОВАНИЯХ ПРИРОДНЫХ СОЕДИНЕНИЙ

II Всероссийская научная школа-конференция
молодых ученых и студентов

*Владивосток
23–28 сентября 2024 г.*

Тезисы конференции

Владивосток



2024

© Оформление. ФГАОУ ВО ДВФУ, 2024
ISBN 978-5-7444-5806-5

**II Всероссийская научная школа-конференция молодых ученых и студентов
«Генетические технологии в исследованиях природных соединений»**

УДК 57:60(06)

ББК 28.07я431 + 28.087.1я431 + 28.4я431 + 28я431

Мероприятие проведено при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования РФ в рамках реализации отдельных мероприятий Федеральной научно-технической программы развития генетических технологий на 2019-2027 годы по дополнительному соглашению № 075-15-2021-1052/9 от 2 мая 2024 г. к соглашению № 075-15-2021-1052 от 29 сентября 2021 г.

Организационный комитет выражает благодарность за оказанную поддержку Дальневосточному федеральному университету, ООО «СкайДжин», ООО «ПТФ «Корпус», ООО «Компания Хеликон», ООО «НПФ Синтол», ООО «Профилаб», ООО ТД «Химмед», ООО «БМТ».

Генетические технологии в исследованиях природных соединений. II Всероссийская научная школа-конференция молодых ученых и студентов, Владивосток, 23–28 сентября 2024 г. : тезисы докладов / ТИБОХ ДВО РАН. – Владивосток: Издательство Дальневосточного федерального университета, 2024. – [114 с.]. – ISBN 978-5-7444-5806-5. – DOI <https://doi.org/10.24866/7444-5806-5>. – URL: <https://www.dvfu.ru/science/publishing-activities/catalogue-of-books-fefu/>. – Дата публикации: 01.11.2024. – Текст. Изображение: электронные.

Сборник включает материалы устных и постерных докладов, представленных на II Всероссийской научной школе-конференции «Генетические технологии в исследованиях природных соединений» ведущими учеными, молодыми специалистами, аспирантами и студентами. Тематика докладов охватывает широкий спектр исследований в области молекулярной и физико-химической биологии, микробиологии, биотехнологии, биоинформатики и геномики. В сборнике представлены результаты исследований биоразнообразия, систематики и генетики микроорганизмов, обсуждаются актуальные проблемы применения генетических технологий в исследовании природных биоактивных соединений, создания биотехнологически ценных продуцентов, а также новые генетические инструменты и технологии.

Материалы сборника могут представлять интерес для студентов, аспирантов, научных сотрудников и специалистов в области микробиологии, физико-химической и молекулярной биологии, геномики и бионформатики.

Текстовое электронное издание

Минимальные системные требования:

Веб-браузер Internet Explorer версии 6.0 или выше,

Opera версии 7.0 или выше, Google Chrome версии 3.0 или выше.

Компьютер с доступом к сети Интернет.

Минимальные требования к конфигурации и операционной системе компьютера определяются требованиями перечисленных выше программных продуктов.

Размещено на сайте 01.11.2024 г.

Объем 4,80 Мб

Дальневосточный федеральный университет
690922, Приморский край, г. Владивосток, о. Русский, п. Аякс, 10.

E-mail: prudkoglyad.sa@dvfu.ru

Тел.: 8 (423) 226-54-43

© Оформление. ФГАОУ ВО ДВФУ, 2024

Председатель программного комитета

Исаева Марина Петровна, к.м.н., доцент, заведующий лабораторией морской биохимии Тихоокеанского института биоорганической химии им. Г. Б. Елякова ДВО РАН.

Члены программного комитета

Стоник Валентин Аронович, д.х.н., профессор, академик РАН, научный руководитель Тихоокеанского института биоорганической химии им. Г. Б. Елякова ДВО РАН.

Козлов Сергей Александрович, д.х.н., заведующий лабораторией нейрорецепторов и нейрорегуляторов Государственного научного центра Российской Федерации Института биоорганической химии им. академиков М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова РАН.

Рихтер Владимир Александрович, д.б.н., заведующий лабораторией биотехнологии Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН.

Карначук Ольга Викторовна, д.б.н., профессор, заведующий лабораторией биохимии и молекулярной биологии Национального исследовательского Томского государственного университета.

Дубовский Иван Михайлович, д.б.н., профессор, руководитель исследовательского центра биологической защиты растений Новосибирского государственного аграрного университета.

Кабилов Марсель Расимович, к.б.н., руководитель ЦКП «Геномика» Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН.

Орлова Татьяна Юрьевна, к.б.н., зам. директора по научной работе, научный руководитель лаборатории морской микробиоты Национального научного центра морской биологии ДВО РАН.

Бурыгин Геннадий Леонидович, к.б.н., доцент, старший научный сотрудник Института биохимии и физиологии растений и микроорганизмов ФИЦ СНЦ РАН.

Куриленко Валерия Валерьевна, к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории микробиологии Тихоокеанского института биоорганической химии им. Г. Б. Елякова ДВО РАН, куратор биоресурсной коллекции «КММ ТИБОХ ДВО РАН».

Председатель организационного комитета

Лещенко Елена Владиславовна, к.х.н., научный сотрудник лаборатории биологически активных соединений Института наукоемких технологий и передовых материалов Дальневосточного федерального университета.

Члены организационного комитета

Дмитренко Павел Сергеевич, д.х.н., директор Тихоокеанского института биоорганической химии им Г. Б. Елякова ДВО РАН.

Голик Сергей Сергеевич, к.ф-м.н., директор Института наукоемких технологий и передовых материалов Дальневосточного федерального университета.

Винников Кирилл Андреевич, к.б.н., директор Института Мирового океана Дальневосточного федерального университета.

Текутьева Людмила Александровна, к.т.н., директор Передовой инженерной школы «Институт биотехнологий, биоинженерии и пищевых систем» Дальневосточного федерального университета, генеральный директор ООО «Арника».

Гризанова Екатерина Валерьевна, к.б.н., доцент кафедры защиты растений, ведущий научный сотрудник лаборатории биологической защиты растений и биотехнологии Новосибирского государственного аграрного университета.

Быстрицкая Евгения Петровна, научный сотрудник лаборатории морской биохимии Тихоокеанского института биоорганической химии им. Г. Б. Елякова ДВО РАН.

Боркунов Глеб Владимирович, аспирант Института наукоемких технологий и передовых материалов Дальневосточного федерального университета.

Хмель Ольга Олеговна, аспирант Передовой инженерной школы «Институт биотехнологий, биоинженерии и пищевых систем» Дальневосточного федерального университета.

Нестеренко Лилиана Евгеньевна, аспирант, младший научный сотрудник лаборатории химии микробных метаболитов, аспирант Тихоокеанского института биоорганической химии им. Г. Б. Елякова ДВО РАН.

Шлык Надежда Павловна, ассистент Передовой инженерной школы «Институт биотехнологий, биоинженерии и пищевых систем» Дальневосточного федерального университета.

Старновская Софья Сергеевна, аспирант, младший научный сотрудник лаборатории химии микробных метаболитов Тихоокеанского института биоорганической химии им. Г. Б. Елякова ДВО РАН.

Шлык Надежда Павловна, лаборант-исследователь лаборатории биологически активных соединений Института наукоемких технологий и передовых материалов ДВФУ.

Балдаев Сергей Николаевич, аспирант, младший научный сотрудник лаборатории морской биохимии Тихоокеанского института биоорганической химии им. Г. Б. Елякова ДВО РАН.

Содержание

Возможности гражданской науки для ответа на вызовы сегодняшнего и завтрашнего дня <i>Н. А. Кузнецов</i>	12
VV-GMCSF-LACT – первый российский онколитический вирус в клинических испытаниях <i>В. А. Рихтер, Е. В. Кулигина, О. А. Коваль, Г. В. Кочнева</i>	13
БИОИНФОРМАТИКА И СРАВНИТЕЛЬНАЯ ГЕНОМИКА – ИСТОЧНИК НОВЫХ ГЕНЕТИЧЕСКИХ ИНСТРУМЕНТОВ И ТЕХНОЛОГИЙ	14
Глобальный патогеномный анализ возбудителя рисовой гнили <i>Xanthomonas oryzae</i> для определения резистома, вирулома, мобилома и филогенетического профиля <i>П. А. Адедибу, О. М. Сон, Л. А. Текутьева, Л. А. Балабанова</i>	14
Биоинформатический анализ генов оксидоскваленциклаз голотурий <i>С. Н. Балдаев, К. В. Исаева, А. В. Бойко, М. П. Исаева</i>	15
Референсные гены β-актин и 36B4 у мягкого коралла <i>Sclerophytum heterospiculatum</i> (Verseveldt, 1970) <i>Е. Т. Бизикашвили*, Е. В. Шамишурина, Т. В. Сикорская</i>	16
Сравнительный анализ генов углеводов-активных ферментов (CAZymes) у бактерий рода <i>Formosa</i> <i>Е. П. Быстрицкая, О. И. Недашковская, Н. Ю. Отставных, В. И. Еремеев, С.-Г. Ким, М. П. Исаева</i>	17
Вторичные структуры ITS2 рРНК и филогения трематод семейства Allocreadiidae (Digenea: Gorgoderioidea) <i>К. С. Вайнутис, А. Н. Воронова, М. Сингх</i>	18
Сравнительная геномика немодельных организмов – основные вызовы и пути их решения <i>К. А. Винников</i>	19
Генетические основы функционирования Quorum Sensing систем у <i>Rhodococcus qingshengii</i> VER34 <i>И. В. Злобин, М. Н. Соколов, Ю. В. Зайцева</i>	20
Сравнительный анализ геномов морских бактерий рода <i>Parasoccus</i>, фокус на внехромосомные генетические элементы <i>А. И. Иващенко, Л. А. Романенко, В. И. Еремеев, М. П. Исаева</i>	21
Опыт использования геномных технологий для изучения биоресурсной коллекции КММ ТИБОХ ДВО РАН <i>М. П. Исаева</i>	22
Влияние температуры на экспрессию генов <i>Sphagnum magellanicum</i> Brid. <i>Д. И. Казанцева, Д. С. Щуряков, И. И. Волкова</i>	23
Поведенческое тестирование как один из основных методов для подтверждения эффективности терапии при моделировании миопатии Миоши <i>Е. В. Кузубова, А. И. Радченко, И. А. Яковлев, И. С. Лимаев, М. В. Корокин</i>	24

Сравнительный анализ генов транспортных систем бактерий рода <i>Zobellia</i> <i>Н. Ю. Отставных, В. И. Еремеев, Е. П. Быстрицкая, О. И. Недашковская, М. П. Исаева</i>	25
Поиск и биоинформатический анализ генных кластеров сульфатированных полисахаридов в морских бактериях <i>Ю. В. Савичева, М. С. Кокоулин, Л. А. Романенко, М. П. Исаева</i>	26
<i>In vitro</i> анализ мобильных генетических элементов в транскриптомах рыб с использованием технологии RACE <i>В. М. Черезова, Т. Ю. Майор, Т. В. Сидорова, Ю. П. Сапожникова, А. Г. Королева, Л. В. Суханова</i>	27
Молекулярное моделирование взаимодействия рецептора FLS2 с лигандами с применением AlphaFold3 <i>С. Ю. Щеголев, Г. Л. Бурыгин, Л. Ю. Матора, Ю. В. Фадеева</i>	28
БИОРАЗНООБРАЗИЕ, СИСТЕМАТИКА И ГЕНЕТИКА МИКРООРГАНИЗМОВ КАК ОСНОВА БИОБАНКОВ И БИОРЕСУРСНЫХ КОЛЛЕКЦИЙ	29
Биоразнообразие эндофитных микроорганизмов лекарственного растения <i>Polygonum cuspidatum</i> на Дальнем Востоке России <i>А. А. Береш, О. А. Алейнова, А. А. Ананьев, Н. Н. Нитяговский, А. Р. Сунрун, К. В. Киселев</i>	29
Коллекция фитопатогенных бактерий, выделенных из тепличной культуры <i>Cucumis sativus</i> L. <i>А. А. Бычкова, К. Д. Деснева, Ю. В. Зайцева</i>	30
Поиск штаммов микроорганизмов с уникальными агро и биотехнологическими свойствами: от работы школьника до полногеномного секвенирования. <i>Е. Н. Воронина, Е. А. Соколова, И. Н. Троменилгер, О. В. Мишукова, И. В. Хлистун, Н. В. Смирнова</i>	31
Выделение чистой культуры нового представителя <i>Nitratidesulfovibrio</i>, из воды радонового источника в селе Чистоводное, Приморского края <i>М. Ю. Глуценко, А. П. Лукина, Л. Б. Глухова, Л. О. Соколянская, И. И. Русанов, М. П. Исаева, О. В. Карначук</i>	32
Биоразнообразие эндофитных бактерий и грибов ели <i>Picea jezoensis</i>, произрастающей на Дальнем Востоке России <i>А. А. Днепровская, Н. Н. Нитяговский, О. А. Алейнова, К. В. Киселёв</i>	33
Микробиом воды и рыб в системе аквакультуры <i>Oncorhynchus mykiss</i> <i>Д. А. Доколин, Ю. В. Зайцева</i>	34
Использование информационной системы «Биобанк КММ» для работы с генетическими и метаболическими данными <i>М. П. Исаева, В. В. Куриленко, А. Н. Юрченко, Е. П. Быстрицкая, В. Е. Чаусова, И. Е. Ильин, П. А. Лысюк, К. В. Гузев</i>	35
Целевое выделение чистых культур ранее некультивируемых бактерий <i>О. В. Карначук</i>	36
Оценка эффективности перспективных штаммов рода <i>Bacillus</i>, выделенных в Западной Сибири <i>А. С. Козлова, Т. В. Шпатова, В. С. Масленникова, Е. В. Шелихова, К. А. Табанюхов, И. М. Дубовский</i>	37

Биоразнообразие и биотехнологический потенциал грибов рода <i>Cladosporium</i> из морских мест обитания	
Я. В. Крохмалёва, Н. Н. Киричук, В. Е. Чаусова, Ю. В. Худякова, М. В. Пивкин	38
Разнообразие микробиоты морских полихет на примере представителей рода <i>Vibrio</i>, выделенных из <i>Chaetopterus cautus</i>	
В. В. Куриленко, Н. Ю. Отставных, Д. О. Личманюк, М. П. Исаева	39
Целевое культивирование “<i>Candidatus Ozemobacter sibiricus</i>” из вод глубоинной термальной скважины в томской области	
А. П. Лукина, Л. О. Соколянская, И. И. Русанов, Л. Б. Глухова, А. В. Ракитин, О. В. Карначук..	40
Метагеномное профилирование эукариот, населяющих различные части российского трюфельного гриба <i>Tuber magnatum</i>	
Е. В. Малыгина, Н. А. Имидоева, А. Ю. Бельшенко, Т. Н. Вавилина, Д. В. Аксёнов-Грибанов	41
Определение скоростей микробных процессов сульфатредукции, ассимиляции углекислоты, продукции и окисления метана радиоизотопным методом, в воде радонового источника в селе Чистоводное, Приморского края	
И. И. Русанов, А. П. Лукина, Л. О. Соколянская, Е. Е. Захарова, М. П. Исаева, О. В. Карначук..	42
Создание коллекции микроорганизмов, обладающих механизмом Quorum Quenching	
М. Н. Соколов, И. В. Злобин, Е. Д. Перова, А. С. Сысуев, Ю. В. Зайцева	43
Изучение биоразнообразия подвигов бактерий <i>Bacillus thuringiensis</i> для разработки биоинсектицида для контроля численности колорадского жука	
Д. С. Терещенко, Е. В. Гризанова, Т. И. Крыцына, И. М. Дубовский	44
Изменение культивируемой микрофлоры и ее характеристик на примере различных стадий развития культурных растений Татарстана	
М. Фролов, Э. Э. Валлиахметов, А. Ю. Суханов, Б. Р. Исламов, Е. Ю. Шульга, Э. Н. Комиссаров, Ш. З. Валидов	45
Молекулярно-генетические подходы для идентификации биотехнологически ценных штаммов морских грибов	
В. Е. Чаусова, Н. Н. Киричук, Ю. В. Худякова, М. П. Исаева.....	46
Биоразнообразие симбиотических бактерий морской полихеты <i>Chaetopterus cautus</i>	
С. Е. Шевцова, В. И. Еремеев, В. В. Куриленко, М. П. Исаева	47
МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ТЕХНОЛОГИИ: ОТ ГЕНА К БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИ ЦЕННОМУ ПРОДУЦЕНТУ	48
Влияние рекомбинантной щелочной фосфатазы морской бактерии на хроническое воспаление	
Г. А. Бондарев, Л. В. Слепченко, А. В. Сейткалиева, Л. А. Балабанова	48
Современные подходы к преодолению устойчивости бактерий к антибиотикам и тяжёлым металлам	
Г. Л. Бурьгин	49
Как молекулярно-генетические механизмы резистентности насекомых к бактериям <i>Bacillus thuringiensis</i> помогают совершенствовать биопрепараты	
Е. В. Гризанова, И. М. Дубовский	50

Создание CRISPR/Cas9 системы, регулируемой малыми молекулами на уровне направляющей РНК	
<i>О. А. Должикова, М. И. Мещанинова, Д. С. Новопашина</i>	51
Использование генетических технологий для защиты растений от насекомых вредителей	
<i>И. М. Дубовский, Е. В. Гризанова</i>	52
Создание высокоактивных штаммов-продуцентов вторичных метаболитов в грибах: классические и генно-инженерные подходы	
<i>А. А. Жгун</i>	53
Конструирование слитого белка спидроин-эндолизин	
<i>А. А. Казыргулова, А. И. Прозоров, Б. В. Свиридов</i>	54
Пептиды Кунитц-типа морской анемоны <i>Heteractis magnifica</i>: структурное разнообразие и фармакологический потенциал	
<i>А. Н. Кветкина, Н. Ю. Отставных, А. А. Климович, Е. А. Пислягин, М. П. Исаева, Е. В. Лейченко</i>	55
Вирулентность и стратегии развития популяций <i>Bacillus thuringiensis</i> в условиях <i>in vitro</i> и <i>in vivo</i>	
<i>Т. И. Крыцына, Е. В. Гризанова, И. М. Дубовский</i>	56
Рациональный дизайн высокоточных термостабильных ДНК-полимераз для биотехнологий	
<i>А. А. Кузнецова</i>	57
Клонирование гена тауматина и оценка экспрессии рекомбинантного белка, секретируемого генетически модифицированным организмом <i>Pichia pastoris</i>	
<i>А. К. Лейберова, И. Г. Синельников, Е. Г. Ковалева</i>	58
Создание рекомбинантных микобактериальных штаммов, экспрессирующих агонисты TLR	
<i>А. Ю. Маркова, Л. Г. Кондратьева</i>	59
Изучение взаимодействия актинопорина Hct-S3 с модельными липидными мембранами	
<i>А. П. Павленко, С. С. Ефимова, А. Н. Кветкина, Е. В. Лейченко, О. С. Остроумова</i>	60
Влияние мутаций в активном центре магнификамида на эффективность ингибирования свиной панкреатической α-амилазы	
<i>Д. В. Попкова, А. С. Меньшов, О. В. Синцова, Н. А. Бороздина, И. А. Дьяченко, И. Н. Гладких, Е. В. Лейченко</i>	61
Мембранно-активные антимикробные пептиды растений - перспективные соединения для биомедицины и агробиотехнологий	
<i>Е. А. Рогожин, И. М. Михель, А. С. Барашкова</i>	62
Иммуногистохимическая оценка головного мозга у мышей с таупатией при применении синтетического агониста эритропоэтина	
<i>Ю. В. Степенко</i>	63
Ингибиторы тирозил-ДНК-фосфодиэстеразы 1 на базе липофильных производных нуклеозидов как сенситизаторы топотекана <i>in vitro</i> и <i>in vivo</i>	
<i>И. А. Чернышова, Т. Е. Корниенко, Н. С. Дырхеева, А. Л. Захаренко, М. С. Дреничев, О. И. Лаврик</i>	64

ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКАЯ БИОЛОГИЯ И БИОТЕХНОЛОГИЯ: ПРИРОДНЫЕ БИОАКТИВНЫЕ СОЕДИНЕНИЯ	65
Влияние метилжасмоната и салициловой кислоты на эмбриональное развитие морских ежей <i>Strongylocentrotus intermedius</i> и экспрессию генов биосинтеза их нафтохиноидных пигментов	
<i>Н. В. Агеенко, К. В. Киселев</i>	65
Исследование новых производных берберина в качестве ингибиторов нейраминидазы вируса гриппа А (H1N1) <i>in silico</i> и <i>in vitro</i>	
<i>Ф. Ф. Амирджанов, А. Д. Загребаев, К. А. Онасенко</i>	66
Новые зостеропениллины и паллидопениллины из морского микроскопического гриба <i>Penicillium yezoense</i> КММ 4679	
<i>Г. В. Боркунов, Н. П. Шлык, Е. А. Чингизова, Е. В. Лещенко</i>	67
Оценка генотоксических свойств трутовых грибов на примере <i>Drosophila melanogaster</i>	
<i>А.-В. В. Василевская, О. Н. Антосюк, А. А. Ермошин</i>	68
Онколитический вирус VV-GMCSF-Lact: особенности действия и разработка подходов терапии глиом	
<i>Н. С. Васильева, А. Б. Агеенко, А. А. Бывакина, В. А. Рихтер, Е. В. Кулигина</i>	69
Природные mcl-полигидросиалканоатов в получении гибридных полимер-липидных наночастиц	
<i>А. П. Воротнева, И. Н. Зубков, С. М. Шишлянников.....</i>	70
Установление молекулярных мишеней биологически активных молекул методом электрофизиологии на клетках млекопитающих	
<i>П. А. Галенко-Ярошевский, Д. И. Осмаков, Б. А. Трофимов, М. М. Шаматова, К. К. Евланенков, С. А. Козлов</i>	71
Фотобиосинтез биологически активных веществ микроводорослей в промышленных масштабах	
<i>Р. Г. Геворгиз, С. Н. Железнова, И. В. Наумов, Н. И. Бобко, М. В. Нехорошев.....</i>	72
Фоторегуляция системы CRISPR/Cas9 на уровне модифицированных направляющих РНК	
<i>Е. С. Горленко, Л. В. Саковина, В. М. Гольшев, Д. С. Новопашина</i>	73
Пептидные конъюгаты ингибирующих и направляющих РНКазу Р олигонуклеотидов как потенциальные антибактериальные агенты	
<i>Н. А. Данилин, А. В. Бардашева, А. Л. Матвеев, В. М. Гольшев, Д. С. Новопашина.....</i>	74
Доклинические исследования высокотехнологичных лекарственных соединений	
<i>И. А. Дьяченко</i>	75
Получение биомассы морской диатомеи <i>Nanofrustulum shiloi</i> с высоким содержанием фукоксантина в промышленных масштабах	
<i>С. Н. Железнова, Р. Г. Геворгиз, А. А. Благинина, Н. И. Бобко, М. В. Нехорошев.....</i>	76
Использование морских люминесцентных бактерий для мониторинга токсичности растворов селенита натрия и их детоксикации путем биосинтеза наночастиц селена	
<i>А. В. Зеньков, Е. С. Сушко, Н. С. Кудряшева</i>	77

Цистостин – малоизученный антибиотик пуринового ряда, ингибирующий трансляцию через образование пептидил-цистостина	
<i>П. А. Зотова, Д. А. Лукьянов, Е. С. Комарова, В. А. Алферова, П. В. Сергеев, С. С. Терехов.....</i>	78
Высокоэффективный промышленный способ очистки терапевтических белков от бактериальных эндотоксинов	
<i>С. А. Ишук.....</i>	79
Разработка аналитической методики ИО-ВЭЖХ для нового биотехнологического препарата	
<i>А. В. Кабанова, С. С. Тимофеев.....</i>	80
Разработка технологии выделения полипептидов из органов и тканей КРС с применением подхода Дизайн эксперимента (DoE)	
<i>А. В. Казакова, С. А. Ишук.....</i>	81
Нейротоксин RrIII из морской анемоны <i>Heteractis magnifica</i> – селективный модулятор потенциал-зависимых натриевых каналов насекомых	
<i>Р. С. Калина, Н. А. Прийменко, Н. Ю. Отставных, С. Пеньёр, И. Н. Гладких, Я. Тимгат, М. П. Исаева, Е. В. Лейченко</i>	82
Получение перспективных для науки и медицины соединений на основе действующих на никотиновые холинорецепторы природных пептидов - успехи и проблемы	
<i>И. Е. Кашеверов, И. В. Шелухина, Е. В. Крюкова, Ю. Н. Уткин, В. И. Цетлин.....</i>	83
Исследование противоаллергической активности HCRG21, пептида морской анемоны <i>Heteractis crispa</i>	
<i>Ю. В. Кожеевникова, А. А. Климович, Д. В. Попкова, Н. А. Прийменко, И. Н. Гладких, Е. В. Лейченко</i>	84
Индукция раннего врожденного иммунного ответа у мышей с помощью рекомбинантных штаммов БЦЖ	
<i>Л. Г. Кондратьева, В. В. Плешкан, И. А. Линге, Е. В. Снежков, И. В. Алексеенко.....</i>	85
Секрет вампира. Медицинская пиявка как природная аптека новых лекарственных средств	
<i>В. Н. Лазарев</i>	86
Разработка лекарственного препарата на основе пептидного блокатора TRPV1 канала	
<i>Е. В. Лейченко</i>	87
Поиск продуцентов биологически активных метаболитов среди изолятов фомоидных микромицетов, выделенных из растений Приморского края	
<i>Е. Г. Лукина, Е. И. Хмелькова, А. О. Берестецкий</i>	88
Мутантные аналоги ингибитора α-амилаз из морской анемоны <i>Heteractis magnifica</i>	
<i>А. С. Меньшов, А. С. Парамонов, Д. В. Попкова, О. В. Синцова, З. О. Шенкарёв, И. Н. Гладких, Е. В. Лейченко</i>	89
Использование гетеросфероидов раковых клеток и опухоль-ассоциированных фибробластов для моделирования опухолевых межклеточных взаимодействий	
<i>А. В. Моисеева, А. А. Белоусова, В. В. Плешкан, И. В. Алексеенко</i>	90
Антимикробная активность некоторых антрахинонов морских грибов	
<i>Л. Е. Нестеренко, Е. А. Юрченко, А. Н. Юрченко, Е. А. Чингизова</i>	91

Модифицированные направляющие РНК как компоненты систем CRISPR/Cas9 <i>Д. С. Новопашина</i>	92
Влияние фосфорилгуанидиновых модификаций в химерных направляющих РНК на активность системы CRISPR/Cas9 <i>Д. В. Прохорова, М. С. Купрюшкин, И. С. Довыденко, А. М. Матвеева, Г. А. Степанов</i>	93
Фармакологическая коррекция пептидными производным семакса и НАЕЕ нейродегенеративных процессов при моделировании болезни Альцгеймера на мышах линии APP^{swe}/PS1^{dE9}/Blg <i>А. И. Радченко, Е. В. Кузубова, М. В. Корокин, К. Д. Чапров</i>	94
Диатомовая микроводоросль <i>Nitzschia cf. thermaloides</i> как источник насыщенных жирных кислот <i>Н. С. Репкина, В. П. Воронин, О. И. Давидович, Н. А. Давидович, С. А. Мурзина</i>	95
Вторичные метаболиты морского гриба <i>Penicillium chermesinum</i> 2104NT-1.3 <i>А. Д. Савагина, Ngo Thi Duy Ngoc, А. Н. Юрченко, Е. А. Юрченко</i>	96
Вторичные метаболиты морского микроскопического гриба <i>Penicillium yezoense</i> KMM 4679 культивированного согласно стратегии OSMAC <i>М. А. Соловова, Н. П. Шлык, Г. В. Боркунов, Е. В. Лещенко</i>	97
Метаболитные профили морского гриба <i>Paraglomastix luzulae</i> KMM 4401 и его совместных культур с <i>Penicillium hispanicum</i> KMM 4689 <i>С. С. Старновская, Р. С. Попов, А. Н. Юрченко</i>	98
Биологически активные вторичные метаболиты грибов рода <i>Aspergillus</i>, ассоциированных с морскими губками <i>О. О. Хмель, Е. А. Чингизова, А. Н. Юрченко</i>	99
Применение цельноклеточных биосенсоров для исследования биоактивных соединений <i>А. А. Черенкова, О. Е. Мелькина</i>	100
Астеррипептиды А-С из морского микроскопического гриба <i>Aspergillus terreus</i> LM5.2 как новые перспективные препараты для лечения инфицированных ран <i>Е. А. Чингизова, Е. А. Юрченко, Е. А. Пислягин, А. В. Климович, Е. С. Менчинская, А. С. Кузьмич, А. Р. Чингизов, Д. Л. Аминин, А. Н. Юрченко</i>	101
Структура и биологическая активность вторичных метаболитов морского микроскопического гриба <i>Aspergillus niveoglaucus</i> KMM 4176 <i>Н. П. Шлык, Е. А. Чингизова, А. Р. Чингизов, Е. В. Лещенко</i>	102
Оценка уровня маркеров нейродегенерации головного мозга у трансгенных мышей P301S при применении фармацевтической композиции НАЕЕ-Zn-HAS <i>В. С. Шмигирова</i>	103
Двадцать пять лет исследований вторичных метаболитов грибов Коллекции морских микроорганизмов ТИБОХ ДВО РАН <i>А. Н. Юрченко, М. В. Пивкин</i>	104
АВТОРСКИЙ УКАЗАТЕЛЬ	105

Возможности гражданской науки для ответа на вызовы сегодняшнего и завтрашнего дня

Н. А. Кузнецов

Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, г. Новосибирск
электронная почта: Nikita.Kuznetsov@niboch.nsc.ru

Развитие технологий гражданских массовых экспериментов открывает новые возможности для развития ряда областей науки, в первую очередь биологии и биотехнологии. В целом, подход гражданской науки заключается в привлечении к научным исследованиям широкого круга активных граждан, добровольцев, которых называют научными волонтерами или гражданскими учеными. В мировой практике задачи, которые решаются с помощью подхода гражданской науки достаточно разнообразны: от описательных аспектов, например, при анализе путей миграций перелетных птиц и изучении животных или растений в различных регионах обитания до практических, когда проводится сбор разнообразных биообразцов, и эти образцы отправляются в научную организацию для детальных исследований.

Одним из типов образцов может выступать почва и почвенные микроорганизмы. Почва — это понятный объект для неспециалистов, участникам можно выдать инструкцию по методике сбора образца и описания характеристик места сбора, что позволит унифицировано проводить данную процедуру. При этом микроорганизмы, находящиеся в почве, могут использоваться для решения различных научных и практических задач. Так, в настоящее время представляется крайне актуальным развитие подходов, позволяющих быстро проводить исследование микробиологических сообществ на обширных территориях в целях решения задач генетических технологий и поиска новых штаммов-продуцентов перспективных продуктов, в том числе новых противомикробных препаратов и ферментов с уникальными свойствами.

В рамках данной работы сбор образцов почвы был направлен на решение нескольких проблем. Среди них, следует отметить проблему борьбы с заболеваниями, вызываемыми бактериями, устойчивыми к имеющимся в настоящее время терапевтическим препаратам. Эта проблема остро стоит во всем мире, в том числе в России. Поиск новых антибиотиков и поиск бактериофагов являются важнейшими задачами и могут открыть новые возможности для решения проблемы борьбы с лекарственно-устойчивыми микроорганизмами. Еще одной важнейшей частью поставленных в проекте задач является поиск новых ферментов - полимераз нуклеиновых кислот и ферментов, осуществляющих направленное расщепление нуклеиновых кислот с целью развития генетических технологий в России. Отдельно необходимо отметить направление по использованию почвенных микроорганизмов для конструирования микробиологических препаратов на основе консорциумов микробных сообществ для стимулирования роста растений, что является еще одной проблемой современного сельского хозяйства.

В результате проведенных работ исследованы тысячи новых микроорганизмов для выявления полезных свойств и создания биотехнологических препаратов на их основе. К настоящему моменту разработано 11 типов научно-технологической продукции, которые в 2024 году будут доведены до состояния готовых биотехнологических препаратов и/или прототипов лекарственных средств.

Исследование выполнено при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования РФ (соглашение № 075-15-2021-1085).

VV-GMCSF-LACT – первый российский онколитический вирус в клинических испытаниях

В. А. Рихтер^{1*}, Е. В. Кулигина^{1,2}, О. А. Коваль¹, Г. В. Кочнева³

¹Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, г. Новосибирск

²ООО «Онкостар», Сколково, г. Москва

³ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора, р.п. Кольцово, Новосибирская область

*электронная почта: richter@niboch.nsc.ru

Рекомбинантный вирус осповакцины VV-GMCSF-Lact сконструирован на основе отечественного штамма Л-ИБП вируса осповакцины. В экспериментах *in vitro* и *in vivo* продемонстрирована высокая цитотоксическая активность и противоопухолевая эффективность вируса в отношении опухолевых клеток человека различного происхождения. Кроме того, показана способность вируса подавлять развитие метастазов.

Доклинические исследования препарата, созданного на основе VV-GMCSF-Lact, подтвердили его безопасность и фармакологическую эффективность на животных моделях рака молочной железы. Препарат был рекомендован для клинических исследований.

В ноябре 2021 года получено разрешение Минздрава РФ на проведение первой фазы клинических исследований по Протоколу Oncolact2020 «Открытое мультикогортное исследование I фазы безопасности, переносимости и фармакокинетики лекарственного препарата на основе рекомбинантного штамма VV-GMCSF-Lact вируса осповакцины, раствор для инъекций, замороженный, у пациенток с рецидивирующим и/или рефрактерным метастатическим раком молочной железы в последовательных когортах с эскалацией дозы при однократном и многократном введении». Это первый российский препарат на основе онколитического вируса, получивший разрешение на проведение клинических исследований.

В докладе представлены результаты 1 фазы клинических исследований, а также данные о высокой эффективности препарата в отношении опухолей головного мозга на животных моделях. Обсуждаются вопросы проведения клинических исследований 1/2 фазы на пациентах с глиомами.

Исследование выполняется при финансовой поддержке гранта Российского научного фонда № 24-14-00390.

БИОИНФОРМАТИКА И СРАВНИТЕЛЬНАЯ ГЕНОМИКА – ИСТОЧНИК НОВЫХ ГЕНЕТИЧЕСКИХ ИНСТРУМЕНТОВ И ТЕХНОЛОГИЙ

Глобальный патогеномный анализ возбудителя рисовой гнили *Xanthomonas oryzae* для определения резистома, вирулома, мобилома и филогенетического профиля

П. А. Адедибу¹, О. М. Сон^{1,2}, Л. А. Текутьева^{1,2}, Л. А. Балабанова^{1,3}

¹Дальневосточный федеральный университет, г. Владивосток

²R&D Центр ООО «Арника», г. Владивосток

³Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г. Б. Елякова ДВО РАН, г. Владивосток

Oryza sativa (рис) является основным продуктом питания во многих регионах мира. Он культивируется во всем мире и кормит примерно половину населения мира. Это одна из культур, представляющих интерес для увеличения производства и достижения продовольственной безопасности. Тем не менее, несколько биотических стрессовых факторов угрожают увеличению производства риса, среди которых бактериальная болезнь, вызываемая *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. Для разработки эффективных стратегий борьбы необходимо понимание его эволюции, распространения и механизма заражения. В этом исследовании анализируются геномы 30 вирулентных штаммов *X. oryzae*, собранных в регионах-производителях риса на пяти континентах мира, чтобы определить генетические элементы, которые имеют решающее значение для его патогенности и адаптивности, а также оценить его внутривидовое разнообразие с использованием передовых инструментов геномики и биоинформатики. Средняя длина генома варьировалась от 4 948 537.н. до 5 118 699.н.; средний контиг N50 составил 4 955 372.н., включая 3886 аннотированных генов из нескольких категорий функциональных подсистем для каждого штамма. Анализ резистома выявил 28 различных типов генов устойчивости к антибиотикам (ARG), как врожденных, так и приобретенных, что свидетельствует о растущей угрозе штаммов *X. oryzae* с множественной резистентностью к противомикробным средствам. Шестнадцать вирулентных генов принадлежали к системам секреции III и VI типов, подвижности и эффекторных белков. Однако штаммы AUST2013, CIAT, IX01104 и NX0260 оказались потенциально менее вирулентными. Мобильные элементы, ответственные за горизонтальный перенос генов вирулентности и резистентности также способствуют патогенности *X. oryzae*. Анализ пангенома выявил внутривидовую изменчивость среди популяции - 112 уникальных кодирующих последовательности (CDS) с различными метаболическими, вирулентными и регуляторными функциями. Штаммы, собранные на Филиппинах, имели больше уникальных генов: PX0142 (48), PX061 (19) и PX086 (17). Филогенетический анализ подтвердил дивергентную эволюцию *X. oryzae*. Результаты этого исследования проливают свет на природу вирулентности, адаптивности, и динамику эволюции *X. oryzae*, что поможет определить эффективные стратегии управления ими и разработать устойчивые сорта риса и агрохимикаты для устойчивого производства риса.

Исследование выполнено при финансовой поддержке гранта Министерства науки и высшего образования Российской Федерации 15.BRK.21.0004 (доп. соглашение № 075–15-2021-1052/9).

Биоинформатический анализ генов оксидоскваленциклаз голотурий

С. Н. Балдаев^{1*}, К. В. Исаева¹, А. В. Бойко², М. П. Исаева¹

¹Тихоокеанский институт биоорганической химии имени Г. Б. Елякова ДВО РАН,
г. Владивосток

²Национальный научный центр морской биологии им. А. В. Жирмунского ДВО РАН,
г. Владивосток

*электронная почта: baldaevsergey@gmail.com

Ферменты оксидоскваленциклазы (ОСЦ) ответственны за превращение линейных тритерпенов в тетрациклические, которые известны как предшественники стерина и тритерпеновых гликозидов голотурий. У представителей родов *Apostichopus* и *Stichopus* (семейство Stichopodidae, отряд Synallactida) обнаружено по два гена ОСЦ, кодирующих паркеолсинтазу и ланостадиенолсинтазу [1].

Целью работы было получить гены ОСЦ голотурии *Eupentacta fraudatrix*. Ранее было показано присутствие двух мРНК ОСЦ в разных тканях *Eupentacta fraudatrix* [2]. В данной работе последовательности двух генов ОСЦ1 и ОСЦ2 *Eupentacta fraudatrix* были получены с помощью серии ПЦР с использованием ген-специфичных праймеров, разработанных на основе последовательностей кДНК. В результате были получены фрагменты длиной от 4 до 18 т.п.н. Ампликоны были секвенированы с использованием технологий Oxford Nanopore и собраны с помощью CLC Genomic Workbench 24.0.1, в результате чего получено по 6 гаплотипов длиной 30-40 т.п.н. для ОСЦ1 и 22-25 т.п.н. для ОСЦ2 соответственно. Анализ структуры генов показал наличие 19 экзонов и 18 интронов в каждом гене. Несмотря на высокую степень идентичности транскриптов ОСЦ1 и ОСЦ2, в последовательностях интронов не было обнаружено никаких гомологичных участков, что указывает на быструю их эволюцию при консервации белок-кодирующих последовательностей. Интересно, что длина соответствующих экзонов ОСЦ1 и ОСЦ2 была одинаковой, тогда как длина соответствующих интронов варьировала значительно (от 0.4 до 7.9 т.п.н.). Более того, длины некоторых интронов различались среди гаплотипов, например, размер интрона 2 у ОСЦ1 варьировался от 1.1 до 4.4 т.п.н. Полиморфизм интронов ОСЦ1 был более выражен, что указывает на то, что ОСЦ2 является продуктом дупликации ОСЦ1.

Ссылки:

1. Thimmappa, R., *et al.* // Nat. Chem. Biol. 2022. V. 18. P. 774–781.
2. Исаева М.П. и др. // Вестник ДВО РАН 2019. № 6S. С. 85-86.

Референсные гены β -актин и 36B4 у мягкого коралла *Sclerophytum heterospiculatum*
(Verseveldt, 1970)

Е. Т. Бизикашвили*, Е. В. Шамшурина, Т. В. Сикорская
Национальный научный центр морской биологии им. А. В. Жирмунского ДВО РАН,
г. Владивосток

*электронная почта: bilielena801@gmail.com

Мягкие кораллы (*Cnidaria: Anthozoa: Octocorallia*) считаются второй по распространенности группой животных макробентоса после рифообразующих кораллов на многих мелководных рифах [1]. Быстрые темпы изменения температуры мирового океана, вызванные антропогенными факторами, в настоящее время представляют серьезную угрозу для экосистем коралловых рифов [2]. Основным последствием повышения температуры морской воды является обесцвечивание кораллов. Ранее нами было установлено [3], что при обесцвечивании *Sclerophytum heterospiculatum* (ранее как *Simularia heterospiculata*) происходит перестройка профиля молекулярных видов структурных липидов, при которой снижается содержание фосфолипидов с простой эфирной связью (этерных фосфолипидов (ФЛ)), что может быть связано с нарушением их биосинтеза. Несмотря на то, что на данный момент известен ряд белков, участвующих в биосинтезе этерных ФЛ у коралловых полипов [4], работ по изучению экспрессии генов данных белков в процессе обесцвечивания кораллов практически нет. В качестве референсных генов коралловых полипов чаще всего используются рибосомальный фосфопротейн P0 (36B4 или RPLP0) и β -актин. Так как для *S. heterospiculatum* нет аннотированного генома и даже отсутствуют нуклеотидные последовательности референсных генов, нами предпринята попытка установить последовательности генов β -актин и 36B4 у данного вида мягкого коралла.

Были получены фрагменты мРНК размером 416 п.о. — 36B4 (PP830849) и 918 п.о. — β -актина (PP830850). С помощью построения филогенетического дерева (метод максимального правдоподобия) установленные последовательности 36B4 и β -актин были идентифицированы как коралловые. Таким образом, установленные последовательности могут быть использованы для подборки праймеров для ПЦР в реальном времени для исследования экспрессии генов биосинтеза этерных ФЛ коралловых полипов.

Ссылки:

1. Daly M. *et al.* // Zootaxa. 2007. V. 1668, N. 1. P. 127-182.
2. Boilard A. *et al.* // Microorganisms. 2020. V. 8, N. 11. P. 1682.
3. Sikorskaya T. V. *et al.* // Chem. Nat. Compd. 2024. V. 60, N. 2. P. 215-219.
4. Dean J. M. *et al.* // Protein Cell. 2018. V. 9, N. 2. P. 196-206.

Сравнительный анализ генов углеводов-активных ферментов (CAZymes) у бактерий рода *Formosa*

Е. П. Быстрицкая^{1*}, О. И. Недашковская¹, Н. Ю. Отставных¹, В. И. Еремеев¹, С.-Г. Ким²,
М. П. Исаева¹

¹Тихоокеанский институт биоорганической химии имени Г. Б. Елякова ДВО РАН,
г. Владивосток

²Корейская коллекция типовых культур, Центр биологических ресурсов, Корейский научно-исследовательский институт биологических наук и биотехнологий, Республика Корея

*электронная почта: ep.bystritskaya@yandex.ru

Гетеротрофные морские бактерии являются важными продуцентами гидролитических ферментов и способны осуществлять биodeградацию и модификацию полисахаридов водорослей. Таким образом они играют главную роль в переработке углерода из сложных полисахаридов в морской среде и представляют интерес для биотехнологического использования.

Целью настоящей работы являлось изучение гидролитического потенциала бактерий рода *Formosa* на основе сравнительного геномного анализа типовых штаммов восьми видов *Formosa* и двух штаммов из коллекции КММ ТИБОХ ДВО РАН: *Formosa* sp. КММ 6136 и *Formosa* sp. КММ 3963, выделенных из зеленой водоросли *Ulva fenestrata* и бурой водоросли *Saccharina japonica*, соответственно.

Штаммы КММ 6136 и КММ 3963 были секвенированы на платформах MiSeq (Illumina) и MinION (Oxford Nanopore Technologies). Гибридная сборка длинных и коротких прочтений была осуществлена с помощью Unicycler. Согласно результатам филогеномного анализа и расчетным геномным показателям исследуемые штаммы являлись кандидатами на новый вид рода *Formosa*.

Сравнительный геномный анализ на сервере dbCAN3 показал, что род *Formosa* обладает разнообразным репертуаром углеводов-активных ферментов (CAZymes), особенно специфичных для деградации полисахаридов макроводорослей. Доля генов, кодирующих углеводов-активные ферменты, в их геномах варьировала от 4,55% до 5,92% с максимальным количеством, предсказанным для штамма *F. haliotis* MA1^T. Наиболее представленным классом ферментов являлись гликозил-гидролазы, среди которых были распространены семейства GH3, GH95, GH43, входящие в ферментативные каскады деградации ламинарина, фукоидана и ксиланов водорослей, соответственно. В геноме *F. algae* КММ 3553^T также широко встречались гены ламинариназ и фукозидаз из других семейств – GH29, GH30, GH141. Большинство аннотированных полисахарид-лиаз были отнесены к семействам PL6, PL7, PL40, участвующим в деполимеризации альгината и ульвана. Среди углеводовных эстераз наиболее распространенным было семейство CE20, которое способствует деградации ксиланов морских водорослей путем деацетилирования. Кроме того, геномы *F. haliotis* MA1^T и *Formosa* sp. КММ 3963 содержали гены ферментов (GH43, PL10, CE8 и CE12), ответственных за деградацию пектина, что может представлять часть их стратегии адаптации, облегчающей потребление растительных полимерных субстратов в водной среде вблизи береговых линий и источников пресной воды.

Такое разнообразие углеводов-активных ферментов у бактерий рода *Formosa* свидетельствует о их широких адаптационных возможностях в разных экологических нишах и высоком биотехнологическом потенциале.

Исследование выполнено при финансовой поддержке гранта Министерства науки и высшего образования Российской Федерации 15.BRK.21.0004 (доп. соглашение № 075–15-2021-1052/9).

Вторичные структуры ITS2 рРНК и филогения трематод семейства Allostreadiidae
(Digenea: Gorgoderioidea)

К. С. Вайнутис^{1,2*}, А. Н. Воронова³, М. Сингх⁴

¹Национальный научный центр морской биологии им. А. В. Жирмунского ДВО РАН,
г. Владивосток

²Дальневосточный государственный технический рыбохозяйственный университет,
г. Владивосток

³Тихоокеанский филиал Всероссийского научно-исследовательского института рыбного
хозяйства и океанографии, г. Владивосток

⁴Национальное бюро рыбных генетических ресурсов ICAR, Лакхнау, Уттар Прадеш, Индия
*электронная почта: vainutisk@gmail.com

Весь анализ включал 104 последовательности полного участка ITS2 рРНК 43 видов трематод из 13 родов семейства Allostreadiidae. На основе участка ITS2 мы реконструировали вторичные структуры для этих видов (Рисунок 1). Из всей выборки были впервые предоставлены 48 последовательностей 12 видов из пяти родов. Работа включала новые полученные данные и ранее опубликованные зарубежными исследователями.

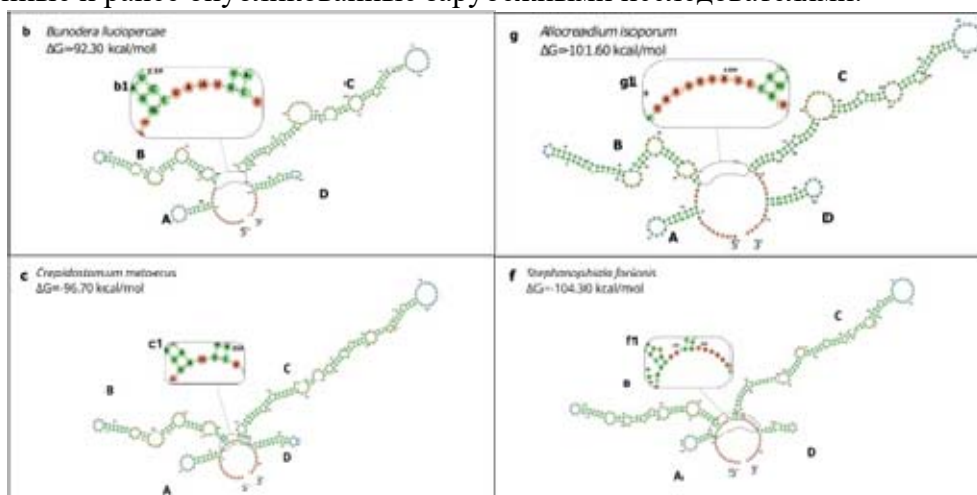


Рисунок 1 – Вторичные структуры ITS2 типовых видов родов *Bunodera*, *Allostreadium*, *Crepidostomum* и *Stephanophthalma*

Большинство структур (32) имели классическую конформацию, состоящую из четырёх доменов – А, В, С и D [1,2]. С-домены видов *Bunodera acerinae* и *Allostreadium* sp. были разделены на три ветви. Другие две структуры (*Creptotrema funduli*, *Pseudoparacreptotrema macroacetabulata*) характеризуются уникальной конформацией с высоко вариабельными доменами А и В. Филогенетические связи 43 видов Allostreadiidae были реконструированы на основе фрагмента участка ITS1-5.8S-ITS2 с помощью метода Байесовского Вывода. Самая ранняя дивергировавшая клада представлена видом *Crepidostomum chaenogobii*, другие 42 вида из 13 родов сформировали вторую кладу, что полностью меняет представление о филогении аллокреадиид на основе участка ITS, исходя из последнего исследования [3], в котором для филогенетической реконструкции не были задействованы последовательности ITS *C. chaenogobii*, *Acrolichanus* sp. и южноамериканских родов.

Ссылки:

1. Athokpam V. D. et al. // J Parasit Dis. 2014. V. 40, N. 2. P. 330–338.
2. Schultz J. et al. // RNA. 2005. V. 11. P. 361–364.
3. Petkevičiūtė R. et al. // Diversity. 2023. V. 15, N. 5. P. 645.

Сравнительная геномика немодельных организмов – основные вызовы и пути их решения

К. А. Винников

Дальневосточный федеральный университет, г. Владивосток

*электронная почта: vinnikov.ka@dvfu.ru

В 2024 году общий объем мировой продукции, получаемой в аквакультуре, превысил промысловую добычу диких морских и пресноводных гидробионтов [1]. В настоящее время прибрежная марикультура является одним из основных направлений ускоренного развития экономики на Дальнем Востоке России. Однако многие марикультурные предприятия в Приморском крае выращивают свои промысловые объекты исключительно для пастбищного разведения и последующего изъятия, используя часто непригодные подходы и любительские технологии, что приводит к определенным негативным последствиям для прибрежных морских экосистем так и для здоровья человека – конечного потребителя производимой продукции. Поддерживаемые популяции гидробионтов в марикультуре также постепенно деградируют из-за постепенного снижения генетического разнообразия, отбора крупных особей, повышения плотности популяции и загрязнения акватории.

В связи с этими причинами Лаборатория экологии и эволюционной биологии водных организмов Института Мирового океана ДВФУ (далее – Лаборатория) реализует ряд поисковых проектов с использованием современных технологий сравнительной геномики на немодельных морских организмах, выращиваемых в аквакультуре, для повышения показателей темпов производства (скорость роста, плодовитость, половозрелость, плотность), увеличения показателей потребительского качества продукции (выживаемость, размерность, половой состав), уменьшение производственных рисков (экологический мониторинг, аквавeterинария, устойчивость генофонда, разработка кормовой базы). Основной задачей Лаборатории в настоящий момент является интенсификация производства нескольких ключевых объектов аквакультуры (дальневосточный трепанг, тихоокеанская устрица, приморский гребешок) путем внедрения современных геномных технологий для получения иммуностимулирующих пробиотических комплексов, диагностики опасных заболеваний, мониторинга акватории на наличие патогенных микроорганизмов с помощью анализа средовой ДНК [2], фенотипирования и генотипирования гидробионтов с целью ускорения положительного отбора и создания устойчивого маточного стада с необходимыми характеристиками [3]. Для решения этих задач сегодня в Лаборатории используются методы полногеномного, экзонного и транскриптомного секвенирования, метогеномики, GWAS и генотипирования на микрочипах.

Для каждого геномного подхода под каждую задачу в Лаборатории разрабатываются соответствующие биоинформатические модули и необходимые алгоритмы, которые в настоящий момент собраны в единый пайплайн *EXONtools* [4].

Исследование выполнено при поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации, проект № FZNS-2024-0037 «Комплексный экологический мониторинг прибрежных морских и наземных экосистем Камчатки».

Ссылки:

1. FAO. The state of world fisheries and aquaculture. 2024. 232 p.
2. Sildever S. *et al.* // Environmental DNA. 2023. V. 5. P. 1202-1215.
3. Song H. *et al.* // Rev Aquac. 2022. V. 15. P. 1-18.
4. Vinnikov K. A. & Cole K.S. // BMC Bioinformatics. 2021 V. 591. O5.

Генетические основы функционирования Quorum Sensing систем у
Rhodococcus qingshengii VER34

И. В. Злобин*, М. Н. Соколов, Ю. В. Зайцева

Ярославский государственный университет им. П. Г. Демидова, г. Ярославль

*электронная почта: ily.zlobin21@yandex.ru

Quorum Sensing (QS) – это механизм, позволяющий бактериям регулировать экспрессию различных генов в зависимости от плотности их популяции. Любая система QS включает в себя сигнальную молекулу (индуктор), рецептор (фактор транскрипции) и фермент, катализирующий синтез новых молекул индуктора [1]. Известно, что QS играет важную роль в регуляции синтеза вторичных метаболитов и морфогенеза у представителей филума Actinobacteria [2]. Одной из систем коммуникации бактерий, которая, по-видимому, ограничивается актинобактериями, является QS система на основе γ -бутиролактонов (ГБЛ). ГБЛ связываются с одним или несколькими рецепторными белками, которые принадлежат к семейству регуляторов транскрипции TetR, участвующих в контроле экспрессии кластеров генов вторичных метаболитов [3].

Бактерии рода *Rhodococcus* представляют интерес для изучения, т.к. обладают большим биотехнологическим потенциалом ввиду широкого спектра метаболических путей и устойчивости к факторам внешней среды. Однако, молекулярные механизмы QS, регулирующие экспрессию биотехнологически значимых метаболитов у родококков изучены слабо. Проведённый нами ранее анализ *in silico* позволил обнаружить кластеры генов QS систем у представителей рода *Rhodococcus* [4], однако распространение элементов кластера неравномерно. Наиболее часто встречается ген регулятора транскрипции *gblR*, гены биосинтеза ГБЛ встречаются почти в 3 раза реже, что может свидетельствовать о способности родококков к межвидовой коммуникации.

Целью данного исследования являлась идентификация генов QS систем в геноме штамма *Rhodococcus qingshengii* VER34 и выявление основных закономерностей их функционирования.

В данной работе нами был секвенирован геном *R. qingshengii* VER34 (BioProject: PRJNA673759) длиной 62517665 п.о., в котором было аннотировано 5667 генов. Анализ *in silico* позволил обнаружить в геноме кластер генов QS систем, включающий в себя: синтазу ГБЛ *GblA*; рецептор ГБЛ *GblR*; лактоназы *QsdA* и *JydB*. Гены, кодирующие вышеуказанные белки, были выбраны для дальнейшего изучения. С помощью метода ПЦР в реальном времени нами было показано влияние сигнальных молекул на основе лактонов на экспрессию генов QS систем у *R. qingshengii* VER34.

Исследование частично выполнено в рамках проекта Фонда В. Потанина № ПЮФП25-0025/24.

Ссылки:

1. Abisado R. G. *et al.* // MBio. 2018. V. 9, N. 3. P. e02331-17.
2. Li X. *et al.* // Scientific reports. 2015. V. 5, N. 1. P. 1-14.
3. Kato J. *et al.* // Proceedings of the National Academy of Sciences. 2007. V. 104, N. 7. P. 2378-2383.
4. Злобин И. В. // Современные проблемы биологии, экологии, химии и естественно-научного образования. 2021. С. 42-47.

**Сравнительный анализ геномов морских бактерий рода *Paracoccus*, фокус на
внехромосомные генетические элементы**

А. И. Иващенко^{1,2*}, Л. А. Романенко¹, В. И. Еремеев¹, М. П. Исаева¹

¹Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г. Б. Елякова ДВО РАН,
г. Владивосток

²Дальневосточный федеральный университет, г. Владивосток

*электронная почта: ivashchenko.ail@dvfu.ru

Во время экспедиции НИС «Академик Опарин» в 2016 году в Чукотском море около острова Врангеля из образца грунта, поднятого с глубины 29 м, был изолирован штамм *Paracoccus everestensis* ch26/1, аксеничная культура которого была получена в 2021 году. Штамм был введен в Коллекцию морских микроорганизмов ТИБОХ ДВО РАН под номером КММ 9712. Гибридная сборка генома была осуществлена на основе полученных коротких (MiSeq, Illumina, США) и длинных (MinION, Oxford Nanopore, Великобритания) прочтений. Полный геном (5 031 217 п. н., ГЦ-состав – 63,9 %) был собран в одну кольцевую хромосому и 12 плазмид (pEVE1 – pEVE11). Для сравнения, геном типового штамма *P. everestensis* S8-55^T, выделенного в 2022 году из ледниковых отложений северного склона горы Эверест, имеет размер 2 957 708 п. н. и представлен одной хромосомой. В связи с чем нами был сделан фокус на анализ внехромосомных генетических элементов с целью выяснения роли плазмид в адаптации штамма ch26/1 к морским условиям среды обитания.

Была построена тепловая карта значений RSCU (relative synonymous codon usage, частота использования синонимичных кодонов) и проведено сравнение полученных значений для хромосомы и плазмид. Профиль частоты использования синонимичных кодонов для хромосомы и плазмид pEVE1 – pEVE3 не имел существенных различий, в отличие от остальных pEVE4 – pEVE11, что может указывать на их коэволюцию. Также аннотированные хромосомные и плазмидные гены были анализированы на принадлежность к кластерам ортологичных групп (COG). В процентном содержании относительно общего числа генов в каждом репликоне содержание отдельных ортологичных групп в хромосоме и плазмидах pEVE1 – pEVE3 было примерно одинаковым. В плазмидах pEVE4 – pEVE11 практически отсутствовали белки, отвечающие за транспорт и метаболизм аминокислот (категория E), в то время как доля белков, отвечающих за репликацию, репарацию и рекомбинацию (категория L), была выше, чем в хромосоме. Также наблюдалось преобладание в геноме штамма ch26/1 генов из pEVE1 – pEVE3, кодирующих белки теплового и холодового шока, сигма-факторы, синтез и транспорт трегалозы и бетаина. В геноме *P. everestensis* S8-55^T отсутствовал кластер биосинтеза эктоина, в то время как в геноме ch26/1 он локализовался в pEVE3.

Таким образом, плазмиды pEVE1 – pEVE3 могут играть более значительную роль в адаптации штамма ch26/1 к морским условиям среды обитания, чем плазмиды pEVE4 – pEVE11.

Исследование выполнено при финансовой поддержке гранта Министерства науки и высшего образования Российской Федерации 15.BRK.21.0004 (доп. соглашение № 075–15-2021-1052/9).

**Опыт использования геномных технологий для изучения биоресурсной коллекции
КММ ТИБОХ ДВО РАН**

М. П. Исаева

*Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г. Б. Елякова ДВО РАН,
г. Владивосток*

электронная почта: issaeva@gmail.com

В Тихоокеанском институте биоорганической химии ДВО РАН (ТИБОХ ДВО РАН) создана и хранится уникальная коллекция морских микроорганизмов (КММ ТИБОХ ДВО РАН). Коллекция содержит штаммы, которые были выделены из различных образцов воды, грунта, морских животных и водорослей во время береговых и морских экспедиций за период 1985-2023 годы, представляя практически все регионы Мирового Океана. В качестве объявленного фонда КММ ТИБОХ ДВО РАН включает более 4000 штаммов морских бактерий и более 1000 штаммов грибов-микровицетов. Таксономический состав биоресурсной коллекции представлен более 300 видами морских бактерий, среди которых сотрудниками лаборатории микробиологии было описано около 200 новых видов и 50 новых родов. В 2021 году КММ ТИБОХ ДВО РАН получила грант МИНОБРНАУКИ РФ по теме «Развитие биоресурсной коллекции «Коллекция морских микроорганизмов ТИБОХ ДВО РАН» для реализации Федеральной программы в области генетических технологий» и в 2024 году его продление. Основной целью проекта является повышение доступности и востребованности всесторонне охарактеризованных штаммов, в том числе с использованием геномного секвенирования. В ходе выполнения исследований по проекту в лаборатории морской биохимии были организованы работы по молекулярно-генетической идентификации новых и хранящихся штаммов КММ ТИБОХ ДВО РАН на основе секвенирования 16S rPHK, ITS, TEF1 BenA, CaM, RPB2 и других филогенетических маркеров. В результате проведено генотипирование более 350 штаммов морских бактерий и грибов-микровицетов, а также мультилокусное сиквенс-типирование бактерий родов *Zobellia* и *Vibrio*. С использованием технологий секвенирования на платформах MinION (Oxford Nanopore Technologies, Соединенное королевство) и MiSeq (Illumina, США) реализуется направление по полногеномному секвенированию типовых штаммов морских бактерий, штаммов-кандидатов на новые таксоны и штаммов с высоким биотехнологическим потенциалом. В результате получены 30 геномных последовательностей штаммов морских бактерий. Проведен сравнительный анализ геномов 6 родов морских бактерий (*Aligicella*, *Rhodoaligimonas*, *Profundicola*, *Ferzerhizobium*, *Cobetia* и *Mariniflexile*).

Таким образом, в лаборатории морской биохимии ТИБОХ ДВО РАН поставлены и успешно применяются генетические технологии для генотипирования изолятов и штаммов коллекции, получения и биоинформатического анализа геномов морских бактерий с целью описания новых родов и видов, а также оценки их биомедицинского и биотехнологического потенциала.

Исследование выполнено при финансовой поддержке гранта Министерства науки и высшего образования Российской Федерации 15.BRK.21.0004 (доп. соглашение № 075–15-2021-1052/9).

Влияние температуры на экспрессию генов *Sphagnum magellanicum* Brid.

Д. И. Казанцева, Д. С. Щуряков*, И. И. Волкова

Национальный исследовательский Томский государственный университет, г. Томск

*электронная почта: da46611@gmail.com

Болотные экосистемы играют ключевую роль в сохранении биологического разнообразия и регулировании климата территории. Они являются уникальными инструментами депонирования и консервации углерода, помогают в поддержании гидрологического баланса и обеспечивают среду обитания для множества видов растений и животных, выполняют рекреационные функции [1]. В условиях изменения климата и антропогенного давления изучение адаптивных механизмов растений, обитающих в болотных экосистемах, становится особенно актуальным.

Изучение экспрессии генов в ответ на температурные изменения предоставляет важные данные о механизмах адаптации растений к стрессовым условиям. В данном исследовании рассмотрена экспрессия генов при воздействии высоких и низких температур и выявлены ключевые механизмы адаптации.

Для данного исследования были использованы материалы по температурным стрессам *S. magellanicum* из Национального центра биотехнологической информации (NCBI), отвечающие следующим условиям: 1. Имеется по крайней мере две повторности для каждой обработки; 2. Стратегия библиотеки – RNA-Seq; 3. Источник библиотеки – транскриптомный; 4. Выбор библиотеки – cDNA. После предобработки и выравнивания на референсный геном, был произведен дифференциальный анализ генов с помощью DESeq2 (версия 1.38.3).

Исследование экспрессии генов под воздействием высоких и низких температур выявило значительные различия в адаптивных ответах растений. Под воздействием высоких температур экспрессия 40.46% генов изменяется, причем 52.13% из них проявляют повышенную экспрессию, а 47.87% – пониженную. Наибольшую активность в этих условиях показали гены теплового шока HSP17.6II и HSP20, что указывает на приоритетное включение механизмов защиты и восстановления белков при тепловом стрессе. Одновременно с этим, гены, кодирующие белки суперсемейства альфа/бета-гидролаз и гены LRR-ТМ киназы, продемонстрировали пониженную экспрессию, что может свидетельствовать о снижении метаболической активности и регуляции сигнальных процессов для минимизации повреждений при высоких температурах.

В условиях низких температур экспрессия генов была менее интенсивной, охватывая 9.13% генов, из которых 39.78% проявили повышенную экспрессию, а 60.27% – пониженную. Наибольшую активность в этих условиях показали гены, кодирующие белки NB-ARC (участвующие в устойчивости к заболеваниям), маннозо-связывающие лектины (MBL, распознающие углеводы и способствующие идентификации патогенов) и каротиноидный клейвающий диоксигеназа 1 (CCD1, участвующий в разложении каротиноидов). В то же время, гены RHOMBOID-like 1, регулирующие внутриклеточные процессы через протеолиз трансмембранных белков, Oligopeptide Transporter 5, обеспечивающие транспорт олигопептидов, и Related to AP2 4, участвующие в регуляции генов, связанных с развитием и реакцией на стресс, продемонстрировали пониженную экспрессию. Эти результаты указывают на значительную разницу в ответе растений на различные температурные стрессы. При высоких температурах активируются гены, направленные на защиту и восстановление белковых структур, в то время как при низких температурах увеличивается экспрессия генов, связанных с защитой от патогенов и метаболическими процессами.

Ссылки:

1. Schuryakov D. S. *et al.* // Turizm i regional'noe razvitie. 2023.V. 3, N. 7. P. 59-71.

Поведенческое тестирование как один из основных методов для подтверждения эффективности терапии при моделировании миопатии Миоши

Е. В. Кузубова^{1*}, А. И. Радченко¹, И. А. Яковлев², И. С. Лимаев², М. В. Корокин¹

¹Белгородский государственный национальный исследовательский университет, НИУ «БелГУ», г. Белгород

²ООО «Генотаргет», г. Москва

³НИИ морфологии человека им. академика А. П. Авцына ГНЦ РФ ФГБНУ РНЦХ им. академика Б. В. Петровского, г. Москва

*электронная почта: kuzubova@bsu.edu.ru

Интенсивность развития современной медицины и фармакологии заставляет здравоохранение обратить все больше внимание на наследственные заболевания и расширить область разработок в сфере патогенетического лечения [1]. В связи с чем встает вопрос о детальной проверке эффективности новых молекул. Одним из объективных методов исследования являются современные поведенческие тесты [2] с применением автоматизированного оборудования, для исключения предвзятого отношения исследователя к экспериментальным группам.

Ярким примером могут служить поведенческие тесты на выносливость и мышечную силу. В нашем исследовании была проверена эффективность генного препарата AAV9-ДИСФ-ДВ на мышечной линии B6.A-DYSF^{PRMD}/GENEJ, моделирующую мышечную дистрофию пояса конечностей типа R2. В ходе исследования был проведен ряд тестов: «Удержание на проволоке», «Удержание животного на скользком вертикальном стержне», «Перевёрнутая сетка», «Сила тяги» (рисунок 1), «Плывание с грузом» [3].

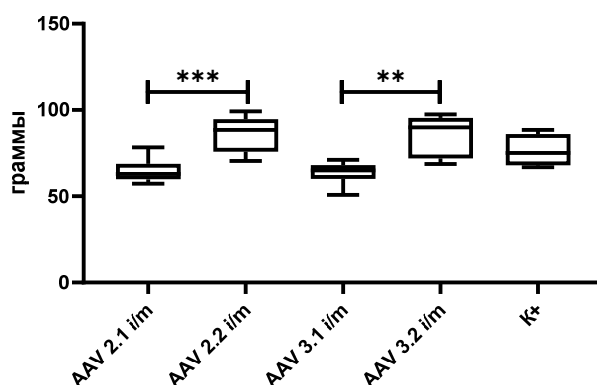


Рисунок 1 – Анализ оценки силы хватки передних конечностей в тесте «Сила хватки»

Сравнительный анализ эффективности действия препарата AAV9-ДИСФ-ДВ во временной динамике показал, что в группе AAV2 в/м в дозе $5E \times 10^{12}$ происходит рост медиального показателя на 22,21 пункта и AAV3 в/м с повторным введением препарата через 2 месяца после первичной инъекции в дозе $5E \times 10^{12}$ увеличился на 22 пункта.

Исследование выполнено при финансовой поддержке гранта Министерства науки и высшего образования Российской Федерации, соглашение № 075-15-2021-1346, а также соглашение № FZWG-2021-0016.

Ссылки:

1. Царгуш В. А. и др. // Лучевая диагностика и терапия. 2020. Т. 11, №. 1. С. 93-105.
2. Reash N. F. et al. // Muscle Nerve. 2022. V. 66, N. 2. P. 159-166.
3. Корокин М. В. и др. // Фармация и фармакология. 2022. Т. 10, №. 5. С. 483-496.

Сравнительный анализ генов транспортных систем бактерий рода *Zobellia*

Н. Ю. Отставных*, В. И. Еремеев, Е. П. Быстрицкая, О. И. Недашковская, М. П. Исаева
Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г. Б. Елякова ДВО РАН, г. Владивосток
*электронная почта: chernysheva.nadezhda@gmail.com

Представители рода *Zobellia* (сем. *Flavobacteriaceae*) характеризуются богатым гидролитическим потенциалом и, следовательно, являются ценным источником ферментов для деградации и модификации полисахаридов. Наряду с изучением репертуара их ферментов важным является исследование процессов нишевой адаптации на уровне рода, поскольку данные бактерии способны колонизировать макроводоросли всех типов. Геномный анализ транспортных систем бактерий позволяет получить представление об особенностях взаимодействия этих бактерий с окружающей средой.

В настоящее время выделяют 11 систем секреции бактерий (T1SS – T11SS), различающихся структурной организацией, механизмом действия и субстратами. В данное исследование было включено 24 полных генома бактерий рода *Zobellia*, депонированных в GenBank, NCBI. Предсказание генов транспортных систем было выполнено с помощью Macsyfinder 2.1.4 (модель TXSScan-1.1.3). Гены-кандидаты были аннотированы через InterProScan 101.0, поиск и аннотация субстратов были проведены с использованием HMMER 3.3.2, анализ синтении генных кластеров был выполнен с использованием приложения Easyfig 2.2.5.

В исследуемых геномах были идентифицированы ключевые гены трех систем секреции – T1SS, T6SS и T9SS. Присутствие генов T1SS, *abc*, *mfp* и *omp*, было предсказано в 17 геномах (71%). Гены контактно-зависимой T6SS были идентифицированы в 20 геномах (83%). Согласно анализу синтении T6SS-локусов, гены структурных компонентов обладают высокой консервацией на уровне рода, за исключением геномов *Z. amurskyensis* KMM 3526^T и *Z. uliginosa* MAR 2009 138, в которых данные гены, вероятно, были привнесены от флавобактерий других родов. Островки генов, кодирующие VgrG, PAAR, эффекторы и иммунные белки демонстрируют многообразие на уровне видов и рода. Наиболее протяженный кластер выявлен у *Zobellia* sp. 3Alg 48/1, несущий 7 копий VgrG, в остальных геномах не более 2 копий. Общим эффектором для всех *Zobellia* является эндопептидаза, ген которой находится вместе со структурными генами. Среди других эффекторов были предсказаны гены для фосфолипазы, Rhs-содержащих токсинов, VasX, нуклеазы, эндонуклеазы, пектин-лиазы, дезоксирибонуклеазы, пептидогликан-связывающих белков, Tox-URI2 и TNT. Структурные гены T9SS, кодирующие белки транслокона, были предсказаны в 19 геномах (79%). Субстраты, обладающие сортировочным доменом, были предсказаны во всех 24 геномах, среди них были аннотированы металлопептидазы M4, M10, M36, хитиназы, полисахарид-лиазы PL1, PL9, PL14, гликозид-гидролазы GH16, GH42, GH64, нуклеазы, Ig-подобные белки и макроглобулины.

Таким образом, бактерии рода *Zobellia* располагают обширным молекулярным арсеналом для проявления явлений антагонизма при колонизации морских сред обитания. Наблюдаемое разнообразие генных кластеров не согласуется ни с филогенией штаммов, ни с источником их выделения. Предсказанные эффекторы и экзоферменты могут рассматриваться в качестве белков-кандидатов для дальнейшего изучения их биомедицинского потенциала.

Исследование выполнено при финансовой поддержке гранта Министерства науки и высшего образования Российской Федерации 15.BRK.21.0004 (доп. соглашение № 075–15-2021-1052/9).

**Поиск и биоинформатический анализ генных кластеров сульфатированных
полисахаридов в морских бактериях**

Ю. В. Савичева*, М. С. Кокоулин, Л. А. Романенко, М. П. Исаева
Тихоокеанский институт биоорганической химии имени Г. Б. Елякова ДВО РАН,
г. Владивосток

*электронная почта: iu.savicheva0@yandex.ru

Мировой океан занимает около 70% земной поверхности и является ценным источником природных биологически активных соединений. Показано, что сульфатированные полисахариды морских грамотрицательных бактерий обладают противоопухолевыми, противовоспалительными, противомикробными, гипохолестеринемическими и гипогликемическими свойствами. Практический интерес представляет точная идентификация биосинтетических генных кластеров и предсказание возможных путей биосинтеза сульфатированных полисахаридов путем изучения полноразмерных геномных последовательностей морских бактерий.

Объектом исследования был штамм *Cobeta* sp. KMM 1449, изолированный из донных отложений прибрежной зоны Японского моря. Ранее из этого штамма был выделен сульфатированный капсульный полисахарид (КПС) и установлена структура его повторяющегося звена [1]. Полный геном, полученный методом гибридной сборки из коротких прочтений на платформе MiSeq (Illumina, США) и длинных прочтений на платформе MinION (ONT, Великобритания), был представлен одной кольцевой хромосомой с размером 4184796 п. н. Штамм KMM 1449 был идентифицирован как *Cobetia marina* со сходством 98,5% по средней нуклеотидной идентичности (orthoANIb) с типовым штаммом. Аннотирование генома было выполнено с помощью серверов RAST, eggNOG-mapper, Prokka и Bakta. Обнаружен протяженный геномный участок, длиной 93790 п. н., содержащий гены биосинтеза рамнозы (*rmIABCD*) и маннозы (*ManCA*), донора сульфатной группы PAPS (*cysNDC*), транспортной системы (*kpsETMDCS*), а также гликозилтрансфераз и сульфотрансфераз. На основании анализа генов и их продуктов предложена гипотетическая схема биосинтеза сульфатированного КПС штамма *C. marina* KMM 1449.

Исследование выполнено при финансовой поддержке гранта Министерства науки и высшего образования Российской Федерации 15.BRK.21.0004 (доп. соглашение № 075–15-2021-1052/9).

Ссылки:

1. Пикуль Е. С. и др. // XX Всероссийская молодежная школа-конференция по актуальным проблемам химии и биологии, ТИБОХ ДВО РАН. Материалы конференции / Владивосток, 4-8 сентября 2023. – Владивосток.

***In vitro* анализ мобильных генетических элементов в транскриптомах рыб с
использованием технологии RACE**

В. М. Черезова*, Т. Ю. Майор, Т. В. Сидорова, Ю. П. Сапожникова, А. Г. Королева,
Л. В. Суханова

Лимнологический институт СО РАН, г. Иркутск

*электронная почта: lcherezova12@yandex.ru

Мобильные элементы генома (МЭ) присутствуют во многих эукариотических организмах, таких как: простейшие, грибы, растения и животные. МЭ способны к копированию и к транспозиции в различные участки ДНК. В настоящее время установлено, что МЭ оказывают значительное влияние на эволюцию геномов, формируя их разнообразие и регуляцию. Несмотря на то, что пластичность генома и МЭ в настоящее время общепризнана, взаимодействие между этими двумя объектами все еще остается неясным. Высокопроизводительное секвенирование показало, что геномы лососевых рыб содержат большое количество транскрибируемых МЭ. При стрессовых воздействиях, таких как температурный шок, токсины и болезни, транскрипция усиливается. Причем, соотношение транскрибируемых МЭ у лососевых рыб во много раз выше, чем у других видов позвоночных, и более половины этих генов принадлежат к семейству Tc1-подобных ДНК-транспозонов.

В настоящей работе мы сосредоточили свое внимание на семействе DTSSa4 ДНК-транспозонов суперсемейства Tc1/mariner, впервые обнаружено у атлантического лосося *Salmo salar*. Для поиска мобильных элементов в геномах и транскриптомах используются различные экспериментальные и биоинформатические подходы. Имеющаяся информация об эволюции и полиморфизме Tc1-подобных ДНК-транспозонов получена в основном в результате поиска сходных последовательностей в базах данных методами биоинформатики, *in silico*. В данной работе на байкальском озерном сига *Coregonus baicalensis* Dyb нами тестируется методика *in vitro* «извлечения» фрагментов транспозонных последовательностей непосредственно из транскрипта вместе с соседствующим фрагментом мРНК методом RACE (Rapid Amplification of cDNA Ends). Синтез кДНК на матрице мРНК происходит с помощью обратной транскриптазы Mint (модифицированная ревертаза MMLV) (Mint, Евроген). Далее проводят амплификацию 5'- и 3'-концевых фрагментов целевых транскриптов (Mint RACE primer set, Евроген). При амплификации применяется техника пошагового «внешнего праймирования» универсальными смесями адаптерных праймеров (step-out ПЦР) одновременно с пошаговым «заглушением» геноспецифических праймеров (nested ПЦР). Метод позволяет получить данные о структуре полноразмерного транскрипта, основываясь на минимальной информации о его последовательности (30-50 нуклеотидов). В нашем случае синтез кДНК осуществлен с олиго (dT)-содержащим праймером, отжигающимся на сайт полиаденилирования. Геноспецифичные праймеры подобраны на консервативный DDE-домен транспозазы и направлены в сторону 3'-концов транскриптов. Далее целевые транскрипты проанализированы методом нанопорового секвенирования (NGS, Oxford Nanopore Technologies).

Объем данных для объекта исследования составил 4936 последовательностей, длиной 700 - 4200 п. н. После подтверждения наличия в составе последовательности фрагмента транспозона, эта часть удалялась, а фланги анализировались с помощью BLAST. Поиск показал, что у байкальского озерного сига искомые МЭ транскрибируются в составе генов, отвечающих за внутри- и межклеточный транспорт, передачу сигналов и иммунитет.

Далее планируется провести анализ уровня транскрипции генов, в которых обнаружены Tc1-подобные ДНК-транспозоны группы DTSSa4 у байкальского озерного сига, подвергнутого температурному стрессу, с помощью комбинации методов (Oxford Nanopore + Illumina).

Исследование выполнено при финансовой поддержке проекта РНФ № 23-24-00644 на базе УНУ «Экспериментальный пресноводный аквариумный комплекс байкальских гидробионтов» ЛИИ СО РАН.

**Молекулярное моделирование взаимодействия рецептора FLS2 с лигандами с
применением AlphaFold3**

С. Ю. Щеголев, Г. Л. Бурьгин, Л. Ю. Матора, Ю. В. Фадеева*

Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов, ФИЦ «Саратовский научный
центр РАН», г. Саратов

*электронная почта: fadeeva-yuv@yandex.ru

Экспериментальные методы определения структур белковых комплексов требуют значительных затрат времени и ресурсов и имеют свои ограничения. Применение глубинных нейронных сетей, опирающихся на известные знания о пространственных структурах белков, способствует пониманию механизмов различных молекулярных процессов в живых организмах. Особый интерес представляет AlphaFold3 - инструмент, основанный на искусственном интеллекте и показавший высокую точность и универсальность в предсказании трехмерной структуры белков и комплексов белков с различными лигандами [1]. В данной работе проведено моделирование взаимодействия растительного рецептора FLS2 с бактериальными флагеллинами, выступающими в роли молекулярного паттерна, и корецептором BAK1, активирующим врожденный иммунный ответ растений [2,3] с применением программного комплекса AlphaFold3.

Обогащенный лейцином киназный рецептор FLS2 вовлечен в восприятие пептида из N-концевой части флагеллина, состоящего из 22 аминокислотных остатков (flg22) [4]. Ранее была продемонстрирована ключевая роль глицина в 18-й позиции (G18) пептида flg22 в образовании комплекса FLS2+flg22 с корецептором BAK1 [5,6]. В консервативных мотивах flg22 флагеллинов большинства PGPR вместо G18 идентифицированы остатки тирозина (Y18), что препятствует реализации механизма фитоиммунитета. Молекулярный докинг был проведен с применением программы AlphaFold3 для лиганд-узнающих доменов рецептора FLS2 и корецептора BAK1 картофеля (*Solanum tuberosum* L.) и мягкой пшеницы (*Triticum aestivum* L.), для которых с помощью ресурса MusiteDeep было учтено N-гликозилирование. В качестве лигандов были использованы пептиды flg22 флагеллинов патогена *Pseudomonas aeruginosa* ATCC700888, фитопатогена *Pectobacterium atrosepticum*SCRI1043 и ассоциативной бактерии *Azospirillum brasilense* Sp7.

Результаты моделирования показали, что лиганды флагеллинов патогенной и фитопатогенной бактерий эффективно связываются с рецепторами FLS2 картофеля и пшеницы с последующим взаимодействием с корецептором BAK1, что предполагает запуск каскада реакций фитоиммунитета. Особенности аминокислотного состава flg22 *A. brasilense* Sp7 оказывают существенное негативное влияние на образование комплекса FLS2+flg22 с корецептором BAK1, что коррелирует с экспериментальными данными о слабом иммунном ответе растений на флагеллины ассоциативных ризобактерий семейства *Azospirillaceae* [7].

Ссылки:

1. Abramson J. *et al.* // Nature. V. 630. P. 493-500.
2. Bigeard J. *et al.* // Molecular plant. 2015. V. 8. N. 4. P. 521-539.
3. Fliegmans J., Felix G. // Nature Plants. 2016. V. 2. Art. 16136. P. 1-2.
4. Gómez-Gómez L., Boller T. // Mol. Cell. 2000. V. 5. P. 1-20.
5. Sun Y. *et al.* // Science. 2013. V. 342. P. 624-628.
6. Garcia A. V. *et al.* // Mol. Plant. 2014. V. 7. P. 657-674.
7. Shirokov A. *et al.* // Int. J. Biol. Macromol. 2020. V. 147. P. 1221-1227.

БИОРАЗНООБРАЗИЕ, СИСТЕМАТИКА И ГЕНЕТИКА МИКРООРГАНИЗМОВ КАК ОСНОВА БИОБАНКОВ И БИОРЕСУРСНЫХ КОЛЛЕКЦИЙ

Биоразнообразие эндофитных микроорганизмов лекарственного растения *Polygonum cuspidatum* на Дальнем Востоке России

А. А. Береш^{1,2*}, О. А. Алейнова¹, А. А. Ананьев¹, Н. Н. Нитяговский¹, А. Р. Супрун¹,
К. В. Киселев¹

¹Федеральный научный центр биоразнообразия наземной биоты Восточной Азии ДВО РАН,
г. Владивосток

²Дальневосточный федеральный университет, г. Владивосток

*электронная почта: a.beresh@mail.ru

Polygonum cuspidatum, синонимы *Fallopia japonica* и *Reynoutria japonica*, является многолетним травянистым растением семейства Гречишных. Оно используется в традиционной китайской и японской медицине для борьбы с заболеваниями ЖКТ и для улучшения кровообращения. *P. cuspidatum* произрастает в Восточной Азии, в частности в Японии, Китае и Корее. В Северной Америке и Европе этот вид успешно прижился в различных средах обитания, что привело к его классификации как вредителя и инвазивного вида во многих странах. Также *P. cuspidatum* является основным источником биологически активных стильбеновых соединений. Эндофиты – это разнообразная группа микроорганизмов, включающая грибы, бактерии, водоросли и актиномицеты, которые обитают в тканях растений, не причиняя вреда хозяину. Эндофитные микроорганизмы обладают потенциалом для получения новых ценных натуральных продуктов для фармацевтической и сельскохозяйственной промышленности. Например, эндофитный актиномицет горца *Streptomyces* sp. A0916 обладает большей антимикробной эффективностью, чем экстракты его растения-хозяина *P. cuspidatum*. Поэтому изучение биоразнообразия и свойств эндофитов инвазивных растений, в том числе *P. cuspidatum*, является интересной и перспективной задачей. В данной работе был изучен состав эндофитного сообщества бактерий и грибов горца японского с использованием секвенирования нового поколения и метода, основанного на культивировании. Эндофитные бактерии и грибы *P. cuspidatum* были представлены 22 и 21 классами, соответственно. Доминирующими классами эндофитных бактерий были *Gammaproteobacteria* (28%), *Alphaproteobacteria* (28%), *Actinobacteria* (20%), *Bacteroidia* (15%) и *Bacilli* (4%). Среди грибов *Agaricomycetes* (40%), *Dothideomycetes* (24%), *Leotiomycetes* (10%), *Tremellomycetes* (9%), *Pezizomycetes* (5%), *Exobasidiomycetes* (3%) и *Sordariomycetes* (3%). Наиболее распространенными родами эндофитных бактерий оказались *Burkholderia-Caballeronia-Paraburkholderia*, *Sphingomonas*, *Hydrothalea*, *Methylobacterium-Methylorubrum*, *Cutibacterium* и *Comamonadaceae*, а родами грибов-эндофитов *Marasmius*, *Tuber*, *Microcyclosporella*, *Schizothyrium*, *Alternaria*, *Parastagonospora*, *Vishniacozyma* и *Cladosporium*. Представленные данные показали, что корни, листья и стебли *P. cuspidatum* содержат большее количество и разнообразие эндофитных бактерий и грибов по сравнению с цветами и семенами. Количество эндофитных бактерий и грибов, выделенных из *P. cuspidatum* осенью, было в два раза выше, чем весной. Таким образом, в этом исследовании впервые было описано и проанализировано биоразнообразие эндофитных бактерий и грибов *P. cuspidatum*, произрастающего на Дальнем Востоке России. Дальнейшие исследования будут направлены на изучение потенциала эндофитов *P. cuspidatum* или их биологически активных соединений в качестве потенциальных решений для борьбы с болезнями сельскохозяйственных культур и проблемой устойчивости к антибиотикам. Кроме того, эндофитные микроорганизмы *P. cuspidatum* могут быть использованы в качестве нового инструмента для высокоэффективного и чистого производства ценного стильбена – резвератрола.

Исследование выполнено при финансовой поддержке гранта Российского научного фонда (грант № 22-74-10001).

**Коллекция фитопатогенных бактерий, выделенных из тепличной культуры
Cucumis sativus L.**

А. А. Бычкова*, К. Д. Деснева, Ю. В. Зайцева

Ярославский государственный университет им. П. Г. Демидова, г. Ярославль

*электронная почта: anasanby98@mail.ru

Огурец обыкновенный является наиболее распространенной культурой, выращиваемой в средней полосе России как в открытом грунте, так и в тепличных хозяйствах. Развитие фитопатогенных микроорганизмов значительно снижает качество продукции и приводит к значительным потерям урожая, которые могут достигать 50%. В связи с этим актуальным является изучение генетического разнообразия фитопатогенов и их вирулентных свойств, что позволит в дальнейшем разрабатывать методы скрининга и способы борьбы с инфекционными агентами.

Целью данной работы являлось создание коллекции фитопатогенных штаммов бактерий, выделенных из тепличной культуры огурца обыкновенного, изучение их культурально-морфологических свойств и факторов вирулентности.

Для выделения фитопатогенных бактерий использовали растительный материал с признаками бактериального повреждения. В качестве объекта исследования был выбран огурец среднеплодный *Cucumis sativus* L. сорт «Мева», выращиваемый на территории тепличного комбината «Ярославский». Отобранный материал гомогенизировали в 0,9% растворе NaCl в соотношении 1/5. Исходный гомогенат и последовательные десятичные разведения засеивали на среду МПА в объеме 50 мкл. Инкубировали посеы в течение 24 ч при температуре 28°C. Оценку фитопатогенности отобранных изолятов проводили по наличию мацерации растительной ткани *in vitro*. Морфологические свойства изучались методом окрашивания по Граму и микроскопирования. Каталазную и оксидазную активности оценивали по стандартным методикам [1], сахаролитическую активность изучали на среде Гисса с сахарозой и индикатором ВР, протеолитическую активность изучали на среде МПЖ. Оценку способности штаммов синтезировать АГЛ (сигнальные молекулы Quorum Sensing) проводили с помощью биосенсора *C. violaceum* CV026 [2]. Устойчивость изолятов к антибактериальным препаратам оценивали диско-диффузионным методом.

В результате исследования было выделено 172 бактериальных изолята, из которых 61 штамм проявлял фитопатогенные свойства. Из выделенных изолятов 8 штаммов были устойчивы к ампициллину, 3 штамма были устойчивы к канамицину и 4 штамма – к рифампицину, при этом все выделенные изоляты были чувствительны к тетрациклину. У 19 штаммов обнаружена способность к синтезу молекул АГЛ. Наличие сахаролитической активности обнаружено у 51 изолята, 42 штамма обладали протеолитическими свойствами. Наиболее сильные патогены были идентифицированы и являются представителями родов *Pseudomonas*, *Pectobacterium*, *Citrobacter*, *Micrococcus*.

Созданная коллекция является важным материалом для дальнейших исследований, в том числе для разработки специфических тест-систем быстрой диагностики возбудителей инфекций.

Ссылки:

1. Нетрусов А. И. и др. / Практикум по микробиологии: Учеб, пособие для студ. высш. учеб, заведений. 2005. 608 с.
2. Дерябин Д. Г. и др. // Микробиология. 2020. Т. 89, № 6. С. 728-736.

Поиск штаммов микроорганизмов с уникальными агро и биотехнологическими свойствами: от работы школьника до полногеномного секвенирования.

Е. Н. Воронина^{1*}, Е. А. Соколова¹, И. Н. Троменшлегер¹, О. В. Мишукова¹, И. В. Хлистун¹, Н. В. Смирнова²

¹Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, г. Новосибирск

²Институт почвоведения и агрохимии СО РАН, г. Новосибирск

*электронная почта: voronina_l@mail.ru

Штаммы *Enterobacter ludwigii* были отобраны в ходе проекта «Атлас почвенных микроорганизмов», в рамках которого школьники отбирали образцы почв из разных регионов России, выращивали штаммы на безазотной среде и передавали их в ИХБФМ СО РАН. Все полученные штаммы были очищены, проверены на рост и соответствующие активности и идентифицированы с помощью секвенирования 16S rDNA. Среди штаммов рода *Enterobacter* преобладали представители одного вида *E. ludwigii*, из которого отбирались штаммы с лучшими показателями. Среди четырех исследованных штаммов мы наблюдали разнообразное проявление разных свойств. Так штамм GMG_278 показал наилучшую способность к защите от стрессовых факторов и патогенов и в то же время повышенная продукция гибберелина говорит о возможности стимулирования роста растений, что в дальнейшем подтвердилось в экспериментах на пшенице. В то же время штамм GMG_291 продемонстрировал наилучшие способности в свойствах, увеличивающих доступность питательных веществ, а штамм GMG_336 показал хорошую продукцию ауксина и пролина. Однако, анализ полных геномов данных бактерий не выявил каких-то значимых отличий в известных генах. Поиск уникальных для изученных штаммов генов показал отсутствие соответствующих гомологов в базах данных нуклеотидных и аминокислотных последовательностей. Для четырех изучаемых штаммов *E. ludwigii* было проведено полногеномное секвенирование, сборка геномов *de novo* и анализ наличия генов, аннотированных в базе данных KEGG. Далее анализировали гены, ассоциированные со свойствами полезными для растений. В качестве таких признаков были выбраны следующие: формирование биопленки, метаболизм азота, продукция сидерофоров, продукция ауксина, гиббереллинов, этилена, солюбилизация фосфора, продукция оксидоредуктаз. В горшочном эксперименте все морфологические параметры пшеницы улучшались как на фоне применения 50% минеральной подкормки, так и при внесении штамма GMG_278. Прибавка веса надземной и подземной массы как во влажном, так и в сухом состоянии составляла около 50%, кроме случая прибавки сухой надземной массы при минеральной подкормки – здесь прибавка достигла 107%. Для роста растений прибавка и в том, и в другом случае составила около 25%. Совместное же внесение и бактерий, и минеральной подкормки привело к увеличению веса по каждому показателю более чем в два раза, а в случае сухой массы надземной части достигло 261%, для роста прибавка составила 87%. Таким образом, мы видим куммулятивный эффект бактерий и минеральной подкормки для морфологических показателей пшеницы. Это в частности может указывать на разные пути воздействия данных обработок на растения. Исследование экспрессии генов пшеницы при инокуляции штамма *E. ludwigii* GMG_278 приводит к активации в пшенице антиоксидантной защиты, а также перестройке синтеза некоторых фитогормонов для увеличения роста корней или модификации архитектуры корневых волосков. В свою очередь при наличии дополнительной минеральной подкормки это дает значительный прирост в биомассе и надземной части растений. Также это должно оказывать положительный эффект на устойчивость к стрессовым факторам (что мы видим на примере стресса засухи и засоленности) и фитопатогенам.

Выделение чистой культуры нового представителя *Nitratidesulfovibrio*, из воды радонового источника в селе Чистоводное, Приморского края

М. Ю. Глущенко¹, А. П. Лукина^{1*}, Л. Б. Глухова¹, Л. О. Соколянская¹, И. И. Русанов²,
М. П. Исаева³, О. В. Карначук¹

¹Национальный исследовательский Томский государственный университет, г. Томск

²Институт микробиологии им. С. Н. Виноградского, г. Москва

³Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г. Б. Елякова ДВО РАН, г. Владивосток

*электронная почта: anastasiya-lukina-93@mail.ru

Desulfovibrionaceae являются типичными представителями сульфатредуцирующих бактерий, а типовой штамм *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough, выделенный в 40-е годы прошлого века, - модельным организмом, на котором была изучена биохимия и энергетика сульфатредукции. Десульфовибрио широко распространены в различных местообитаниях, таких как анаэробные осадки пресных и солоноватоводных водоёмов, морей, а также присутствуют в кишечнике животных, навозе и компосте. В 2020 году таксономия рода *Desulfovibrio* подверглась ревизии и на основе молекулярных данных было выделено несколько филогенетически раздельных родов, объединенных в семейство *Desulfovibrionaceae* (Waite *et al.*, 2020). *D. vulgaris* был переклассифицирован в *Nitratidesulfovibrio vulgaris*. Латинское название рода подчеркивало способность его представителей к восстановлению нитратов.

Целью настоящего исследования являлось выделение чистой культуры сульфитредуцирующих бактерий из воды радонового источника в селе Чистоводное, где с использованием радиоактивного сульфата была зафиксирована активная микробная сульфатредукция. В долине реки Чистоводной насчитывается 7 выходов минеральных источников с температурой вод 20.4 - 30.2 °С. Пробы воды радонового источника в с. Чистоводное (Левый Нижний), Приморского края, отобраны в октябре 2023 года. Чистая культура подвижных вибрионов, обозначенная как 1691 выделена из отдельных колоний в столбике агара на пресноводной среде Видделя-Бака с добавлением смеси формиата и ацетата. Температура инкубирования составляла 30 °С. Анализ последовательности гена 16S рРНК штамма 1691 показал, что его ближайшим культивируемым родственником (со сходством 99.57 %) является выделенный нами ранее из отходов медеплавильного производства штамм *Nitratidesulfovibrio* sp. A2 устойчивый к меди и другим ионам металлов. Ближайшими валидно описанными родственниками штамма 1691 являются *N. liaohensis* (сходство последовательностей 99.07%) и *N. oxamicus* (сходство последовательностей 98.79%). Штамм 1691 растет в диапазоне от 15 до 45 °С, оптимум температуры роста составляет 37 °С. Штамм 1691 является алкалофилом и растет при pH среды от 6.0 до pH 11.0 с оптимумом 9.0. Оптимальная концентрация NaCl для роста 1691 составляет 0.1 %, диапазон от 0 до 1 %. В качестве акцептора электронов штамм 1691 использует соединения серы (сульфат, сульфит, тиосульфат и элементную серу), но не растет на нитрате, нитрите и fumarate. В случае подтверждения отсутствия способности к нитратредукции, штамм 1691 будет первым представителем рода *Nitratidesulfovibrio*, у которого отсутствует способность восстанавливать нитрат. Для окончательного определения филогенетического положения штамма 1691 и его способности к нитратредукции необходимо определение последовательности генома.

Исследование выполнено при финансовой поддержке гранта Российского научного фонда 24-14-00396.

Биоразнообразие эндофитных бактерий и грибов ели *Picea jezoensis*, произрастающей на Дальнем Востоке России

А. А. Днепровская^{1,2*}, Н. Н. Нитяговский¹, О. А. Алейнова¹, К. В. Киселёв¹

¹Федеральный научный центр биоразнообразия наземной биоты Восточной Азии ДВО РАН,
г. Владивосток

²Дальневосточный федеральный университет, г. Владивосток

*электронная почта: dneprovskayaalina@yandex.ru

Эндофиты растений – это чаще всего бактерии и грибы, реже археобактерии, водоросли, простейшие и нематоды, которые бессимптомно распределяются в тканях растений, таких как корни, стебли, листья, семена и плоды (Zuccaro *et al.*, 2014; Lang *et al.*, 2018). Известно, что эндофитные ассоциации важны для усвоения растениями питательных веществ (Hiruma *et al.*, 2016), иммунной системы (Soliman *et al.*, 2016), подавления болезней (Eid *et al.*, 2021) и устойчивости к абиотическим стрессам (Ganie *et al.*, 2022). Эндофиты помогают растениям либо путем содействия в фиксации питательных веществ, таких как фосфор, железо и азот, из окружающей среды, либо путем производства фитогормонов, таких как ауксины, гиббереллиновая кислота и этилен (Afzal *et al.*, 2021; Yan *et al.*, 2019).

Используя геномный подход и классические методы микробиологии, были изучены бактериальные и грибные эндофитные сообщества дикорастущих сортов ели *Picea jezoensis*, произрастающей на Дальнем Востоке России. Согласно данным высокопроизводительного секвенирования, в различных частях *P. jezoensis* присутствовали бактерии 22 таксонов уровня класса. Наибольшая часть была представлена классами: *Alphaproteobacteria* (35%), *Actinobacteria* (22%), *Gammaproteobacteria* (19%), *Bacteroidia* (11%), и *Bacilli* (7%). Бактериологический высев показал 4 основных класса: *Gammaproteobacteria* (71%), *Bacilli* (20%), *Actinobacteria* (4%) и *Alphaproteobacteria* (3%). Метагеномный анализ показал наличие 19 таксонов грибов и грибоподобных организмов уровня класса в различных частях *P. jezoensis*. Были обнаружены 4 преобладающих класса: *Dothideomycetes* (45%), *Ascomycota* (21%), *Sordariomycetes* (12%), и *Eurotiomycetes* (9%). Высевы показали наличие 7 таксонов уровня класса, наиболее представленным являлся класс *Dothideomycetes* (44%). В разных частях ели (хвоя, стружка) доминирующие таксоны были представлены отличными классами, как для бактерий, так и для грибов. Данные по ампликонам из каждого образца ели были проанализированы в зависимости от части растения. Анализ NMDS показал, что образцы из разных частей ели формировали отдельные кластеры, которые имели пересечения. Тест PERMANOVA показал, что образцы из разных частей ели значительно отличались по бета-разнообразию (R^2 : 2.96%, $p = 0.001$ для бактерий и R^2 : 1.9%, $p = 0.001$ для грибов). Также были проанализированы изменения состава эндофитного сообщества *P. jezoensis* в зависимости от сезона года. Сборы материала производились в феврале, июле и сентябре 2023 года. Анализ NMDS показал, что последовательности *16S* и *ITS1* для разных сезонов образовывали перекрывающиеся кластеры, причем осенние образцы образовывали более узкий кластер. Тест PERMANOVA показал значительную разницу между летними и осенними образцами (R^2 : 0.48%, $p = 0.004$ для бактерий и R^2 : 0.41%, $p = 0.047$ для грибов).

Таким образом, полученные данные впервые описывают эндофитные сообщества бактерий и грибов *Picea jezoensis*, произрастающей на Дальнем Востоке России. Данное исследование несет фундаментальное значение в изучение растений и их взаимодействий с окружающей средой, определяющей внутритканевой микробиом. Кроме того, полученные данные будут способствовать разработке методов на основе эндофитных микроорганизмов для устойчивого лесопользования, которые будут способствовать сохранению здоровья деревьев и их экосистем.

Исследование выполнено при финансовой поддержке гранта Российского научного фонда (грант № 22-74-10001).

Микробиом воды и рыб в системе аквакультуры *Oncorhynchus mykiss*

Д. А. Доколин*, Ю. В. Зайцева

Ярославский государственный университет им. П. Г. Демидова, г. Ярославль

*электронная почта: DimonDokolin@yandex.ru

Радужная форель – один из наиболее экономически значимых товарных видов рыб, культивируемых в условиях аквакультуры. Водная среда, а также кожные покровы и слизистые оболочки рыб населены микробными сообществами, обладающими уникальным таксономическим и функциональным разнообразием. Под действием факторов различной природы качественный и количественный состав микробных сообществ может меняться, оказывая влияние на состояние водных организмов. В данном исследовании проведен метагеномный анализ микробных сообществ водной среды, а также слизи кожи и кишечника радужной форели *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum, 1792) с целью установления степени их сходства, а также изучения влияния сезонных изменений среды на их таксономический состав.

Отбор проб для исследования осуществляли в апреле, июле и октябре. Для водной среды при отборе проб дополнительно измеряли содержание растворенного кислорода, температуру и уровень pH. Метагеномный анализ образцов воды и биологического материала радужной форели выполняли с помощью секвенирования региона V4 гена 16S рНК. Полученные данные анализировали с помощью методов биоинформатики и статистической обработки.

Результаты метагеномного анализа образцов показали, что микробное сообщество кожи радужной форели в апреле было представлено, прежде всего, филумами *Proteobacteria* (89,31%), *Firmicutes* (5,6%), *Bacteroidetes* (1,3%) и *Actinobacteria* (1,3%). В июле в микробиоме кожи сократилась доля представителей филума *Proteobacteria* (55%) и возросла доля филумов *Actinobacteria* (14,8%), *Firmicutes* (6,57%) и *Bacteroidetes* (4,65%). Также значительную долю микробного сообщества кожи радужной форели в июле составили представители филумов *Deinococcus-Thermus* (11,52%) и *Fusobacteria* (6,31%). В октябре филумы *Proteobacteria* (80,47%), *Tenericutes* (8,54%), *Cyanobacteria* (5,3%), *Fusobacteria* (2,59%) и *Bacteroidetes* (1,44%) стали преобладающими, а доля филумов *Actinobacteria* и *Firmicutes*, напротив, сократилась (до 0,75% и 0,58% соответственно). В апреле филумы *Proteobacteria* (51,08%), *Tenericutes* (30,43%), *Firmicutes* (7,67%) и *Bacteroidetes* (2,45%) преобладали в микробиоме кишечника радужной форели. В июле структура микробного сообщества значительно изменилась: представители филума *Fusobacteria* составляли большую часть сообщества (79,72%), а доля филумов *Tenericutes*, *Proteobacteria*, *Firmicutes* и *Bacteroidetes* сократилась (до 8,17%, 8,1%, 2,64% и 0,96% соответственно). В октябре филум *Tenericutes* стал преобладающим в микробиоме (около 95%). Доля филумов *Fusobacteria* и *Proteobacteria* составила 1,92% и 1,76% соответственно. Относительная численность других филумов в сообществе составляла менее 1%.

Микробное сообщество садковой части водоема в апреле было представлено преимущественно филумами *Proteobacteria* (49,62%), *Actinobacteria* (19,84%), *Bacteroidetes* (10%), *Verrucomicrobia* (8,09%) и *Planctomycetes* (5,35%). В июле возросла доля представителей филумов *Actinobacteria* (30,99%), *Cyanobacteria* (18,42%) и *Planctomycetes* (6,34%), а доля филумов *Proteobacteria*, *Verrucomicrobia* и *Bacteroidetes* сократилась (до 29,8%, 3,15% и 9,11% соответственно). В октябре доминирующим стал филум *Proteobacteria* (62,76%), а относительная численность представителей филумов *Actinobacteria*, *Bacteroidetes*, *Verrucomicrobia*, *Cyanobacteria* и *Planctomycetes* сократилась до 16,86%, 8,78%, 2,72%, 1,49% и 1,45% соответственно.

Таким образом, микробные сообщества воды, а также кожной слизи и кишечника радужной форели подвержены сезонным изменениям. Кроме того, различия в составе микробных сообществ указывают на наличие специфических факторов, влияющих на их качественный и количественный состав.

Исследование частично выполнено в рамках проекта Фонда В. Потанина № ПЮФП25-0025/24.

Использование информационной системы «Биобанк КММ» для работы с генетическими и метаболическими данными

М. П. Исаева¹, В. В. Куриленко¹, А. Н. Юрченко¹, Е. П. Быстрицкая¹, В. Е. Чаусова¹,
И. Е. Ильин², П. А. Лысюк², К. В. Гузев^{2*}

¹Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г. Б. Елякова ДВО РАН, г. Владивосток

²Общество с ограниченной ответственностью «Бюротика», г. Владивосток

*электронная почта: kvg@bureautics.ru

Информационная система «Биобанк КММ®», разработанная в ФГБУН «Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г. Б. Елякова ДВО РАН», предназначена для автоматизации и информационной поддержки процессов биобанкирования.

ИС «Биобанк КММ®» обеспечивает сбор, обработку, анализ, представление и хранение генетических и метаболических данных объектов биоколлекции в соответствии с требованиями раздела 7.8 ИСО 20387:2021.

Обеспечивается работа с данными в последовательном и параллельном режимах. В ходе выполнения исследований, требующих коллективного участия, специалисты разных подразделений проектируют, планируют выполнение, выполняют, документируют и оценивают результаты тех исследований, которые их касаются.

Обработка данных метапроекта «Исследование метаболитов микроскопического гриба» замкнута, услуги выполняются в лабораториях «нашего предприятия» или контрагентами «внешнего предприятия». Например, услуга «Подготовка экземпляров и проб объектов» каталога «Культивирование штаммов», включающая исследование «Жидкофазное культивирование штаммов морских грибов» с показателями «Объем культуральной жидкости», «Название питательной среды», «Название модификатора среды», «Концентрация модификатора среды», «рН среды», «Время культивирования» выполняется по заказу лаборатории химии микробных метаболитов в отделе микологии лаборатории микробиологии. А услуга «Генотипирование штамма микроскопического гриба (2 маркера)» каталога «Генотипирование микроскопических грибов», включает исследования «Предварительная идентификация микроорганизма», «Выделение геномной ДНК», «Выбор филогенетического маркера», «Секвенирование ДНК по Сэнгеру», «Анализ данных секвенирования по Сэнгеру», каждое исследование состоит из показателей, последнее в ряду содержит один показатель — «Нуклеотидная последовательность» типа «Файл». На завершающей стадии лаборатория химии микробных метаболитов, одновременно являясь заказчиком и исполнителем, выполняет услугу «Выделение, анализ и регистрация вторичного метаболита микроскопического гриба». Исследования типизируются, содержат указание на метод, описание свойств, ссылку на мастер-исследование. Показатели типизируются, например, «Качественный», «Количественный», «Изображение», «Инструментальный файл», «Файл», «RAW read in fastq.gz», имеют описания правил контроля, правил ввода результатов, могут включать рефлексивные показатели, содержат правила расчета, если являются автоматическими.

Конструирование шаблонов исследований и типизация генетических и метаболических данных ИС «Биобанк КММ®», настройка правил работы с ними выполняется её пользователями — предметными специалистами биоколлекции без привлечения ИТ-специалистов.

Исследование выполнено при финансовой поддержке гранта Министерства науки и высшего образования Российской Федерации 15.BRK.21.0004 (доп. соглашение № 075–15-2021-1052/9).

Ссылки:

- ГОСТ Р ИСО 20387-2021 Биотехнология. Биобанкинг. Общие требования.
- ISBER Best Practices: Recommendations for Repositories - 5th Edition.

Целевое выделение чистых культур ранее некультивируемых бактерий

О. В. Карначук

Национальный исследовательский Томский государственный университет, г. Томск
электронная почта: olga.karnachuk@green.tsu.ru

Большинство прокариот, известных в настоящее время, идентифицируют по геномным подписям, и они недоступны в виде лабораторных культур. По разным оценкам от 90 до 98 % бактерий и архей остаются некультивируемыми. Получение микроорганизмов в культуре необходимо для прояснения роли гипотетических белков, составляющих 20 – 40 % в каждом вновь секвенированном геноме, детального изучения физиологии микроорганизмов, а также для создания новых биотехнологий, основанных на использовании целых организмов.

Методы биоинформатики позволяют улучшить процесс получения лабораторных культур ранее некультивируемых микроорганизмов. Метагеномный анализ сообщества прокариот различных биотопов, сопровождаемый сборкой композитных геномов (MAG), позволяет получить геномы целевых организмов. В свою очередь расшифровка биохимических путей позволяет разработать стратегию культивирования. В докладе будут представлены примеры получения на основе метагеномного анализа новых прокариот, представляющих интерес для фундаментальных исследований и применения в биотехнологиях. Первая группа включает «живое ископаемое», *Desulforudis audaxviator*, чья скорость эволюции генома является исключительно низкой по сравнению с другими бактериями, а также других представителей «подземной биосферы», полученных путем анализа MAGов. Получение промышленно-значимых прокариот будет продемонстрировано на примере молочнокислых бактерий свободных от устойчивости к антибиотикам. Последние были получены в ходе широкомасштабного секвенирования микробиомов сельскохозяйственных животных, разводимых в Российской Федерации.

Исследование выполнено при финансовой поддержке гранта Российского научного фонда (проект 24-14-00369).

Оценка эффективности перспективных штаммов рода *Bacillus*, выделенных в Западной Сибири

А. С. Козлова^{1*}, Т. В. Шпатова¹, В. С. Масленникова^{1,2}, Е. В. Шелихова^{1,2}, К. А. Табанюхов^{1,2},
И. М. Дубовский¹

¹Новосибирский государственный аграрный университет, г. Новосибирск

²Федеральный исследовательский центр фундаментальной и трансляционной медицины
СО РАН, г. Новосибирск

*электронная почта: AnastasiaKozlova970711@ya.ru

Повышение устойчивости растений к патогенам, а также факторам абиотической природы является актуальной задачей. В этой связи наиболее перспективными представляются микробиологические подходы, основанные на использовании потенциала растений и почвенных микроорганизмов [1]. Наиболее перспективными в этом отношении являются бактерии рода *Bacillus*, т.к. широко распространены в природе, синтезируют метаболиты широкого спектра действия, имеют высокий адаптивный потенциал и участвуют в сдерживании избыточного развития патогенных грибов [2]. Имеются также сведения, что эффективность штаммов бактерий-антагонистов зависит от их природы и непосредственного местообитания [3].

Цель исследования состояла в изучении влияния препаратов на основе бактерий р. *Bacillus* на растения черной смородины.

Объекты исследования: смородина сорта Мила, септориоз (*Septoria ribis* Desm), антракноз (*Gloeosporium ribis* Mont, et Desm), препараты на основе бактерий рода *Bacillus*: Фитоп 8.1, 8.67, 4.70 и 14.72 предоставлены ООО НПФ «Исследовательский центр» (научград Кольцово, Новосибирская область). Полевой деляночный опыт включал 10 вариантов с использованием препаратов на основе разных штаммов бактерий в двух концентрациях: 10^4 и 10^5 КОЕ/мл. Действие биопрепаратов оценивали по показателю развития болезни (%) в сравнении с контролем и рассчитывали биологическую эффективность. Комплекс биохимических показателей (хлорофилл а и b, каротиноиды, пероксидаза, малоновый диальдегид, полифенолоксидаза) в листьях черной смородины определяли на 4 неделю после обработки биопрепаратами с помощью спектрофотометрического метода. Исследования проводили в производственных насаждениях смородины сорта Мила в сельскохозяйственной артели «Сады Сибири» в Новосибирской области в 2023 г. и в лаборатории биологической защиты растений и биотехнологии Новосибирского ГАУ.

При использовании в полевом опыте препаратов на основе бактерий р. *Bacillus* пораженность растений септориозом и антракнозом снижалась в 2,7-3,9 раза. Биологическая эффективность применения Фитоп 8.67 и 8.1 достигала 72,5-74,7%, Фитоп 14.72 и 4.70 - 72,5-74% в зависимости от заболевания. Достоверные различия при применении биопрепаратов выявлены по повышению концентрации хлорофилла а и b в 1,2 раза и каротиноидов в 1,3 раза под влиянием бактериальных штаммов, а также увеличению активности пероксидазы и малонового диальдегида (МДА).

Таким образом, продемонстрирована перспективность применения биопрепаратов на основе бактерий р. *Bacillus* в снижении развития грибных заболеваний в условиях Новосибирской области в течение всего вегетационного периода и показана взаимосвязь в изменении биохимических показателей с развитием пораженности растения.

Ссылки:

1. Verma P. *et al.* // Singapore: Springer. 2017. V.2. P. 543–580.
2. Damea Z. T. *et al.* // Green chemistry letters and reviews. 2021. V. 14, N. 2. P. 246-271.
3. Мохамед Х. и др. // Изв. Сарат. ун-та. Нов. сер. Сер. Химия. Биология. Экология. 2016. Т. 16, № 4. С. 420—4252.

Биоразнообразие и биотехнологический потенциал грибов рода *Cladosporium* из морских мест обитания

Я. В. Крохмалёва*, Н. Н. Киричук, В. Е. Чаусова, Ю. В. Худякова, М. В. Пивкин
Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г. Б. Елякова ДВО РАН, г. Владивосток
*электронная почта: krokhmaleva.iv@gmail.com

Грибы рода *Cladosporium* являются космополитами и устойчивы к крайне неблагоприятным условиям среды. Их вторичные метаболиты обладают биологической активностью: противораковая, противомикробная, противовирусная и др. Микромицеты, ассоциированные с морскими субстратами, производят больший спектр вторичных метаболитов, чем наземные экоформы, что обусловлено условиями морской среды, создающей значительную конкуренцию среди микроорганизмов. Детальное изучение видового разнообразия и спектра продуцируемых метаболитов морских грибов рода *Cladosporium* является перспективным направлением для поиска биологически активных соединений с новой химической структурой.

В данной работе исследовались 23 штамма микроскопических грибов рода *Cladosporium*, выделенных из различных источников как в Японском море (бухты Троицы и Фёдорова, Амурский залив), так и из арктического грунта (глубина 2300 м.). Штаммы хранились в Коллекции морских микроорганизмов ТИБОХ ДВО РАН. Для проверки и восстановления жизнеспособности грибных культур изоляты пересеивали в пробирки на плотную питательную среду и выращивали при 25°C. Контроль чистоты выделенных культур проводился визуальным и микроскопическим методами. Культурально-морфологические признаки грибов изучались на чашках Петри со стандартными агаризованными средами (MEA, YES) при комнатной температуре.

Для выделения геномной ДНК из штаммов морских грибов использовался коммерческий набор «MagJET™ Plant Genomic DNA Kit» («Thermo Fisher Scientific», США). Секвенирование нуклеотидных последовательностей генов ITS, *tefl* и *actin* осуществляли на генетическом анализаторе Applied Biosystems™ SeqStudio™ Genetic Analyzer («Thermo Fisher Scientific», США). Анализ нуклеотидных последовательностей проводили в программе MEGA X, первичную идентификацию штаммов проводили в базе данных NCBI с помощью алгоритма BLAST. Антибактериальная и антикандидозная активность продуктов экстракции грибных штаммов определялась по наличию зоны просветления роста клеток тест-культуры вокруг бумажного диска с нанесенным этилацетатным экстрактом.

В результате проведённой работы 10 из 23 изученных штаммов грибов рода *Cladosporium* из КММ ТИБОХ ДВО РАН идентифицированы до вида; 7 штаммов идентифицированы до рода *Cladosporium* sp. Установлено, что 3 штамма проявляют антибиотическую активность. Штаммы КММ 4393 и КММ 4395 были наиболее активны против *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* и *Candida albicans* при различных условиях наращивания.

Исследование выполнено при финансовой поддержке гранта Министерства науки и высшего образования Российской Федерации 15.BRK.21.0004 (доп. соглашение № 075–15-2021-1052/9).

**Разнообразие микробиоты морских полихет на примере представителей рода *Vibrio*,
выделенных из *Chaetopterus cautus***

В. В. Куриленко*, Н. Ю. Отставных, Д. О. Личманюк, М. П. Исаева

Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г. Б. Елякова ДВО РАН, г. Владивосток

*электронная почта: valerie@piboc.dvo.ru

Chaetopterus – это род трубкообразных полихет, для которых характерно наличие трех различных областей тела. Их тело сильно модифицировано для уникального способа фильтрации пищи: первая пара средних параподий чрезвычайно длинная и изогнутая (в форме крыльев) и выделяет слизистый мешок, который улавливает частицы пищи из потока воды; последние три пары средних параподий сросшиеся, образуя полукруглые веера, биение которых приводит к отслаиванию пищи, подобно движущимся поршням, создает поток воды по трубке. Виды *Chaetopterus* часто используются в качестве модельных организмов в исследованиях размножения и раннего развития, а также биолюминесценции.

В ходе изучения биоразнообразия морских бактерий, ассоциированных с морской полихетой *Chaetopterus cautus*, и поиска продуцентов биологически активных соединений, из слизи ловчей сети было выделено около 50 штаммов бактерий. Животные были собраны на глубине 6–10 м в прибрежных водах бухты Троицы, залива Петра Великого, Японского моря в августе 2016 г. Предварительно двадцать штаммов бактерий были идентифицированы как представители рода *Vibrio* на основе данных МАЛДИ и 16S рРНК-генотипирования. Показано, что штамм *Vibrio* sp. СВ 1-14 является продуцентом 6-эпи-монанхорина и возможным кандидатом на новый вид рода *Vibrio*.

Род *Vibrio* является одной из наиболее многочисленных групп бактерий, представленной 151 валидно опубликованным видом (<https://lpsn.dsmz.de/genus/vibrio>). Представители этого рода могут выделяться из различных образцов наземного и морских происхождения, для них характерно высокое меж- и внутривидовое разнообразие. Некоторые виды этого рода являются патогенными для человека. Вибрионы имеют палочковидную форму клетки, являются факультативными анаэробами, спор и капсул не образуют. Большинство представителей данного рода подвижны посредством различного количества жгутиков.

Согласно филогенетическому анализу на основе определения гена 16S рРНК, штаммы СВ 1-14, СВ 2-10 и СВ 2-8, представляющие новый вид рода *Vibrio* как было показано ранее, образовали отдельную ветвь, поддерживаемую значением бутстрепа 71% и наиболее близкую к виду *V. hangzhouensis*. Штамм СВ 1-5 также образовал отдельную ветвь внутри клады, содержащей виды *V. variabilis*, *V. maritimus*, *V. hangzhouensis*.

По данным филогеномного анализа штаммы СВ 1-14, СВ 2-10 и СВ 2-8, а также СВ 1-5 являются представителями двух новых видов рода *Vibrio*. Штаммы СВ 1-14, СВ 2-10, СВ 2-8 и СВ 1-5 представляет собой грамотрицательные, оксидазоположительные, каталазоположительные, подвижные, аэробные овоиды, которые растут при содержании хлористого натрия в среде 0,5-7%. Все вышеописанные штаммы гидролизует ДНК, крахмал, твин 80, твин 20, твин 40 и не гидролизует казеин. Штаммы СВ 1-14, СВ 2-10, СВ 2-8 продуцирует сероводород из тиосульфата и гидролизует желатин.

Для штаммов СВ 1-14, СВ 2-10 и СВ 2-8 предлагается название “*Vibrio polychaetae*” sp. nov., а для штамма СВ 1-5 – “*Vibrio chaetopteri*” sp. nov.

Исследование выполнено при финансовой поддержке гранта Министерства науки и высшего образования Российской Федерации 15.BRK.21.0004 (доп. соглашение № 075–15-2021-1052/9).

Целевое культивирование “*Candidatus Ozemobacter sibiricus*” из вод глубинной
термальной скважины в томской области

А. П. Лукина¹, Л. О. Соколянская^{1*}, И. И. Русанов², Л. Б. Глухова¹, А. В. Ракитин¹,
О. В. Карначук¹

¹Национальный исследовательский Томский государственный университет, г. Томск

²Институт Микробиологии им. С. Н. Виноградского, г. Москва

*электронная почта: Lusi5055@yandex.ru

Реконструкции метаболизма на основе генома, собранного из метагенома (MAG), может дать информацию для успешного культивирования ранее «некультивируемых» бактерий и архей. Однако данный подход до сих пор слабо реализован и был применен ограниченного количества микроорганизмов, а геномика и метагеномика продолжают увеличивать таксономическое разнообразие бактерий и архей. В 2014 году для изучения микробного сообщества глубинного подземного термального водоносного горизонта скважины 1-Р (пос. Белый Яр, Томская обл.) было проведено крупномасштабное метагеномное секвенирование (Kadnikov *et al.*, 2020). В микробном сообществе глубинной термальной воды, вскрываемой скважиной 1-Р, преобладали сульфатредуцирующие *Firmicutes* и *Deltaproteobacteria* и некультивируемые линии филумов *Chlorofexi*, *Ignavibacteriae* и *Aminicenantes*. Также обнаружены и описаны представители нескольких новых бактериальных филумов-кандидатов: *Candidatus Rifleibacterium amylolyticum*, *Candidatus Sumerlaea chitinivorans* и *Candidatus Ozemobacter sibiricus*.

Цель исследования заключалась в целенаправленном культивировании некультивируемого “*Candidatus Ozemobacter sibiricus*” из термальной воды скважины 1-Р, основанном на данных метаболизма, предсказанных в результате реконструкции генома (MAG). Пробы воды скважины 1-Р (пос. Белый Яр, Томская обл.), отбирали в апреле 2024 года. В момент отбора проб температура на устье скважины составляла 42.5 °С, вода характеризовалась слабощелочным pH 8.04 и отрицательным окислительно-восстановительным потенциалом (Eh – 289 mV). Согласно реконструкции генома “*Candidatus Ozemobacter sibiricus*” анаэробный, облигатный органотроф, получающий энергию путем брожения или дыхания с Fe (III) и способный использовать крахмал в качестве субстрата для роста. Учитывая предсказанную геномную информацию, для получения накопительных культур акцептором электронов выбрано железо Fe(III), а субстратами роста глюкоза, галактоза, крахмал, ксилан, мальтодекстрин, пептон и пируват. Накопительные культуры инкубировали при 37; 45; 55; и 65 °С. Получены 8 морфологически однородных культур, обозначенных как 1760, 1761, 1762, 1763, 1764, 1765, 1766 и 1767. Анализ последовательности гена 16S рНК изолята 1760 и 1761 показал, что их ближайшим родственником является *Desulforamulus profundi* Bs107, со сходством 98.48 % и 98.58 %, соответственно. Частичная последовательность гена 16S рНК изолята 1762, показала, что ближайшим валидным родственником является *Christensenellaceae bacterium* Marseille-P3337, гомология частичной последовательностей составила 87.95 %. Последовательности гена 16S рНК изолятов 1763, 1764 и 1765 принадлежат к роду *Bacillus*. Доминирующим представителем культуры 1766 был *Thermodesulfovibrio aggregans*, гомология частичной последовательности гена 16S рНК составляла 86.40 %, а родственником изолята 1767 является *Desulfococcus palustris*, сходство частичной последовательности - 85.25%.

Таким образом, первоначальные попытки накопления не позволили получить “*Candidatus Ozemobacter sibiricus*” в культуре. Дальнейшие попытки создания селективных условий будут направлены на культивирование в условиях кислого pH среды, что связано с нахождением в геноме механизмов, характерных для ацидофилов. Также будут использованы антибиотики, устойчивость к которым присутствует в геноме.

Исследование выполнено при финансовой поддержке гранта Российского научного фонда № 24-14-00396.

Метагеномное профилирование эукариот, населяющих различные части российского трюфельного гриба *Tuber magnatum*

Е. В. Малыгина*, Н. А. Имидоева, А. Ю. Бельшенко, Т. Н. Вавилина, Д. В. Аксёнов-Грибанов
Иркутский государственный университет, г. Иркутск

*электронная почта: cat.malygina@gmail.com

Tuber magnatum, или «итальянский белый трюфель», является редким видом трюфельных грибов и отличается специфическим ароматом. Данный гриб обладает ограниченным ареалом, а также трудностями выращивания. Распространение данного вида трюфелей не характерно для России, в отличие от ряда европейских стран (Италии, Франции, Хорватии и т. д.). Известно, что на всех этапах развития плодовые тела трюфелей в почве колонизированы многочисленными симбионтами, а их роль в механизмах формирования плодовых тел до сих пор не установлена [1].

Целью данного исследования выступало метагеномное профилирование эукариот, населяющих различные части (перидий и глебу) российского трюфельного гриба *T. magnatum*. Плодовые тела белого трюфеля были собраны в окрестностях города Краснодар. Фрагменты плодовых тел ($n = 6$) отобраны для анализа разнообразия прокариот с помощью метагеномного профилирования по гену 16S рРНК и биоинформатического анализа.

Согласно материалам метагеномного анализа, сообщество эукариот, населяющих *T. magnatum* (OTU $90,71 \pm 2,55$ %), состояло из филы *Ascomycota* (OTU $8,9 \pm 3,79$ %), *Basidiomycota* (OTU $0,29 \pm 0,01$ %), *Ciliophora* (OTU 0,04 %), *Streptophyta* (OTU 2,69 %) и доли неописанных таксонов (OTU $0,08 \pm 0,05$ %).

Сообщество эукариот *T. magnatum* было представлено 25 родами. В пробе перидия плодового тела *T. magnatum* содержались такие рода, как *Alternaria* sp. (OTU 0,05 %), *Ascobolus* sp. (OTU 0,08 %), *Capronia* sp. (OTU 0,74 %), *Cladophialophora* sp. (OTU 0,1 %), *Cortinarius* sp. (OTU 0,01 %), *Cystolepiota* sp. (OTU 0,13 %), *Dactylospora* sp. (OTU 0,06 %), *Diutina* sp. (OTU $0,94 \pm 0,23$ %), *Entoloma* sp. (OTU 0,01 %), *Exophiala* sp. (OTU 0,61 %), *Geastrum* sp. (OTU 0,11 %), *Geotrichum* sp. (OTU $6,84 \pm 0,67$ %), *Hypholoma* sp. (OTU 0,04 %), *Phlebiopsis* sp. (OTU 0,15 %), *Pichia* sp. (OTU 0,17 %), *Rhodotorula* sp. (OTU 0,16 %), *Tetracladium* sp. (OTU 0,1 %), *Wallemia* sp. (OTU 0,03 %), *Yarrowia* sp. (OTU 0,09 %).

Помимо, собственно, *T. magnatum*, содержание которого в образцах глебы составляло $92,27 \pm 2,03$ %, в составе глебы обнаружены грибы следующих родов: *Cladosporium* sp. (OTU 0,08 %), *Diutina* sp. (OTU $0,93 \pm 0,91$ %), *Geotrichum* sp. (OTU $5,44 \pm 3,25$ %), *Pelagostrobilidium* sp. (OTU 0,04 %), *Pichia* sp. (OTU 0,13 %).

В отношении белого трюфеля *T. magnatum*, установлено, что специфическими и доминантными эукариотическими организмами перидия данного вида трюфеля выступают немногочисленные представители *Alternaria* sp., *Ascobolus* sp., *Wallemia* sp., *Yarrowia* sp. и другие, а для глебы *T. magnatum* характерны эукариоты рода *Diutina* sp. Кроме того, метагеномный анализ сообществ эукариот белого трюфеля показал наличие доминирующего рода *Geotrichum* sp., встречающегося как в перидии, так и в глебе плодового тела. Согласно литературным данным, грибы рода *Geotrichum* участвуют в образовании специфического аромата трюфельных грибов [2]. Также была выдвинута гипотеза о том, что грибы данного рода участвуют в процессах образования микоризы между трюфелем и растением-хозяином. Примечательно, что при проведении секвенирования в рамках одного гриба выявлено несколько нуклеотидных последовательностей трюфельных грибов одного вида.

Исследование выполнено при финансовой поддержке проекта Российского научного фонда № 22-76-10036.

Ссылки:

1. Zambonelli *et al.* True Truffle (*Tuber* spp.) in the world. // Springer International Publishing, Cham. SOILBIOL, Switzerland. 2016. V. 47. P. 401.

Определение скоростей микробных процессов сульфатредукции, ассимиляции углекислоты, продукции и окисления метана радиоизотопным методом, в воде радонового источника в селе Чистоводное, Приморского края

И. И. Русанов^{2*}, А. П. Лукина¹, Л. О. Соколянская¹, Е. Е. Захарова², М. П. Исаева³,
О. В. Карначук¹

¹Национальный исследовательский Томский государственный университет, г. Томск

²Институт микробиологии им. С. Н. Виноградского, ФИЦ Биотехнологии РАН, г. Москва

³Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г. Б. Елякова ДВО РАН, г. Владивосток

*электронная почта: rusanov_igor@mail.ru

Микробная сульфатредукция является основным процессом, ответственным за образование сульфидов в природных и техногенных средах, содержащих сульфаты. В биогеохимических исследованиях давно и успешно используется радиоизотопный метод для определения интенсивности сульфатредукции в природных биотопах. Скорость образования биогенного H_2S в водоносных горизонтах глубинной биосферы до сих пор остается малоизученной. Целью настоящего исследования являлось измерение скорости микробной сульфатредукции, а также определение скоростей общей микробной ассимиляции углекислоты, и микробных процессов цикла метана – метанобразования и метаноокисления, в воде радонового источника в селе Чистоводное, вскрываемого глубинными скважинами. Пробы воды радонового источника в с. Чистоводное, Приморского края, отобраны в октябре 2023 года. Была исследована вода из скважины, а также вода и осадки минерального источника (Левый Нижний), расположенного непосредственно под обсадкой глубинной скважины.

Проведенные биогеохимические исследования радиоизотопным методом, показали высокие скорости общей микробной активности по ассимиляции углекислоты как в воде скважины (3.5-3.9 мкгС/л в сутки), так и в воде источника (7.2-11.1 мкгС/л в сутки). В поверхностных осадках источника скорости микробной ассимиляции бикарбоната (203-273 мкгС/л в сутки) были сравнимы с таковыми в богатых органикой осадках морского шельфа. Как концентрация растворенного метана (200-500 нл/л), так и скорость его микробного окисления в воде (9-13 нл/л в сутки) и осадках (77-91 нл/дм³ в сутки) были относительно невысокими. При этом скорость гидрогенотрофного (из водорода и углекислоты) микробного образования метана была очень высокой в воде (445-918 нл/л в сутки), а в осадках (26370 нл/дм³ в сутки) сравнима с богатыми прибрежными морскими осадками.

Измеренная радиоизотопным методом скорость микробной сульфатредукции в воде из скважины (1.1-21.3 нгS/л в сутки) была предельно низкой, но аналитически достоверной в серии повторностей. В воде источника (540-1500 нгS/л в сутки) активность микробного восстановления сульфатов была сравнима с осадками морского шельфа, а в осадках источника (4180-12180 нгS/л в сутки) с осадками морских богатых эстуарий.

Исследование выполнено при финансовой поддержке гранта Российского научного фонда № 24-14-00396.

Создание коллекции микроорганизмов, обладающих механизмом Quorum Quenching

М. Н. Соколов*, И. В. Злобин, Е. Д. Перова, А. С. Сысуев, Ю. В. Зайцева
Ярославский государственный университет им. П. Г. Демидова, г. Ярославль
*электронная почта: melsudbi@yandex.ru

Quorum Quenching (QQ), как механизм конкурентной борьбы у бактерий, объединяет различные подходы, направленные на подавление действия Quorum Sensing систем (QS). QS регулирует экспрессию многих генов, связанных в том числе с синтезом факторов патогенности и образованием биопленок. Поэтому механизм QQ, как стратегия ингибирования QS, является перспективным способом снижения бактериальной вирулентности.

Механизм QS основан на выделении бактериями в среду низкомолекулярных сигнальных соединений, среди которых у грамотрицательных бактерий наиболее изученными являются ацилгомосеринлактоны (АГЛ). Одним из перспективных подходов подавления QS является ферментативная деструкция АГЛ, которая может происходить по одному из трех основных механизмов: разрушение лактонного кольца, отщепление ацильного радикала и/или восстановление кетогруппы.

Целью работы являлось изучение распространения ферментов QQ у бактерий и создание коллекции микроорганизмов, обладающих механизмом QQ. В ходе работы были отобраны 12 референсных последовательностей, относящихся к 4 семействам ферментов: Zn-гидролазы; α/β гидролазы; фосфотриэстеразоподобные лактоназы и ацилазы. При помощи алгоритма BLAST были подобраны 326 последовательностей, гомологичных им не менее, чем на 70%. На основе выравнивания полученных данных с использованием алгоритма MUSCLE было сформировано филогенетическое дерево по алгоритму PHYLIP NJ, матрица расстояний Jones-Taylor-Thornton. На основании результатов филогенетического анализа было установлено, что перечисленные группы ферментов являются гетерогенными, а их функциональное сходство конвергентно сложилось в ходе эволюции ферментных систем бактерий, кроме того, были выявлены предполагаемые предковые формы для каждой отдельной группы белков.

Также в ходе работы был проведен скрининг штаммов бактерий, проявляющих QQ свойства, среди микроорганизмов, выделенных из различных зоо- и фитоценозов. Скрининг проводили с использованием биосенсора *Chromobacterium violaceum* CV026 как описано [1]. Всего в ходе работы из 558 штаммов бактерий было выделено 48 изолятов, проявляющих QQ свойства. Отобранные бактериальные изоляты были идентифицированы по гену 16s рРНК. Эти штаммы являлись представителями родов *Stenotrophomonas*, *Rhodococcus*, *Bacillus*, *Providencia*, *Pseudomonas*, *Citrobacter*, *Klebsiella*, *Pantoea*, *Rahnella*, *Shewanella*, *Pseudomonas*, *Comamonas*, *Chryseobacterium* и *Micrococcus*.

Создание подобных коллекций позволит изучить особенности функционирования механизма QQ у бактерий различных таксономических групп и отобрать биотехнологически перспективные штаммы для дальнейшего использования.

Исследование частично выполнено в рамках проекта Фонда В. Потанина № ПЮФП25-0025/24.

Ссылки:

1. Torabi Delshad S. *et al.* // J Appl Microbiol. 2018.

Изучение биоразнообразия подвидов бактерий *Bacillus thuringiensis* для разработки биоинсектицида для контроля численности колорадского жука

Д. С. Терешенко*, Е. В. Гризанова, Т. И. Крыцына, И. М. Дубовский
Новосибирский государственный аграрный университет, г. Новосибирск
*электронная почта: tereshenko-darya@mail.ru

Бактерии *Bacillus thuringiensis* (Bt) – это распространенный вид энтомопатогенных бактерий в природе. Данные бактерии являются основой биопрепаратов для защиты растений от насекомых – вредителей. Бактерии *B. thuringiensis* способны продуцировать целый ряд соединений, которые отвечают за инфекционный процесс у насекомых. Специфичность действия бактерий по отношению к определенным отрядам насекомых насекомым связана с составом Cry-токсинов в кристалле. Например, используемые в работе подвиды бактерий содержат Cry3 или Cry 7/8 токсины, специфичные по отношению к насекомым отряда жесткокрылые. Однако существует множество факторов вирулентности, задействованных спорами и вегетативными клетками, которые способствуют патогенности бактерий.

В работе изучены основные антибактериальные механизмы защиты в среднем кишечнике личинок колорадского жука *Leptinotarsa decemlineata* при скормливании спор и/или кристаллического токсина бактерий *Bacillus thuringiensis* (Bt). Показан синергетический эффект совместного применения спор и кристаллического эндотоксина Cry3A бактерий *B. thuringiensis* в смертности личинок колорадского жука (Dubovskiy *et.al.*, 2021). Установлено, что токсины Cry3A вызывали повреждения тканей и окислительный стресс (Dubovskiy *et.al.*, 2021), споры и вегетативные клетки бактерий вызывают индукцию иммунного ответа насекомых и вносят вклад в развитие инфекционного процесса, синтезируя вторичные факторы вирулентности.

Изучая разнообразие бактерий и сравнивая их вирулентность по отношению к насекомым, можно найти перспективные штаммы. Показано различие в биологической эффективности сравниваемых подвидов и штаммов бактерий, а также отличия в ответе организма насекомых на инфекцию.

Таким образом, бактерии *B. thuringiensis* являются источником природных соединений, которые могут являться основой биологических средств защиты растений.

Исследование выполнено при финансовой поддержке гранта Российского научного фонда (грант № 24-16-00113).

Изменение культивируемой микрофлоры и ее характеристик на примере различных стадий развития культурных растений Татарстана

М. Фролов*, Э. Э. Валлиахметов, А. Ю. Суханов, Б. Р. Исламов, Е. Ю. Шульга,
Э. Н. Комиссаров, Ш. З. Валидов

Федеральный исследовательский центр Казанский научный центр РАН, г. Казань

*электронная почта: m.frolov@knc.ru

Растительный микробиом оказывает значительное влияние на рост и развитие растений. При этом, в разнообразных условиях почвы, на которой произрастают растения, наблюдаются совершенно разнообразные виды и штаммы микроорганизмов. Тесное взаимодействие отдельных представителей микробиоты растений и баланс количественного соотношения полезных и патогенных штаммов, обеспечивает и во многом определяет здоровье растения [1]. Существует множество работ, которые пытаются показать состав микроорганизмов в почве и ризосфере на различных растениях [2], а также их взаимодействие. Однако малое количество работ посвящено динамике почвенной микробиоты и ее свойств в контексте изменения физиологии растения-хозяина, климатических условий и внешних факторов, которые бы включали более точный подход к определению видового разнообразия микроорганизмов, их идентификации и фенотипических свойств. В своей работе мы предлагаем использование комбинированного подхода для анализа изменения микробиома на примере ризосферы и филлопланы нескольких сельскохозяйственных растений, а также изменение эндофитной микрофлоры с использованием методов микробиологии, биохимии и метагеномики [3].

В рамках работы мы проводили отбор проб различных участков культурных растений Татарстана: яровой пшеницы, кукурузы, ячменя, рапса и подсолнечника. Так, исследовалась ризосфера и филлоплана растений, а также почва, в которой они произрастали.

Всего нами было выделено 13 270 изолятов микроорганизмов, которые были заложены на криохранение. В результате была образована коллекция микроорганизмов лаборатории Молекулярно-генетических и микробиологических методов. Среди выделенных изолятов для дальнейшей идентификации внутри одного образца были исключены повторности методом ДНК-фингенпринтинга с использованием BOX-праймеров. Оценка разнообразия микроорганизмов на уровне рода проводилась в формате heatmap. Для построения диаграммы использовались относительные коэффициенты, показывающие отношение количества изолятов одного рода к общему числу выделенных с конкретной точки изолятов. Все выделенные микроорганизмы были проверены на наличие экзоферментов, таких как амилазы, липазы, целлюлазы, протеазы и фитазы, а также способности к фиксации атмосферного азота. Наибольшее количество микроорганизмов обладали двумя или тремя активностями, 4126 и 4514 изолятов соответственно. Количество микроорганизмов, обладающих всего одной активностью, 1627 штук, приблизительно соотносится с количеством микроорганизмов, у которых идентифицировано 4 активности, 1921 штука. Число изолятов, не имеющих ни одной активности, составило 565 штук, в то время как 455 микроорганизмов проявляли 5 активностей, и 62 микроорганизма обладали всеми свойствами, на которые проводилась фенотипическая характеристика.

Ссылки:

1. Chialva *et al.* // COB. 2022. N. 73. P. 135-142.
2. Rocha *et al.* // Microorganisms. 2023. V. 11, N. 1. P. 57.
3. Piper *et al.* // GigaScience. 2019. V. 8, N. 8. P. 1-22.

Молекулярно-генетические подходы для идентификации биотехнологически ценных штаммов морских грибов

В. Е. Чаусова*, Н. Н. Киричук, Ю. В. Худякова, М. П. Исаева

Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г. Б. Елякова ДВО РАН, г. Владивосток

*электронная почта: v.chausova@gmail.com

В настоящее время актуальной проблемой остается недостаточная изученность таксономического разнообразия факультативных морских грибов-микромикетов, которые являются одним из перспективных источников использования их в качестве продуцентов биологически активных вторичных метаболитов. Сравнительное исследование одних и тех же видов грибов-микромикетов, выделенных из наземной и морской сред, показало, что морские изоляты оказались наиболее перспективными продуцентами метаболитов, не обнаруженных в наземных изолятах.

Для проведения достоверной видовой идентификации использовали молекулярно-генетические методы. Для анализа были отобраны биотехнологически ценные штаммы морских грибов родов *Penicillium* (5 штаммов: КММ 4719, КММ 4679, КММ 4718, КММ 4689 и КММ 4670), *Aspergillus* (2 штамма: КММ 4631 и КММ 4747), *Amphichorda* (КММ 4639), *Paragliomastix* (КММ 4401) и *Asteromyces cruciatus* (КММ 4696), ранее из которых были выделены и исследованы вторичные метаболиты разнообразной природы, проявляющие различные виды биологической активности.

Выделены образцы геномных ДНК из 9 штаммов морских грибов, амплифицированы и секвенированы последовательности генов 28S рДНК (2 ампликона), ITS (9 ампликонов), *BenA* (9 ампликонов тубулинов), *CaM* (6 ампликонов кальмодулинов), *TEF1* (2 ампликона факторов элонгации трансляции 1α) и *RPB2* (4 ампликона второй большой субъединицы РНК полимеразы II). С помощью программного обеспечения MEGA11 и алгоритма BLAST проведена видовая идентификация исследуемых штаммов на основе филогенетического анализа.

Таким образом, использование молекулярно-генетических подходов позволило провести достоверную видовую идентификацию и реидентификацию биотехнологически ценных штаммов морских грибов. Проведена идентификация шести штаммов морских грибов *Penicillium polonicum* КММ 4719, *Penicillium yezoense* КММ 4679, *Aspergillus fumigatus* КММ 4631, *Amphichorda guana* КММ 4639, *Paragliomastix luzulae* КММ 4401 и *Asteromyces cruciatus* КММ 4696. Проведена идентификация штаммов *Penicillium sajarovii* КММ 4718 и *Aspergillus protuberus* КММ 4747, входящих в грибной природный комплекс, ассоциированный с морским ежом *Scaphechinus mirabilis*. Проведена реидентификация штаммов *Penicillium hispanicum* КММ 4689 и *Penicillium antarcticum* КММ 4670.

Исследование выполнено при финансовой поддержке гранта Министерства науки и высшего образования Российской Федерации 15.BRK.21.0004 (доп. соглашение № 075–15-2021-1052/9).

Биоразнообразие симбиотических бактерий морской полихеты *Chaetopterus cautus*

С. Е. Шевцова^{1*}, В. И. Еремеев², В. В. Куриленко², М. П. Исаева²

¹Дальневосточный федеральный университет, г. Владивосток

²Тихоокеанский институт биоорганической химии имени Г. Б. Елякова ДВО РАН,
г. Владивосток

*электронная почта: sofaschevtsova@yandex.ru

Морские полихеты являются ведущей группой морского макробентоса. Они выполняют важную экологическую функцию в продукции органического вещества, представляя особую экологическую нишу для некоторых биотехнологически ценных морских бактерий. Морской многостетинковый червь *Chaetopterus cautus*, представитель семейства *Chaetopteridae*, обитает в сублиторальной зоне Японского моря и ведет оседлый образ жизни внутри собственно построенной трубки. В рамках данного исследования были оптимизированы походы к изучению микробного разнообразия мукуса ловчей сети и кишечника *C. cautus* путем секвенирования ампликонов регионов V3-V4 гена 16S рРНК.

В работу было взято по два образца ловчей сети и кишечника *C. cautus*, а также образец прилегающего морского грунта. Геномная ДНК была выделена с использованием наборов двух производителей: QIAGEN® DNeasy® PowerSoil® и Macherey-Nagel™ NucleoSpin™ Soil. Для амплификации фрагментов 16S рРНК (прокариоты) и региона ITS (грибы) были использованы образцы, выделенные набором фирмы QIAGEN. По результатам электрофореза, фрагмент региона ITS не нарабатывался ни в одном из образцов. Полученные ампликоны 16S рРНК секвенировали на базе платформы MiSeq (Illumina, США) с использованием метода парно-концевых прочтений 2×250. Наборы данных, полученные в результате секвенирования, были обработаны с помощью программного обеспечения «QIIME 2».

Исследование альфа-разнообразия показало, что для каждого образца была достигнута глубина прочтения, достаточная для достоверной оценки таксономического разнообразия. При изучении бета-разнообразия было обнаружено, что образцы из кишечника, мукуса и грунта формировали три обособленные группы, причем образец грунта находился на значительном удалении от остальных. В таксономическом составе наблюдались выраженные различия, коррелирующие с источником выделения образца. Так, в микробиомах мукуса ловчей сети было обнаружено явное преобладание представителей из рода *Endozoicomonas* и из класса *Spirochaetia*. В микробиомах кишечника было обнаружено большее таксономическое разнообразие. Помимо представителей *Endozoicomonas* и *Spirochaetia*, которые наблюдались в меньшем количестве, также присутствовали представители семейства *Shewanellaceae*, рода *Vibrio* и вида *Rubritalea marina*. В литературе обнаружены данные о симбиотических связях вышеперечисленных таксонов. Также из образцов мукуса ловчей сети были изолированы и генотипированы по 16S рРНК штаммы родов *Vibrio*, *Pseudovibrio*, *Bacillus*, *Brevundimonas* и *Paenibacillus*. Приведенные различия позволяют утверждать, что микробиомы ловчей сети и кишечника червя представляет обособленные и устойчивые в своем составе экологические ниши.

Исследование выполнено при финансовой поддержке гранта Министерства науки и высшего образования Российской Федерации 15.BRK.21.0004 (доп. соглашение № 075–15-2021-1052/9).

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ТЕХНОЛОГИИ: ОТ ГЕНА К БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИ ЦЕННОМУ ПРОДУЦЕНТУ

Влияние рекомбинантной щелочной фосфатазы морской бактерии на хроническое воспаление

Г. А. Бондарев^{2*}, Л. В. Слепченко², А. В. Сейткалиева^{1,2}, Л. А. Балабанова¹

¹Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г.Б. Елякова ДВО РАН, г. Владивосток

²Дальневосточный федеральный университет, г. Владивосток

³R&D Центр ООО «Арника», г. Владивосток

*электронная почта: bondarevgeorgii22@gmail.com

Кишечная щелочная фосфатаза (ЩФ) и другие ферменты из семейства белков PhoA вызывают значительный интерес как потенциальные терапевтические агенты для лечения различных системных и острых воспалительных заболеваний благодаря своим противовоспалительным свойствам и низкой иммуногенности. Однако получение рекомбинантных форм щелочной фосфатазы человека или животных затруднено из-за их зависимости от посттрансляционного гликозилирования. В связи с этим возник интерес к потенциальной терапевтической эффективности высокоактивной щелочной фосфатазы PhoA, полученной из морской бактерии *Cobetia amphilecti* КММ 296 (CmAP), в отношении кишечных заболеваний. Использовали экспериментальную модель мышинного кишечного колита, индуцированного декстраном, с признаками иммунного воспаления и проницаемости слизистой оболочки для бактериальных ЛПС и других провоспалительных факторов, что характерно для язвенного колита человека. Животных кормили рекомбинантным ферментом морской бактерии, инкапсулированным в альгинат (100 ед) в течение 7 дней. В тканях толстой кишки и сыворотке крови наблюдалось статистически значимое снижение уровня провоспалительных цитокинов IL-1 и IL-6, что свидетельствует об уменьшении системного и локального воспаления при персистентной инфильтрации слизистой лейкоцитами и неизменном уровне цитокина TNF-α. Однако, результаты лечения колита рекомбинантными ферментами морской бактерии и человеческой ЩФ (1) были сопоставимы. Полученные результаты свидетельствуют о перспективности перорального применения рекомбинантной щелочной фосфатазы CmAP для лечения состояний, связанных с гиперпроницаемостью кишечника.

Исследование выполнено при финансовой поддержке гранта Министерства науки и высшего образования Российской Федерации 15.BRK.21.0004 (доп. соглашение № 075–15-2021-1052/9).

Ссылки:

1. Patent RU2698397C2. Method for producing transformed plant cells containing recombinant human alkaline phosphatase and using transformed plant cells containing recombinant human alkaline phosphatase. 2019-08-26.

Современные подходы к преодолению устойчивости бактерий к антибиотикам и тяжёлым металлам

Г. Л. Бурыгин

Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов, ФИЦ «Саратовский научный центр РАН», г. Саратов

электронная почта: buryingl@gmail.com

Введение в середине XX века в медицинскую практику использования антибиотиков позволило существенно снизить смертность от инфекционных заболеваний. Высокая эффективность антимикробных препаратов сделала антибиотики популярными и очень широко применяемыми препаратами при лечении и профилактики инфекций человека и животных. В результате не всегда рационального производства и использования, антибиотики в большом количестве попадают в природные экосистемы, в которых устойчивость к ним начинает выступать в качестве главного фактора естественного отбора. Для всех антибиотиков, введенных в практику в прошлом веке, описаны резистентные к ним бактериальные штаммы. Бактериальная устойчивость к антибиотикам может быть связана с различными механизмами: 1) ферментативное изменение молекулы антибиотика; 2) активный выброс (эффлюкс) токсических веществ из клетки; 3) снижение проницаемости мембран; и 4) изменение структуры молекул-мишеней. В последние годы большое практическое значение приобрели бактерии с множественной лекарственной устойчивостью, в которых активно функционируют неспецифические системы эффлюкса RND-типа.

Механизмы устойчивости бактерий к тяжёлым металлам имеет много общего с резистентностью к антибиотикам. Однако, в катионы металлов кроме токсического эффекта, необходимы клеткам для нормального функционирования метаболизма в качестве кофакторов различных ферментов. Для поддержания гомеостаза катионов металлов бактерии используют несколько стратегий: внеклеточная секвестрация биополимерами, связывание металлотионеиновыми белками в цитоплазме и активный выброс (эффлюкс) катионов из клетки. Было показано, что одна система эффлюкса RND-типа может обеспечивать удаление из клеток и широко набора антибиотиков, и катионы нескольких металлов.

В данной работе было показано, что нанокластеры серебра, добавленные в среду культивирования, существенно снижали устойчивость бактерий к катионам Cu^{2+} и антибиотик эритромицину. При этом сами нанокластеры не вызывали ингибирования роста бактериальных культур. Так, у устойчивого к высоким концентрациям меди (II) штамма *Achromobacter insolitus* LCu2 в присутствии нанокластеров серебра значение минимальной ингибирующей концентрации (МИК) снизилось в 25 раз – с 2,5 мМ до 0,1 мМ катионов Cu^{2+} . У нескольких штаммов рода *Enterobacter*, устойчивых к эритромицину, внесение нанокластеров серебра приводила к снижению МИК в 2-3 раза. В обоих случаях бактериальные штаммы из резистентных к токсикантам в присутствии нанокластеров серебра становились чувствительными. Однако, следует признать, что значения токсикологические показателей даже в присутствии нанокластеров были значительно выше показателей высокочувствительных к меди (II) и эритромицину штаммов. На основании этого предполагается функционирование в клетках исследованных штаммов дополнительных систем устойчивости к токсикантам.

Исследование выполнено при финансовой поддержке гранта Российского научного фонда (грант РНФ № 24-24-00520).

**Как молекулярно-генетические механизмы резистентности насекомых к бактериям
Bacillus thuringiensis помогают совершенствовать биопрепараты**

Е. В. Гризанова*, И. М. Дубовский

Новосибирский государственный аграрный университет, г. Новосибирск

*электронная почта: katalasa_2006@yahoo.com

Резистентность насекомых один из ключевых аспектов снижения эффективности биологических препаратов на основе бактерий *Bacillus thuringiensis*. Устойчивость насекомых вредителей к токсинам бактерий в трансгенных растениях или биопрепаратах в полевых условиях обусловлена молекулярными механизмами устойчивости, которые связаны с мутациями генов рецепторов насекомых, необходимых для патогенного действия токсина. Однако, на сегодняшний день показано, что иммунный ответ насекомых, микрофлора и репарационные процессы в кишечнике, а также эпигенетические механизмы наследования, вносят вклад в эволюцию резистентности насекомых к бактериям *B. thuringiensis* и их токсинам. Воздействие на иммунный ответ и механизмы устойчивости насекомых к бактериям и их токсинам может помочь повысить эффективность биологических препаратов для защиты растений от вредителей. К таким подходам относят использование ингибиторов иммунного ответа, индукторов окислительного стресса, наночастиц, аналогов гормонов насекомых, РНК-интерференции, а также поиск новых штаммов и повышение вирулентности широко используемых подвидов бактерий *B. thuringiensis*. В докладе будут представлены основные результаты исследований по изучению механизмов резистентности насекомых к бактериям *B. thuringiensis*, а также подходы по увеличению вирулентности биотехнологически ценного продуцента.

Исследование выполнено при финансовой поддержке гранта Российского научного фонда № 24-16-00113.

Создание CRISPR/Cas9 системы, регулируемой малыми молекулами на уровне направляющей РНК

О. А. Должикова^{1*}, М. И. Мещанинова¹, Д. С. Новопашина^{1,2}

¹Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, г. Новосибирск

²Новосибирский государственный университет, г. Новосибирск

*электронная почта: olgado.dolzhikova@yandex.ru

CRISPR/Cas9 система является универсальным инструментом воздействия на генетический материал. Одним из направлений её усовершенствования является создание систем с возможностью регуляции во времени и пространстве. Перспективным, но мало разработанным подходом к регуляции CRISPR/Cas9 систем является аллостерическая регуляция.

Целью работы было создание аллостерически регулируемых систем CRISPR/Cas9 путем введения аптамера к теofilлину в состав направляющих РНК. Нами были сконструированы, синтезированы и исследованы CRISPR/Cas9 системы, содержащие в составе направляющих РНК аптамер к теofilлину в разных положениях, что позволяет активировать или дезактивировать CRISPR/Cas9 систему добавлением теofilлина. Синтез все направляющих РНК осуществляли твердофазным фосфитамидным методом. Исследование активности систем геномного редактирования проводили с использованием модельной плазмиды.

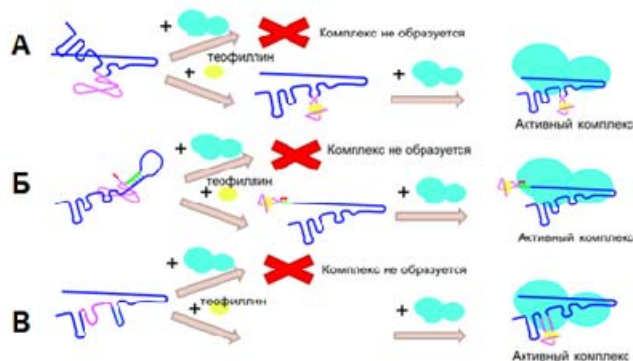


Рисунок 1 – Подходы к аллостерической регуляции CRISPR/Cas9 системы с введением аптамера в шпильку, взаимодействующую с белком (А), в концевой фрагмент направляющей РНК (Б), с искажением структуры шпильки (В)

Нами было опробовано три подхода к дизайну химерных направляющих РНК, содержащих аптамер к теofilлину. В первом подходе аптамер был введен в состав взаимодействующих с белком шпилек в составе направляющей РНК, при этом снижалась эффективность взаимодействия белок-РНК и активность системы уменьшалась. При добавлении в систему теofilлина аптамер изменяет свою третичную структуру и компактизуется, что в большинстве случаев приводит к активации системы. Во втором подходе аптамер вводили на 5'- или 3'-конец направляющей РНК в составе шпильки, которая стабилизируется в присутствии теofilлина. В отсутствии теofilлина дополнительно введенный фрагмент по принципу комплементарности взаимодействует с одним из структурно значимых фрагментов направляющей РНК, активность системы блокируется. В третьем подходе дополнительно введенный фрагмент искажал структуру одной из шпилек. При добавлении теofilлина шпилька «перекатывалась» в другое положение, где она в меньшей степени затрудняла взаимодействие РНК-белок. Аналогичным способом была сконструирована направляющая РНК, дезактивирующаяся в присутствии теofilлина.

Таким образом нами были получены аллостерически регулируемые теofilлином системы CRISPR/Cas9.

Исследование выполнено при финансовой поддержке гранта Российского научного фонда № 22-14-00294.

Использование генетических технологий для защиты растений от насекомых вредителей

И. М. Дубовский*, Е. В. Гризанова

Новосибирский государственный аграрный университет, г. Новосибирск

*электронная почта: dubovskiy2000@yahoo.com

Редактирование генома растений является популярным и эффективным подходом для повышения их устойчивости к различным вредителям. Токсины бактерий *Bacillus thuringiensis* были первыми защитными компонентами, внедренными в геном растения, и до сих пор эти бактерии остаются основным источником генов для трансгенов для контроля численности вредных насекомых. Использование растительных белков токсичных для вредителей, таких как лектины и ингибиторы протеаз, является еще одной популярной стратегией для увеличения устойчивости растений. Высокоспецифичный метод РНК-интерференции (подавления экспрессии) генов вредителей, за счет экспрессии двухцепочечной РНК в растениях, в последнее время применяется как эффективный подход в области защиты сельскохозяйственных культур. Системы модификации генома на основе CRISPR/Cas позволяют вносить высокоточные изменения в геном растений для повышения их устойчивости к вредителям. Все эти подходы направлены на нарушение физиологических и биохимических систем, а также поведения вредителей. В докладе будет рассмотрен прогресс в улучшении генома растений и микроорганизмов для защиты от насекомых и клещей за последние два десятилетия. Также будут представлены результаты собственных исследований в области редактирования генома растений и микроорганизмов для создания эффективных подходов защиты растений от различных вредителей.

Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 22-16-20031) и Правительства Новосибирской области (№ р-4).

**Создание высокоактивных штаммов-продуцентов вторичных метаболитов в грибах:
классические и генно-инженерные подходы**

А. А. Жгун

ФИЦ Биотехнологии РАН, Институт Биоинженерии им. К. Г. Скрябина, г. Москва
электронная почта: zzhgun@mail.ru

В настоящее время более половины применяемых антибиотиков получают в результате ферментации улучшенных грибных штаммов и последующих модификаций синтезируемых вторичных метаболитов [1]. Это стало возможным благодаря использованию так называемых классических методов улучшения штаммов (classical strain improvement, CSI), связанных, в первую очередь, с многораундовым случайным мутагенезом и скринингом по продукции целевого вторичного метаболита. Такие программы CSI, начиная с середины 1940-х позволили создать высокоурожайные (high-yielding, HY) штаммы, у которых уровень продукции целевых вторичных метаболитов увеличен в 100-1000 и более раз по сравнению с исходными штаммами дикого типа (WT). Однако большинство промышленных продуцентов, полученных в результате CSI, наряду с увеличенной продукцией необходимых соединений несут побочные мутации, возникшие в результате случайного мутагенеза. В результате улучшенные классическими методами HY-штаммы часто характеризуются значительным снижением жизнеспособности по сравнению с исходными штаммами WT.

Современные технологии генетической инженерии открывают возможность для внесения направленных изменений для улучшения продукции, однако в настоящее время нет работ, когда методами метаболической инженерии из WT штамма создали бы HY продуцент вторичного метаболита. Это связано с комплексностью необходимых изменений, стоящих на пути превращения штамма WT в HY, некоторые из которых до сих пор до конца не понятны. Однако в последнее время благодаря сравнительным мультиомным подходам между исходными природными изолятами и улучшенными продуцентами открылись некоторые универсальные изменения для увеличения продукции. Они касаются изменений в системе глобальной регуляции вторичного метаболизма, нарушениями в альтернативных путях вторичного метаболизма, перераспределениями в потоках энергии, в метаболизме соединений-предшественников и некоторые другие [1]. Понимания таких процессов может позволить в перспективе создавать улучшенные продуценты *de novo*. На современном этапе есть ряд примеров удачного сочетания классического и генно-инженерного подходов, когда штамм, полученный в результате программы CSI затем используют как хозяйский (host) для биосинтеза гетерологичного вторичного метаболита. Одним из ярких примеров таких работ может случить создание высокоактивного продуцента правостатина на база *Penicillium chrysogenum*, ранее полученного в программе CSI для продукции пенициллина G [2]. В результате на современном этапе для получения высокоактивных продуцентов вторичных метаболитов в грибах наиболее перспективным видится именно сочетание классических и генно-инженерных подходов.

Ссылки:

1. Zhgun A. A. // Fermentation. 2023. V. 9, N. 12. P. 1027.
2. McLean K. J. *et al.* // Proc. Natl. Acad. Sci. 2015. V. 112, N. 9. P. 2847–2852.

Конструирование слитого белка спидроин-эндолизин

А. А. Казыргулова³, А. И. Прозоров^{1,2*}, Б. В. Свиридов¹

¹ Научно-исследовательский центр «Курчатовский институт», г. Москва

² Российский химико-технологический университет им. Д. И. Менделеева, г. Москва

³ Московский политехнический университет, г. Москва

*электронная почта: prozorovartem15@gmail.com

Грамотрицательная бактерия *Pseudomonas aeruginosa* является наиболее распространённой бактерией, вызывающей внутрибольничные инфекции и вентиляционно-ассоциированную пневмонию. Лечение инфекций, вызванных *P. aeruginosa* с помощью антибиотиков, становится менее эффективным из-за её возрастающей устойчивости к ним [1]. В качестве нового агента могут послужить фаговые ферменты – эндолизины, гидролизующие пептидогликан и вызывающие лизис бактерий от осмотического шока. Эндолизины открывают новые перспективы в борьбе с антибиотикоустойчивыми бактериями [2]. Однако наличие внешней цитоплазматической мембраны у грамотрицательных бактерий блокирует доступ эндолизинов к пептидогликану. Для преодоления данной проблемы существует несколько подходов, одним из которых является модификация С-концевой части эндолизина. Добавление спидроина, белка паутины, может способствовать преодолению внешней мембраны благодаря его амфифильным свойствам и улучшить стабильность белка при его применении *in vivo* [3,4].

В настоящей работе мы использовали ген эндолизина фага *P. aeruginosa* FMV [5] сшив его с геном синтетического аналога спидроина B10-A4. Белок B10-A4 содержит 10 повторов Gly-Pro-Gly-Gly-Tyr-Gly-Pro-Gly-Gln-Gln-Gly-Pro-Gly-Ala-Ala-Ala-Ala-Gly-Ser. Полученная конструкция была клонирована в pET28, проверена секвенированием и трансформирована в штаммы *Escherichia coli* BL21(DE3) и Rosetta 2(DE3). При индукции синтеза белка с помощью ИПТГ наблюдалось стремительное падение оптической плотности, которое не происходило у контроля, штаммы с плазмидой содержащей ген B10-A4. Запланировано получение продуцента на основе дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*.

Исследование выполнено при финансовой поддержке Государственного задания НИЦ «Курчатовский институт».

Ссылки:

1. Zheng P. *et al.* // Biotechnology Advances. 2019. V. 37, N. 1. P. 177-192.
2. Murray E. *et al.* // Viruses. 2021. V. 13, N. 4: 680.
3. Exler J. H. *et al.* // Angew. Chem. 2007. V. 46, N. 19. P. 3559-3562.
4. Liu Y. *et al.* // J. Biomater. Appl. 2021. V. 36, N. 5. P. 859-871.
5. Козлов Г. Д. // Генетика. 2010. Т. 10, № 3. С. 340-348.

Пептиды Кунитц-типа морской анемоны *Heteractis magnifica*: структурное разнообразие и фармакологический потенциал

А. Н. Кветкина*, Н. Ю. Отставных, А. А. Климович, Е. А. Пислягин, М. П. Исаева,
Е. В. Лейченко

Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г. Б. Елякова ДВО РАН, г. Владивосток
*электронная почта: kvetkinaan@gmail.com

Пептиды Кунитц-типа обнаружены повсеместно, включая животных, микроорганизмы и даже вирусы. Богатым источником пептидов Кунитц-типа являются морские анемоны. Так, в транскриптоме морской анемоны *Heteractis magnifica* обнаружено мультигенное семейство пептидов Кунитц-типа, которое включает четыре группы, кодирующие высоко гомологичные HCGS-, HCRG-, HCGG- и HCIQ-пептиды, различающиеся как точечными аминокислотными заменами, так и структурой кодирующих их генов. Различия в аминокислотных последовательностях не влияют на пространственную укладку молекулы, но могут способствовать взаимодействию пептидов с новыми мишенями, а, следовательно, проявлению новой биологической активности. Показано, что некоторые из охарактеризованных HCGS- и HCRG-пептидов обладают анальгетической, антигистаминной и противовоспалительной активностью, что обусловлено их взаимодействием с ионными каналами и сериновыми протеазами, участвующими в гидролизе пептидных и белковых компонентов на поверхности клеток, передаче болевых сигналов, продукции провоспалительных цитокинов и т.д.

Используя метод глубокого секвенирования ампликонов нами было идентифицировано 764 транскрипта, кодирующие 24 изоформы HCIQ-пептидов. Анализ последовательностей позволил установить четыре структурных варианта предшественников IQ-пептидов. Отличительной особенностью предшественников IQ-пептидов является наличие пропептида с сайтом расщепления Lys-Arg, характерным для нейро- и пороформирующих токсинов морских анемонов. На основе выведенных аминокислотных последовательностей зрелых IQ-пептидов были отобраны кандидаты для получения рекомбинантных пептидов. Для этого были разработаны эффективные системы рекомбинантной продукции IQ-пептидов в клетках *Escherichia coli*. Установлено, что полученные IQ-пептиды обладают выраженной пространственной структурой с корректным фолдингом и высокой термостабильностью. Показано, что полученные IQ-пептиды являются ингибиторами трипсина и способны связываться с широким спектром сериновых протеаз, проявляют нейропротективную активность в 6-гидроксидофамин-, паракват-, ротенон- и АТФ-индуцированной токсичности на клетки нейробластомы мыши Neuro2a посредством ингибирования уровня активных форм кислорода и P2X7R-опосредованного входа кальция в клетки. Более того, пептид HCIQ2c1 в дозе 0,1 мг/кг оказывал анальгетическое действие в тесте «горячая пластина», достоверно увеличивая латентное время реакции на термостимуляцию, а в тестах капсаицин- и АИТС-индуцированной боли пептид в той же дозе достоверно снижал время поджатия лапы мыши в 4 и 3 раза, время облизывания лапы в 1,5 раза и количество облизываний в 2 и 1,5 раза соответственно. HCIQ2c1 в дозе 0,1 мг/кг в течение 24 часов после введения вызывал АИТС-индуцированное торможение роста отека лапы практически до первоначального состояния. Вероятно, анальгетический и противовоспалительный эффект пептида может быть обусловлен его действием на болевой канал TRPA1. Таким образом, использование секвенирования нового поколения позволило идентифицировать уникальную группу пептидов Кунитц-типа морской анемоны *Heteractis magnifica*, обладающих нейропротективной, анальгетической и противовоспалительной активностью.

Вирулентность и стратегии развития популяций *Bacillus thuringiensis* в условиях *in vitro* и *in vivo*

Т. И. Крыцына*, Е. В. Гризанова, И. М. Дубовский
Новосибирский государственный аграрный университет, г. Новосибирск
*электронная почта: krytsyna@list.ru

Стремление к получению экологически чистой продукции и снижению использования химических инсектицидов обуславливает нарастающий интерес к биологическим средствам защиты растений от насекомых-вредителей. Одними из главных агентов биозащиты являются бактерии *Bacillus thuringiensis* (*Bt*). Использование небольшого разнообразия штаммов *Bt* в биопрепаратах и многократные обработки за сезон приводят к снижению или потери вирулентности бактерий и развитию резистентных популяций насекомых. Решение этой проблемы заключается в комплексном подходе, включая поиск путей блокирования иммунитета насекомых, разработку способов повышения вирулентности используемых штаммов *Bt* и создание новых высоковирулентных штаммов, а также глубокое изучение основ их вирулентности.

Вирулентность бактерий является многофакторным признаком, где наряду с продукцией основных инсектицидных токсинов Cry, Cyt и Vip, свой вклад в вирулентность вносят вторичные метаболиты *Bt*. Часть из них синергетически усиливают действие Cry-токсина в кишечнике насекомого, другие воздействуют на иммунную систему хозяина. Выбор определённой стратегии развития популяции *Bt* также связан с успехом в «гонке вооружений» между патогеном и хозяином. Это может быть стратегия ускоренного спорообразования или же переход в олиготрофное состояние, характеризующееся крайне медленным ростом. Стратегия дифференциации на субпопуляции повышает устойчивость всей популяции в целом к воздействию агрессивной среды хозяина. В этом случае, часть бактерий берет на себя энергозатратную продукцию факторов вирулентности для борьбы с хозяином, пожертвовав при этом спорообразованием, чтобы другая часть популяции могла сохраниться в виде спор. Деление на субпопуляции характеризуется дифференциальной экспрессией плеiotропных регуляторных генов, отвечающих за основные стадии жизненного цикла: вирулентную (PlcR), некротрофную (NprR) и спорообразующую (Spo0A), а также за экспрессию подмножества генов, необходимых для данной стадии развития. Глубокое изучение процессов дифференциации популяции, продукции факторов вирулентности в субпопуляциях, стратегии выживания бактерий в хозяевах, обладающих разной чувствительностью к *Bt*, поможет лучше понять систему вирулентности бактерий и использовать эти данные для повышения эффективности биопрепаратов.

В данной работе были показаны различия стратегий развития и дифференциальная экспрессия регуляторных генов и генов вирулентности (Cry-токсина, хитиназы, металлопротеазы, гемолизина, энтеротоксина, курстакина) в условиях роста *B. thuringiensis* в планктонной и колониальной популяции *in vitro* (ИПС), влияние стратегии развития *Bt* в разных популяциях на уровень смертности личинок *Galleria mellonella* при пероральном заражении. Так же, были проведены исследования *in vivo*. Показана дифференциальная экспрессия генов регуляторов и подконтрольных им факторов вирулентности бактерий *Bt*, развивающихся в погибших личинках чувствительной и резистентной линии *G. mellonella*. Выявлены различия в стратегиях выживания бактерий в погибшем хозяине разной чувствительности к *Bt*.

Исследование выполнено при финансовой поддержке гранта Российского научного фонда № 24-16-00113.

Рациональный дизайн высокоточных термостабильных ДНК-полимераз для биотехнологий

А. А. Кузнецова

Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, г. Новосибирск
электронная почта: sandra-k@niboch.nsc.ru

ДНК-полимеразы принимают участие в различных клеточных процессах, связанных с репликацией и рекомбинацией ДНК, а также в процессах репарации и поддержания целостности нуклеиновых кислот. Различия биологических функций этих ферментов связаны с клеточной локализацией, специфичностью к определенным структурам ДНК-матрицы, точностью и процессивностью. В настоящее время известны многие детали функционирования ДНК-полимераз, связанные с особенностями образования каталитического комплекса, специфическим узнаванием праймера и dNTP и каталитическими стадиями присоединения нуклеотида к «растущей» цепи.

Некоторые ДНК-полимеразы нашли применение в различных приложениях молекулярной биологии и биотехнологии для манипуляций с ДНК, включая клонирование, амплификацию ДНК, сайт-направленный мутагенез, секвенирование и другие. Однако эффективность этих ферментов может значительно уменьшаться в зависимости от таких факторов как происхождение/качество образца ДНК, длина матрицы, GC-содержание и способность формировать вторичные структуры, состав праймера и другие. Подобные ограничения при использовании известных в настоящее время ДНК-полимераз оставляют актуальной проблему поиска новых природных вариантов этих ферментов или создание ферментов с улучшенными свойствами методами рационального дизайна. Кроме того, в настоящее время ограничениями для развития ряда подходов генетических технологий являются скорость синтеза ДНК и точность ее воспроизведения. При этом, в некоторых случаях свойства природных ферментов уже не соответствуют современным требованиям, поэтому необходимо использовать подходы белковой инженерии для создания ферментов с улучшенными каталитическими свойствами.

В рамках данной работы была создана коллекция генов природных термостабильных ДНК-полимераз, на основе которой были получены мутантные, а также химерные варианты ферментов, несущие в своем составе белковые фрагменты из разных источников. Для ряда полученных ДНК-полимераз было показано увеличение точности ДНК синтеза и процессивности действия. Кроме того, была получена мутантная форма ДНК-полимеразы с измененными свойствами, способная проводить не только ДНК-зависимый ДНК синтез, но также РНК-зависимый ДНК синтез, то есть обладающая свойствами обратной транскриптазы.

Исследование выполнено при финансовой поддержке гранта Министерства науки и высшего образования РФ (соглашение № 075-15-2021-1085).

Клонирование гена тауматина и оценка экспрессии рекомбинантного белка, секретируемого генетически модифицированным организмом *Pichia pastoris*

А. К. Лейберова^{1,2*}, И. Г. Синельников³, Е. Г. Ковалева¹

¹Уральский Федеральный Университет им. первого Президента России Б. Н. Ельцина, г. Екатеринбург

²Институт иммунологии и физиологии УрО РАН, г. Екатеринбург

³Федеральное государственное учреждение «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук», г. Москва

*электронная почта: anna.leyberova@list.ru

Тауматин – сладкий на вкус белок. Тауматин – PR protein, накапливающийся в плодах западно-африканского растения *Thaumatococcus daniellii*. Тауматин вызывает ощущение сладости благодаря связыванию с рецептором human T1R2–T1R3 [1]. Тауматин слаще сахарозы в 100 000 раз [2]. Тауматин разрешен к получению и производству методом экстракции из растительного сырья [3]. Получение водной экстракцией растительного белка ограничено и затруднено. Получение рекомбинантного тауматина биотехнологическим способом является актуальной и более перспективной задачей [4,5].

Цель исследования: клонирование участка генома *T. daniellii*, кодирующего тауматин, получение трансформантов, клонов *P. pastoris*, содержащих рекомбинантную ДНК, и оценка экспрессии трансформантами рекомбинантного белка.

Ген тауматина из продуктов ПЦР, амплифицированных Taq-полимеразой, и вектор P_{rig} клонировали с использованием метода безлигазного клонирования. Для получения положительного результата предварительно были выполнены: выделение мРНК *T. daniellii*, дизайн и подбор праймеров, синтез кДНК, амплификации гена тауматина со специфическими праймерами. Рекомбинантную ДНК трансформировали в *E. coli*. Проводили скрининг колоний *E. coli* на наличие нужной вставки в плазмиде, отбор колоний трансформантов для наработки целевой плазмиды. Трансформировали плазмидную ДНК, содержащую ген тауматина, в *P. pastoris*. Проводили отбор трансформантов, клонов *P. pastoris*, содержащих рекомбинантную ДНК, устойчивых к селективному антибиотику – зеоцину. В итоге оценивали экспрессию белка тауматина трансформантами *P. pastoris*.

В результате работы были получены колонии *P. pastoris*, прошедшие трансформацию. Результаты скрининга трансформантов методом ПЦР на наличие вставки гена тауматина в их геноме, проверки аминокислотной последовательности секретируемых дрожжами белков молекулярной массой 25 кДа SDS-PAGE и масс-спектрометрического анализа подтверждают секрецию рекомбинантного белка тауматина в питательную среду ГМ *P. pastoris*.

Исследование выполнено при финансовой поддержке гранта Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (МЕГАГРАНТ, договор № 075–15–2022–1118 от 29.06.2022).

Ссылки:

1. Temussi P. A. // FEBS Lett. 2002. V. 526. P. 1-3.
2. van der Wel H. et al. // Eur. J. Biochem. 1972. V. 31. P. 221-225.
3. Younes M. et al. // EFSA J. 2021. V. 19, N. 11.
4. Daniell S. et al. // Food Chem. 2000. V. 71. P. 105-110.
5. Joseph J. A. et al. // Foods. 2022. V. 11, N. 10. P. 1438.

Создание рекомбинантных микобактериальных штаммов, экспрессирующих агонисты TLR

А. Ю. Маркова^{1,2*}, Л. Г. Кондратьева^{1,3}

¹Государственный научный центр РФ Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова РАН, г. Москва

²Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова, г. Москва

³Научно-исследовательский центр «Курчатовский институт», г. Москва

*электронная почта: ayumarkova@mail.ru

Известно, что вакцинация БЦЖ (Бацилла Кальмета-Герена, *Bacillus Calmette-Guerin*, BCG) способствует развитию как специфического иммунитета против микобактерий, так и "тренированного" врожденного иммунитета (ТИ), который характеризуется способностью сохранять и повышать неспецифическую иммунную реакцию на повторяющиеся патогенные воздействия. Усилить активацию ТИ можно за счет экспрессии на поверхности БЦЖ иммуностимуляторных молекул. Одними из основных рецепторов, распознающих сигналы от патогенов и активирующих врожденный иммунитет, являются Толл-подобные рецепторы (Toll-like receptors, TLR). Активация TLR приводит к продукции провоспалительных цитокинов. Целью работы стало получение модельных рекомбинантных микобактериальных штаммов, экспрессирующих агонисты TLR2 и TLR4 (HSPA14, HMGB и BCSP31) на поверхности клеток.

Лидерный пептид микобактериального гена Ag19 размеров 84 нт был получен амплификацией перекрывающихся праймеров методом ПЦР. Далее методом СРЕС (Circular Polymerase Extension Cloning) с использованием высокоточной Fusion полимеразы последовательность Ag19 клонировали в плазмиду pMV261, проводили трансформацию клеток *E. coli* и проводили отбор на среде с канамицином. Состав конструкции pMV261-Ag19 был подтвержден ПЦР-скринингом, рестриктивным анализом и секвенированием по методу Сэнгера.

Ген GFP был амплифицирован с использованием праймеров, содержащих сайт узнавания *Sall* на 5'-конце и последовательность FLAG на 3'-конце, и коммерческой плазмиды pEGFP-N1 в качестве матрицы. Вставку GFP-FLAG и вектор pMV261-Ag19 гидролизировали по *Sall* и *HpaI*, а затем лигировали в течение ночи при 16°C. Лигатом трансформировали клетки *E. coli* и проводили отбор на среде с канамицином. Состав полученной конструкции pMV261-Ag19-GFP-FLAG был подтвержден ПЦР-скринингом и секвенированием по методу Сэнгера.

Гены HSPA14, HMGB и BCSP31 были амплифицированы с помощью ПЦР с использованием праймеров, содержащих сайт узнавания *Sall* на 5'-конце и сайт *PsiI* на 3'-конце, и ранее полученных в лаборатории плазмид, кодирующих эти гены. Далее аналогично конструкции pMV261-Ag19-GFP-FLAG были получены плазмиды pMV261-Ag19-HSPA14-FLAG, pMV261-Ag19-HMGB-FLAG и pMV261-Ag19-BCSP31-FLAG и подтвержден их состав. Затем была проведена трансформация микобактерий *M. smegmatis* плазмидой pMV261-Ag19-GFP-FLAG, получены клоны, содержащие корректную плазмиду, получены лизаты клеток и протестированы с помощью вестерн блот анализа с использованием антител к эпитопу FLAG и GFP.

Работа проведена в рамках государственного задания НИЦ «Курчатовский институт», а также при финансовой поддержке гранта Российского научного фонда № 22-14-00308.

Изучение взаимодействия актинопорина Hct-S3 с модельными липидными мембранами

А. П. Павленко^{1*}, С. С. Ефимова², А. Н. Кветкина¹, Е. В. Лейченко¹, О. С. Остроумова²

¹Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г. Б. Елякова ДВО РАН, г. Владивосток

²Институт цитологии РАН, г. Санкт-Петербург

*электронная почта: apavlenko141@gmail.com

Актинопорины – цитолитические полипептиды, которые содержатся в ядовитом секрете морских анемонов, животных типа Стрекающие. Одной из структурно-функциональных особенностей актинопоринов является наличие фосфохолин-связывающего сайта, способного распознавать как фосфатидилхолин (ФХ), так и сфингомиелин (СМ) клеточной мембраны, однако актинопорины распознают СМ более специфично, чем ФХ [1]. После связывания с мембраной актинопорины образуют поры, что приводит к неконтролируемому осмосу, набуханию и гибели клеток. Актинопорин Hct S3 морской анемоны *Heteractis magnifica* (ранее *H. crispa*) обладает цитотоксической активностью в отношении различных опухолевых клеточных линий, а также эффективной антимиграционной активностью в отношении клеток аденокарциномы кишечника HT-29, что делает его перспективным противоопухолевым соединением [2]. Дальнейшее изучение механизма взаимодействия актинопоринов с мембранами различного состава является актуальной задачей.

В работе исследована способность актинопорина Hct-S3 формировать ионные каналы в плоских липидных мембранах, сформированных из эквимольной смеси фосфолипидов: сфингомиелин:холестерин. Среди фосфолипидов протестированы нейтральные (диолеилфосфатидилхолин (ДОФХ) и диолеилфосфатидилэтаноламин (ДОФЭ)) и отрицательно заряженные (диолеилфосфатидилсерин (ДОФС) и диолеилфосфатидилглицерин (ДОФГ)) липиды. Обнаружено, что Hct-S3 формирует ион-проницаемые поры в липидных мембранах различного состава и минимальная концентрация, при которой эта активность наблюдается, увеличивается в ряду: ДОФХ $\approx$ ДОФЭ (около 4 нг/мл) $\leq$ ДОФС (около 7 нг/мл) $\ll$ ДОФГ (около 55 нг/мл). Рост концентрации Hct-S3 вызывает дозо-зависимое увеличение актинопорин-индуцированного тока, что позволило установить, что четыре молекулы Hct-S3 участвуют в образовании пор в бислоях. Полученные результаты позволяют заключить, что фосфолипидная составляющая мембраны не сказывается на процессе порообразования Hct-S3. Можно думать, что при наличии в составе бислоя СМ и холестерина образуются упорядоченные домены, которые и играют решающую роль в способности Hct-S3 формировать пору.

Для выяснения роли свойств мембраны, регулирующих порообразующую активность Hct-S3, добавляли к мембранам модификаторы физико-химических свойств бислоев. Показано, что добавление флоретина, снижающего дипольный потенциал липидных мембран, практически не влияло на порообразующую активность Hct-S3. Добавление стирилпиридинового красителя RH 421, увеличивающего дипольный потенциал бислоев, и олеиновой кислоты, индуцирующей отрицательную кривизну, незначительно увеличивало и уменьшало порообразующую активность, соответственно. Добавка в мембраноомывающий раствор лизофосфатидилхолина, который индуцирует положительную кривизну, вызывало увеличение порообразующей активности Hct-S3 в 2-5 раз в зависимости от фосфолипидного состава мембраны. Обсуждается роль спонтанной кривизны в порообразующей активности актинопорина.

Ссылки:

1. García-Linares S. *et al.* // Advances in Biomembr. and Lipid Self-Assembly. 2017. V. 26. P. 51-97.
2. Kvetkina A. *et al.* // Molecules. 2020. V. 25, N. 5979. P. 1-13.

Влияние мутаций в активном центре магнификамида на эффективность ингибирования свиной панкреатической α -амилазы

Д. В. Попкова^{1*}, А. С. Меньшов¹, О. В. Синцова¹, Н. А. Бороздина^{2,3}, И. А. Дьяченко^{2,3},
И. Н. Гладких¹, Е. В. Лейченко¹

¹Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г. Б. Елякова ДВО РАН, г. Владивосток

²Филиал Государственного научного центра РФ Института биоорганической химии
им. академиков М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова РАН, г. Пущино

³Пушинский филиал ФГБОУ ВО Российского биотехнологического университета
(РОСБИОТЕХ), г. Пущино

*электронная почта: daria.vladipo@yandex.ru

К настоящему времени сахарный диабет занимает ведущие позиции в рейтингах самых тяжелых и быстро распространяющихся заболеваний человека, и часто связывается с высоким уровнем смертности в связи с повышенным риском развития осложнений со стороны всех систем органов. В дополнение к этому, современные лекарственные препараты, используемые для терапии данного метаболического расстройства, обуславливают появление целого ряда побочных эффектов, что в совокупности делает сахарный диабет заболеванием, трудно поддающимся лечению и занимающим одно из первых мест среди причин инвалидизации населения. По этой причине поиск новых источников биологически активных соединений, оказывающих влияние на участвующие в углеводном обмене мишени является актуальной биомедицинской задачей [1]. Пептидные ингибиторы α -амилаз, магнификамиды, выделенные из морской анемоны *Heteractis magnifica*, показали высокую биологическую активность в *in vitro* и *in vivo* исследованиях: константы ингибирования (K_i) магнификамида-2 по отношению к свиной и человеческой панкреатическим α -амилазам находятся в пределах 20-70 пмоль, а эффективная доза в *in vivo* моделях сахарного диабета 1 и 2 типов составляет 0,005 мг/кг, что в сочетании с устойчивостью к широкому диапазону значений pH, а также действием гидролитических ферментов и повышенных температур делает пептиды перспективными кандидатами для создания на их основе эффективных селективных антидиабетических препаратов с возможностью перорального введения [2,3].

С применением методов молекулярного моделирования и сайт-направленного мутагенеза было предсказано шесть мутантных аналогов магнификамидов и получены соответствующие мутантные плазмиды с целью выявления структурных детерминант, ответственных за селективность и высокую активность ингибиторов. В результате оптимизации условий экспрессии и выделения мутантные пептиды были получены в количестве 3,3–5 мг с литра клеточной культуры *Escherichia coli* штамма SHuffle[®]. Константы ингибирования мутантными аналогами панкреатической α -амилазы свиньи определяли с использованием хромогенного субстрата CNP-G3 по уравнению Моррисона для конкурентных прочно-связывающихся ингибиторов. В сравнении с нативным и рекомбинантным магнификамидом-2 K_i мутантных пептидов оказались на порядок выше, что позволяет сделать вывод о значительном вкладе в эффективность ингибирования фермента гидрофобных контактов между реактивным сайтом ингибитора и аминокислотными остатками вокруг активного центра α -амилазы.

Исследование выполнено при финансовой поддержке гранта Российского научного фонда № 21-74-20147.

Ссылки:

1. Lin X. *et al.* // Sci Rep.. 2020. V. 10, N. 1. P. 14790-14800.
2. Sintsova *et al.* // Mar. Drugs. 2019. V. 17, N. 10. P. 542-556.
3. Sintsova *et al.* // Biomed Pharmacother. 2023. V. 168, P. 115743.

**Мембранно-активные антимикробные пептиды растений - перспективные соединения
для биомедицины и агrobiотехнологий**

Е. А. Рогожин^{1,2*}, И. М. Михель^{2,3}, А. С. Барашкова^{1,2}

¹Государственный научный центр РФ Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина
и Ю. А. Овчинникова РАН, г. Москва

²Всероссийский научно-исследовательский институт защиты растений,
г. Санкт-Петербург-Пушкин

³Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии,
г. Москва

*электронная почта: rea21@list.ru

Направленный поиск новых антимикробных соединений для нужд медицины, ветеринарии и сельского хозяйства является крайне актуальным ввиду снижения чувствительности патогенных микроорганизмов (бактерий, грибов) к используемым антибиотическим соединениям, в том числе применяемым в составе комплексной терапии. Антимикробные вещества пептидной природы обладают рядом потенциальных преимуществ по сравнению природными малыми молекулами: так, они подавляют резистентные формы микроорганизмов (в том числе мультирезистентные); как правило, обладают пролонгированным защитным действием; не образуют токсичных производных и в конечном итоге способны к протеолизу до одиночных аминокислот, которые в дальнейшем включаются в метаболизм организма-реципиента. Пожалуй, одним из возможных негативных моментов может являться формирование индуцированной устойчивости организмов-мишеней к действию таких молекул, однако она определяется реализацией основного механизма действия антимикробного агента, который достигается в наибольшей действующей концентрации [1]. Мембранно-активные (мембрано-ассоциированные) антимикробные пептиды растений представляют собой ген-кодируемые молекулы, которые, как правило, стабилизированы дисульфидными связями и таким образом формируют в пространстве относительно компактные глобулярные структуры, которые образуют так называемые биоактивные поверхности (патчи) [2]. Такие патчи независимо друг от друга обладают катионными и гидрофобными свойствами, что определяет их селективное первичное взаимодействие с определенными фосфолипидными компонентами цитоплазматических мембран бактериальных и грибных клеток. Такая интеграция в больших действующих концентрациях приводит к необратимому повреждению клеточной мембраны, вытеканию жизненно важных метаболитов из клетки и в конечном итоге ее гибель. При меньших концентрационных нагрузках – наиболее вероятен механизм, связанный с дальнейшей интернализацией пептидов во внутриклеточное пространство, взаимодействие со специфическими или неспецифическими рецепторами, что влечет за собой запуск серии каскадов, приводящих к апоптозу [3,4].

Исследование выполнено при финансовой поддержке гранта Российского научного фонда (проект № 19-76-30005-П).

Ссылки:

1. Poshvina D. V. *et al.* // Front. Microbiol. 2022. V. 13. E. 963979.
2. Tam J. P. *et al.* // Pharmaceuticals (Basel). 2015. V. 8. N 4. P. 711-57.
3. de Veer S. J. *et al.* // Chem. Rev. 2019. V. 119. N 24. P. 12375-12421.
4. Srivastava S. *et al.* // Phytother. Res. 2021. V. 35. N 1. P. 256-277.

Иммуногистохимическая оценка головного мозга у мышей с таупатией при применении синтетического агониста эритропоэтина

Ю. В. Степенко

Белгородский государственный национальный исследовательский университет, г. Белгород
электронная почта: stepenko@bsu.edu.ru

Основными нейродегенеративными заболеваниями ЦНС являются: болезнь Альцгеймера (БА), болезнь Паркинсона (БП), лобно-височная деменция (ЛВД), прогрессирующий надъядерный паралич (ПНП), болезнь Хантингтона (БХ), характеризующиеся дисфункцией и гибелью нейронов, глияльными реакциями, которые запускают каскад воспалительных реакций в пораженных областях головного мозга [1]. Вышеперечисленные нейродегенеративные заболевания (НЗ) в конечном счете, приводят к снижению качества жизни, ограничивают трудоспособность населения и с каждым годом наносят все больший ущерб по социально-экономической сфере страны. На данный момент в системе здравоохранения эффективного этиотропного лечения не существует, что указывает на актуальность проблемы. В связи с этим перспективными стратегиями фармакотерапии выступает поиск эффективных и безопасных терапевтических средств направленных на мишени патогенетических звеньев [2].

Цель исследования – произвести иммуногистохимическую оценку головного мозга у мышей с таупатией при применении синтетического агониста эритропоэтина.

Для анализа иммуногистохимии производилась оценка конфокальных проекционных изображений, полученных из срезов ГМ с иммуноокрашиванием нейронов AT-8 (Phospho-Tau Ser202, Thr205) из области соматосенсорного неокортекса лобной доли и область ствола головного мозга следующих групп: отрицательный контроль (мыши фоновой дикой линии C57Bl/6J); положительный контроль (мыши трансгенной линии P301S); экспериментальная группа мышей P301S, получающих фармакокоррекцию ARA-290 и группа сравнения, мыши трансгенной линии P301S, получающие фармакокоррекцию пирацетамом. Все животные 24-х недельного возраста, по полученным результатам можно сделать следующие выводы: в экспериментальной группе мышей P301S, получавшие фармакокоррекцию ARA-290, общее количество нейронов с иммуноокрашиванием AT-8 ($n=19,6\pm5,21$) в коре лобной доли, почти в 18 раз меньше, чем в группе положительного контроля ($n=345,4\pm218,37$). При оценке зоны ствола головного мозга в экспериментальной группе мышей P301S, получавшие фармакокоррекцию ARA-290, общее количество нейронов с иммуноокрашиванием AT-8 составляло $1,3\pm1,16$, что почти в 8 раз меньше, чем в группе положительного контроля ($n=11,5\pm7,26$). В то же время, в группе сравнения мышей P301S, получавшие фармакокоррекцию Пирацетамом количество иммунопозитивных нейронов в стволе головного мозга составляло $6,3\pm2,54$, что в 2 раза меньше по сравнению с группой положительного контроля. Площадью для оценки общего количества иммуноокрашенных нейронов AT-8 выбрана область ствола головного мозга равной 2300 мкм^2 , статистическая достоверность определялась согласно тесту Крускала-Уоллиса ($p<0,0001$).

Выводы: иммуногистохимический анализ подтверждают сохранение архитектоники нейрональной ткани ГМ и сниженное количество иммунопозитивных нейронов с гиперфосфорилированным тау-белком при применении синтетического агониста эритропоэтина.

Работа с животными была поддержана грантом МИНОБРНАУКИ России (соглашение № 075-15-2021-1346). Разработка автоматизированной системы проводилась при финансовой поддержке государственного задания лаборатории генетических технологий и геномного редактирования для биомедицины и ветеринарии (FZWG-2024-0003).

Ссылки:

1. Bergen von M. *et al.* // J. Biol. Chem. 2001. V. 276, N. 51. P. 48165-48174.
2. Bah T. M. *et al.* // Neurotherapeutics. 2019. V. 16, N. 3. P. 554-568.

Ингибиторы тирозил-ДНК-фосфодиэстеразы 1 на базе липофильных производных нуклеозидов как сенситизаторы топотекана *in vitro* и *in vivo*

И. А. Чернышова^{1*}, Т. Е. Корниенко¹, Н. С. Дырхеева¹, А. Л. Захаренко¹, М. С. Дреничев²,
О. И. Лаврик¹

¹Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, г. Новосибирск

²Институт молекулярной биологии им. В. А. Энгельгарда РАН, г. Москва

*электронная почта: chernyshova0305@gmail.com

Топотекан (Трс) – ингибитор топоизомеразы 1 (Тор1) из группы камптотецинов, применяющийся в клинической практике для лечения рака шейки матки, яичников [1] и мелкоклеточного рака легкого [2]. Трс стабилизирует ковалентные комплексы Тор1-ДНК, что приводит к гибели опухолевых клеток из-за накопления повреждений ДНК [3]. Противоопухолевому действию Трс может препятствовать фермент тирозил-ДНК фосфодиэстераза 1 (Тдр1), который напрямую гидролизует ковалентную связь между Тор1 и ДНК [4]. Поэтому применение ингибиторов Тдр1 совместно с Трс является перспективной стратегией для повышения эффективности Трс.

Поиск ингибиторов Тдр1 проводился среди серии липофильных производных нуклеозидов путем изучения активности рекомбинантного фермента в присутствии исследуемых соединений. В ходе работы обнаружен ряд соединений, ингибирующих Тдр1 со значением IC₅₀ от 0,18 до 6 мкМ. Методом МТТ было показано, что исследуемые соединения не цитотоксичны для перевиваемых культур клеток в концентрациях до 100 мкМ, а также способны усиливать действие Трс на клетки HeLa и A549. В ходе изучения влияния Трс, ингибитора Тдр1 (577) и их комбинации на линиях клеток A549 Тдр1^{-/-} было показано, что при отсутствии Тдр1 усиления действия Трс при сочетанном применении с 577 не наблюдается. Это может свидетельствовать о том, что усиление действия Трс на клетках дикого типа происходит за счет ингибирования Тдр1. При применении комбинации Трс и ингибиторов Тдр1, исходя из механизма действия этих соединений, может наблюдаться увеличение уровня повреждений ДНК. Одновременная обработка клеток HeLa Трс и 577 привело к увеличению уровня повреждений ДНК в сравнении с использованием только Трс в методе Alkaline Comet assay [5]. В экспериментах на моделях опухолей мышей (карцинома Кребс-2 и лимфома RLS) было показано достоверное снижение массы опухолей и числа метастазов при лечении животных комбинацией Трс и соединения 577 по сравнению с Трс в монорежиме.

Таким образом, нами было обнаружено нетоксичное соединение класса липофильных нуклеозидов, которое способно сенситизировать опухолевые клетки к действию Трс как *in vitro*, так и *in vivo*, что делает его многообещающим кандидатом для проведения дальнейших исследований.

Исследование выполнено при финансовой поддержке гранта Российского научного фонда № 23-74-01078.

Ссылки:

1. Lorusso D. *et al.* // Critical reviews in oncology/hematology. 2010 V. 74, N. 3. P. 163-174.
2. O'Brien M. *et al.* // The Oncologist. 2007. V. 12, N. 10. P. 1194-1204.
3. Pommier Y. *et al.* // Reviews Drug Discovery. 2012. V. 11, N. 1. P. 25-36.
4. Pommier Y. *et al.* // DNA repair. 2014. V. 19. P. 114-129.
5. Chernyshova I. A. *et al.* // Molecules. 2022. V. 28, N. 1. P. 323.

ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКАЯ БИОЛОГИЯ И БИОТЕХНОЛОГИЯ: ПРИРОДНЫЕ БИОАКТИВНЫЕ СОЕДИНЕНИЯ

Влияние метилжасмоната и салициловой кислоты на эмбриональное развитие морских ежей *Strongylocentrotus intermedius* и экспрессию генов биосинтеза их нафтохиноидных пигментов

Н. В. Агеенко^{1*}, К. В. Киселев²

¹Национальный научный центр морской биологии им. А. В. Жирмунского ДВО РАН,
г. Владивосток

²Федеральный научный центр биоразнообразия наземной биоты Восточной Азии ДВО РАН,
г. Владивосток

*электронная почта: natkupra@mail.ru

В последнее десятилетие из морских организмов было выделено и описано более 5000 новых химических соединений, обладающих высоким фармакологическим потенциалом. Особый интерес среди данных организмов представляют губки, иглокожие, моллюски и другие морские беспозвоночные, которые представляют собой источник ценных биологически активных веществ (БАВ). Морские ежи, в частности *Scaphechinus mirabilis* и *Strongylocentrotus intermedius* содержат окрашенные пигментные хиноидные соединения - производные 1,4-нафтохинона. Состав производных 1,4-нафтохинонов морских ежей разнообразен и содержит – эхинохром А (2,3,5,6,8-пентагидрокси-7-этил-1,4-нафтохинон), различные спинохромы (А-Е), аминированные спинохромы, метоксипроизводные спинохромов, бинафтохиноны, производные нафтазарина, спиназарин, сульфатированные производные спинохромов В и Е, этилспиназарин, эхинамины А и В. Пигменты иглокожих образуют новый класс высокоэффективных антиоксидантов фенольного типа, проявляющих высокую альгицидную, бактерицидную и гипотоническую активность. Важным направлением в сфере сохранения биоразнообразия является разработка технологии промышленного культивирования клеток этих животных с целью получения БАВ. Продукция БАВ *in vitro* может стать альтернативной химическому синтезу или аквакультуре.

Настоящее исследование является продолжением серии работ по изучению влияния экзогенных факторов на эмбриональное развитие морских ежей *S. intermedius*, а также на уровень экспрессии специфических генов биосинтеза нафтохиноидных соединений (*pks* и *sult*), участвующих в дифференцировке пигментных клеток морских ежей.

Впервые исследовано воздействие метилжасмоната (простой эфир жасмоновой кислоты, активирующей многие гены защитной системы растений и животных) и салициловой кислоты (2-гидроксibenзойная кислота, участвующая в биосинтезе сложных структур алкалоидов растений и морских организмов) на эмбриональное развитие морских ежей *S. intermedius*. Получены экстракты нафтохиноновых пигментов из эмбрионов и личинок морских ежей *S. intermedius* на стадиях мезенхимной бластулы и гастролы после воздействия на них растворов метилжасмоната и салициловой кислоты (50 и 200 мкМ). Методом ВЭЖХ проведен анализ качественного и количественного составов этих пигментов. Методом количественной ПЦР в реальном времени (кПЦР-РВ) изучена экспрессия генов поликетидсинтазы (*pks*) и сульфотрансферазы (*sult*), необходимых для биосинтеза нафтохиноидных пигментов, в эмбрионах и личинках серого морского ежа *S. intermedius* после инкубации с метилжасмонатом и салициловой кислотой. Наибольший уровень экспрессии генов *pks* и *sult* у обработанных эмбрионов и личинок морских ежей *S. intermedius* наблюдался на стадиях бластулы и гастролы.

Полученные данные расширяют информацию о биологии нафтохиноидных пигментов морских ежей, путях их биосинтеза и возможности разработки технологии промышленного культивирования клеток этих животных.

Исследование новых производных берберина в качестве ингибиторов нейраминидазы вируса гриппа А (H1N1) *in silico* и *in vitro*

Ф. Ф. Амирджанов*, А. Д. Загребаев, К. А. Онасенко
Южный федеральный университет, г. Ростов-на-Дону
*электронная почта: amirdzhanov@srfedu.ru

Берберин (**BBR**) – изохинолиновый алкалоид, содержащийся в корнях кустарников семейства *Berberidaceae* и обладающий широким спектром фармакологических свойств [1]. Ранее было показано, что берберин способен ингибировать репликацию вируса гриппа А [2], поэтому мы решили исследовать на предмет противовирусной активности его синтетические производные (рисунок 1).

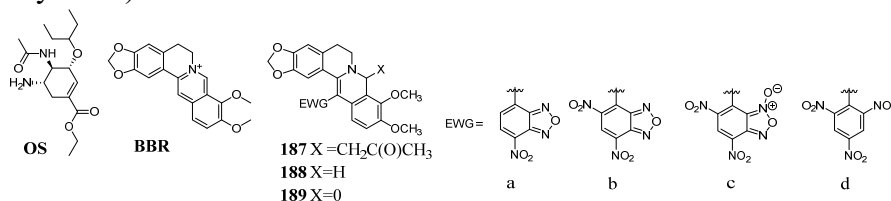


Рисунок 1 – Структуры исследуемых соединений

В данной работе нами был проведён молекулярный докинг соединений **BBR**, **OS** (осельтамивир), **187a–187d**, **188a–188d**, **189a** и **189c** с активным центром нейраминидазы вируса гриппа H1N1 (NA) (PDB ID: 1BJL) с использованием AutoDock Vina. Для подтверждения данных эксперимента *in silico* мы исследовали берберин и его производные *in vitro* на предмет его противовирусной активности против штамма A/Puerto Rico/8/34 H1N1 с использованием клеток MDCK. По результатам исследования *in silico*, берберин и его производные обладают наибольшим сродством к нейраминидазе (–7,7 – –9,5 ккал/моль), по сравнению с осельтамивиром (–6,5 ккал/моль), а по данным эксперимента *in vitro*, соединение **187a** (индекс селективности SI, полученный из отношения CC_{50}/IC_{50} , составил 30) продемонстрировало наибольшую активность относительно его аналогов и исходного **BBR** (таблица 1).

Таблица 1 – Противовирусная активность исследуемых соединений

	187A	187B	187C	187D	188A	188B	188C	188D	189A	189C	BBR	OS
CC_{50} , $\mu\text{g/mL}$	300.0	280.0	40.0	11.5	114.0	7.4	115	11.5	44	9.3	70.22	156.1
IC_{50} , $\mu\text{g/mL}$	9.9	20.3	20.0	2	9.7	3	50	2	8.3	2	31.35	3.19
SI	30	14	2	6	12	2	2	6	5	5	2.2	49
Binding affinity, kcal/mol	–8.4	–9.2	–8.6	–7.7	–9.5	–9.3	–8.6	–8.5	–9.5	–9.2	–7.7	–6.5

Согласно полученным в ходе исследования данным, соединение **187a** является перспективным препаратом против вируса гриппа А ввиду его высокой аффинности к активному центру нейраминидазы и высокого индекса селективности.

Ссылки:

1. Singh S. *et al.* // European Journal of Medicinal Chemistry. 2021. V. 226, P. 113839.
2. Warowicka A. *et al.* // Archives of Virology. 2020. V. 165, P. 1935-1945.

Новые зостеропениллины и паллидопениллины из морского микроскопического гриба
Penicillium yezoense KMM 4679

Г. В. Боркунов^{1,2*}, Н. П. Шлык^{1,2}, Е. А. Чингизова¹, Е. В. Лещенко^{1,2}

¹Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г. Б. Елякова ДВО РАН, г. Владивосток

²Дальневосточный федеральный университет, г. Владивосток

*электронная почта: gborkunov@gmail.com

Грибы рода *Penicillium* являются продуцентами вторичных метаболитов, относящихся к поликетидам, терпеноидам, меротерпеноидам, алкалоидам и др [1]. Эти соединения проявляют широкий спектр биологической активности, включая антибактериальную и противоопухолевую. В нашем исследовании по поиску продуцентов новых биологически активных соединений мы исследовали грибной штамм *Penicillium yezoense* KMM 4679, ассоциированный с морской травой *Zostera marina*. В результате разделения этилацетатного экстракта гриба различными хроматографическими методами было выделено 10 новых поликетидов декалинового типа зостеропениллин М (1), 11-эпи-8-гидроксизостеропениллин М (2), зостеропениллин N (3), 8-гидроксизостеропениллин G (4), зостеропениллин O (5), зостеропениллин P (6), зостеропениллин Q (7), 13-дегидрокси паллидопениллин A (8), зостеропениллин R (9) и зостеропениллин S (10) (рисунок 1), а также известные зостеропениллины G (11) и J (12), паллидопениллин A (13) и 1-ацетилпаллидопениллин A (14) [2,3].

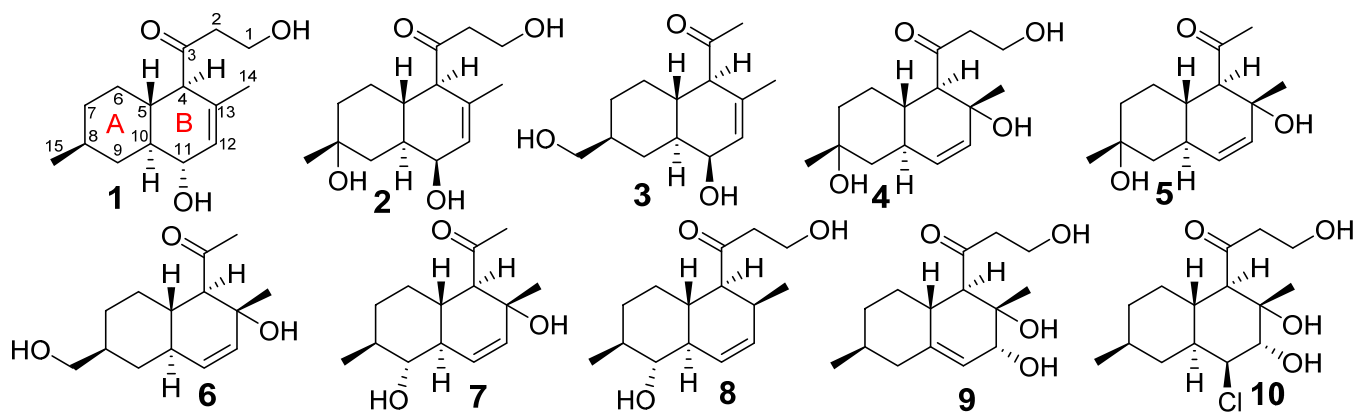


Рисунок 1 – Структуры новых выделенных соединений

Химические структуры выделенных соединений 1–14 были установлены при помощи одно- и двумерной ЯМР спектроскопии и масс-спектрометрии высокого разрешения.

Показано слабое ингибирование роста грамположительных бактерий *Staphylococcus aureus* соединениями 1, 6–14 и дрожжеподобных грибов *Candida albicans* соединениями 1–7, 9, 11, 12 в концентрации 100 мкМ. Соединение 14 значительно ингибировало образование колоний клетками линий РС-3, HeLa и MCF-7 со значениями ИК₅₀ = 2.48, 0.96 и 0.66 мкМ соответственно, при отсутствии токсичности в отношении нормальных клеток НЕК-298. Также установлено, что 14 может усиливать действие доксорубина в отношении РС-3, HeLa и MCF-7 клеток.

Исследование выполнено при финансовой поддержке гранта Российского научного фонда № 22-73-00190.

Ссылки:

1. Carroll A. R. *et al.* // Nat Prod Rep, 2024. V. 41. P. 162–207.
2. Afyatulloev S. S. *et al.* // Mar. Drugs 2017. V. 15. P. 46.
3. Sobolevskaya M. P. *et al.* // J. Nat. Prod. 2016. V. 79. P. 3038.

Оценка генотоксических свойств трутовых грибов на примере *Drosophila melanogaster*

А.-В. В. Василевская*, О. Н. Антосюк, А. А. Ермошин

Уральский федеральный университет имени первого Президента России Б. Н. Ельцина,
г. Екатеринбург

* электронная почта: Anejelika.v@gmail.com

Трутовые грибы весьма разнообразная группа грибов – представителей класса *Basidiomycetes*, порядка *Aphyllorphorales*. В ходе своего жизненного цикла трутовые грибы выделяют ферменты, антибиотики, онкостатики, пигменты, стеролы, глюканы и другие биологически активные вещества в связи с чем, ведутся перспективные исследования в рамках этой группы грибов [1].

Определение генетической активности экстрактов трутовых грибов в отношении интенсивности повреждения ДНК является неотъемлемой частью доклинических исследований. В качестве одного из методов оценки повреждения ДНК применяется метод ДНК-комет, используемый для различных типов клеток, как в культуре, так и в образцах биологических жидкостей и тканей. В настоящее время этот метод находит применение в различных сферах – исследования генотоксического действия химических веществ (в том числе и фармацевтических препаратов), репарации ДНК, апоптоза и клинических исследованиях.

Целью данного исследования была оценка степени повреждения ДНК на разных этапах развития дрозофилы, выращенных на пяти субстратах трутовых грибов (*P. betulinus*, *F. pinicola*, *F. fomentarius*, *G. applanatum*, *I. obliquus*) с концентрацией в среде – 0,5 % относительно экстракта.

У вышеперечисленных групп грибов оценивали генотоксичность в отношении повреждения ДНК на следующих уровнях развития дрозофилы: эмбриональном, личиночном, стадии куколки и имаго. Выявили, что все стадии чувствительнее к внесению экстрактов трутовых грибов, чем стадия эмбриогенеза. Экстракты *G. applanatum* и *I. obliquus* обладают генотоксическим потенциалом. Полученные данные позволяют предположить, что негативное воздействие может быть связано с высокой пролиферацией клеток после эмбрионального этапа, что согласуется с литературными данными [2]. Таким образом, данные экстракты трутовых грибов являются перспективным источником сырья для разработки противоопухолевых препаратов.

Ссылки:

1. Корсун В. Ф. и др. / Противоопухолевые свойства грибов. М. 2012.
2. Raal A. *et al.* // Preprints. 2024. 2024050419.

**Онколитический вирус VV-GMCSF-Lact: особенности действия и разработка подходов
терапии глиом**

Н. С. Васильева*, А. Б. Агеев, А. А. Бывакина, В. А. Рихтер, Е. В. Кулигина
Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, г. Новосибирск
*электронная почта: nataly_vas@bk.ru

Сложность лечения опухолей головного мозга обусловлена их расположением в жизненно важных областях мозга, гетерогенностью, а также быстрым прогрессированием и устойчивостью к стандартным терапевтическим средствам. На сегодняшний день одним из наиболее перспективных и активно развивающихся терапевтических подходов является виротерапия, или терапия с помощью онколитических вирусов. Виротерапия представляет собой иммунотерапевтический подход, основанный на вирус-опосредованной гибели опухолевых клеток и индукции иммунного ответа организма.

Ранее был разработан рекомбинантный вирус осповакцины VV-GMCSF-Lact, который на данный момент находится на I фазе клинических испытаний в отношении рака молочной железы и является перспективным препаратом для терапии глиом. VV-GMCSF-Lact имеет делеции фрагментов генов вирусных тимидинкиназы и ростового фактора, в районы которых встроены ген гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора человека и ген онкотоксического белка лактапина. Делеция тимидинкиназы и вирусного ростового фактора делает возможной селективную репликацию вируса в опухолевых клетках. Мы показали, что VV-GMCSF-Lact обладает высокой цитотоксической активностью в отношении клеток глиом человека различной степени злокачественности. Кроме того, вирус селективно реплицируется в опухолевой ткани и эффективен в отношении ксенографтов глиобластом человека как в режиме монотерапии, так и в комбинации с химиотерапевтическими препаратами. При внутриопухолевом введении иммунокомпетентным крысам с ортотопически трансплантированной глиомой C6 VV-GMCSF-Lact оказывает антипролиферативное действие на опухоль и препятствует формированию метастазов.

Трансген ГМ-КСФ, секретируемый опухолевыми клетками в процессе вирусной инфекции, индуцирует дополнительный противоопухолевый иммунный ответ. Лактапин, в свою очередь, является индуктором апоптоза опухолевых клеток по митохондриальному пути. Показано, что в клетках глиом, более устойчивых к действию VV-GMCSF-Lact, снижается уровень белка p53 и повышается уровень белков-ингибиторов апоптоза: активированной киназы Akt1 и белка XIAP, ингибиторы которых могут быть использованы для терапии глиом в комбинации с VV-GMCSF-Lact.

Таким образом, VV-GMCSF-Lact является перспективным иммунотерапевтическим агентом для терапии глиом. Полученные результаты могут стать основой для разработки схем эффективной терапии глиом с помощью VV-GMCSF-Lact в дальнейших клинических испытаниях.

Исследование выполнено при финансовой поддержке гранта Российского научного фонда № 24-14-00390.

Природные *mcl*-полигидроксиалканоатов в получении гибридных полимер-липидных наночастиц

А. П. Воротнева^{1*}, И. Н. Зубков^{1,2}, С. М. Шишлянников^{1,2}

¹Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого, г. Санкт-Петербург

²НИИ группа им. А. А. Смородинцева, г. Санкт-Петербург

*электронная почта: vorotneva.ap@edu.spbstu.ru

Многообещающим подходом для решения задач внутриклеточной доставки является использование невирусных носителей. Среди таких носителей полимер-липидные наночастицы (ПЛН) привлекли значительное внимание благодаря сочетанию преимуществ как липидных, так и полимерных систем. ПЛН обладают высокой биосовместимостью и стабильностью, низкой полидисперсностью, а также эффективно инкапсулируют как гидрофильные, так и гидрофобные молекулы.

Полигидроксиалканоаты (ПГА) – алифатические полиэфиры, синтезируемые микроорганизмами в условиях недостатка различных элементов, в основном азота и фосфора. По длине углеродной цепи радикала в мономере выделяют короткоцепочечные (*scI*), среднецепочечные (*mcl*) и длинноцепочечные (*lcl*) ПГА. *mcl*-ПГА обладают высокой биосовместимостью, распадаются с образованием нетоксичных продуктов и полностью выводятся из организма. Гибридные наночастицы, образованные ПГА и липидами состоят из полимерного ядра, окруженного одним или несколькими липидными слоями. Вероятно, высокая стабильность такой частицы обусловлена минимальным содержанием воды в гидрофобном ядре, в отличие от липосомы, что снижает вероятность ее разрушения под действием осмотического давления в биологических жидкостях.

В настоящей работе ПГА были выделенные из *Pseudomonas helmanticensis*, которые культивировались на среде с низким содержанием азота. Ранее установлено, что *P. helmanticensis* продуцируют *mcl*-ПГА [1]. Частицы были получены методом ультразвукового диспергирования ПГА со смесью липидов 2x3 и DOPE в водно-органической среде (рис. 1) и проанализированы методом динамического рассеяния света. Показано, что данные частицы имеют средний размер 230 ± 100 нм, электрокинетический потенциал $+50 \pm 10$ мВ и индекс полидисперсности $0,3 \pm 0,1$.

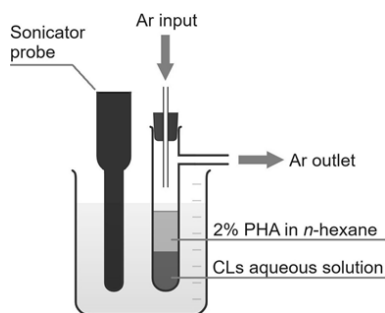


Рисунок 1 – Реактор для получения

Исследование поддержано грантом РФФ № 23-25-00165.

Ссылки:

1. Kondratyev V. et al. // INT J POLYM ANAL CH. 2021. V. 27, N. 1. P. 32–42.

**Установление молекулярных мишеней биологически активных молекул методом
электрофизиологии на клетках млекопитающих**

П. А. Галенко-Ярошевский¹, Д. И. Осмаков², Б. А. Трофимов³, М. М. Шаматова²,
К. К. Евланенков⁴, С. А. Козлов^{2*}

¹Кубанский государственный медицинский университет, г. Краснодар

²Институт биоорганической химии им. академиков М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова
РАН, г. Москва

³Иркутский институт химии им. А. Е. Фаворского СО РАН, г. Иркутск

⁴Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И. М. Сеченова, г. Санкт-Петербург
*электронная почта: serg@ibch.ru

Сегодня для установления активности биологически активных соединений (БАС) на уровне межмолекулярных взаимодействий невозможно обойтись без непосредственных экспериментальных данных. Популярная сегодня вычислительная биология, включающая методы молекулярной динамики и искусственного интеллекта, умеет делать предсказания активности, однако эти прогнозы серьезно не рассматриваются без окончательного подтверждения числовыми данными в экспериментальной биохимии. Для изучения важных клеточных мишеней, таких как ионные каналы, наиболее понятные для последующей интерпретации данные удобно получать методами электрофизиологии на отдельных клетках или на препаратах из модельных животных. Для точного установления мишени БАС более выгодно использовать клетки с гетерологической экспрессией рецепторов или ионных каналов. В своей работе мы использовали клетки млекопитающих, экспрессирующих отдельные ключевые ионные каналы болевого каскада. К ним относятся, в частности, неселективные катионные каналы семейства TRP (Transient Receptor Potential), а также протон-чувствительные ионные каналы (ASIC). Ингибиторы или частичные агонисты этих ионных каналов – перспективные кандидаты для купирования боли альтернативными путями, а их комбинация, например, с опиоидными анальгетиками поможет решить основные проблемы использования этого класса обезболивающих препаратов в медицине. Для ряда молекул, присутствующих на рынке как лекарственные средства, была обнаружена способность их воздействия на кислото-чувствительные ионные каналы. Это предполагает, в том числе, возможность расширения нозологии применения таких препаратов в будущем.

Исследование выполнено при финансовой поддержке гранта Российского научного фонда № 22-75-10021.

Фотобиосинтез биологически активных веществ микроводорослей в промышленных масштабах

Р. Г. Геворгиз^{1,2*}, С. Н. Железнова^{1,2}, И. В. Наумов^{2,3}, Н. И. Бобко¹, М. В. Нехорошев¹

¹Федеральный исследовательский центр «Институт биологии южных морей имени А. О. Ковалевского РАН», г. Севастополь

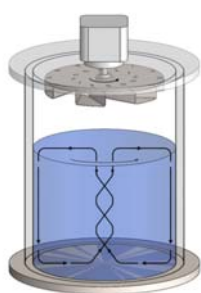
²Новосибирский государственный университет, г. Новосибирск

³Институт теплофизики имени С. С. Кутателадзе СО РАН, г. Новосибирск

*электронная почта: r.gevorgiz@yandex.ru

Исследования различных аспектов метаболизма фотосинтезирующих клеток еще в прошлом столетии показали, что микроводоросли и цианобактерии синтезируют множество ценных, уникальных биологически активных соединений [1,2]. Способность адаптироваться к неблагоприятным условиям среды обитания позволяет микроводорослям и цианобактериям выживать в крайне агрессивных условиях. Обеспечивается такая способность гибкостью метаболизма и биосинтезом в клетках активных соединений, защищающих клетки от разрушений. На сегодняшний день науке известно более 100 тысяч видов низших фототрофов. Но лишь малая часть из этого разнообразия достаточно полноценно изучена альгологами и не более пару десятков видов-продуцентов используются для получения ценных веществ в промышленных масштабах. Поэтому потенциал микроводорослей и цианобактерий далеко не исчерпан. А разработка промышленных технологий фотобиосинтеза биологически активных соединений на основе низших фототрофов остается задачей важной и актуальной.

Одним из важных ограничивающих факторов развития промышленных технологий на основе интенсивной культуры фотосинтезирующих клеток является отсутствие универсальных фотобиореакторов. В настоящей работе проведены исследования закрученных потоков в суспензии микроводорослей и цианобактерий в промышленных фотобиореакторах вихревого типа. А также приведены примеры разработанных биотехнологий производства биомассы микроводорослей различных систематических групп с высоким содержанием биологически активных соединений. Также представлены результаты исследований по управлению биосинтезом ценных веществ в культуре низших фототрофов в условиях естественного совмещения с использованием многостадийного проточного культивирования (многоступенчатый хемостат).



А



Б



В

Рисунок 1 – Фотобиореактор вихревого типа: А — схема; Б — лабораторный; В — промышленный

Работа выполнена в рамках государственного задания ФИЦ ИнБЮМ по теме «Комплексное исследование механизмов функционирования морских биотехнологических комплексов с целью получения биологически активных веществ из гидробионтов» (№ гос. регистрации 124022400152-1), а также при финансовой поддержке гранта Российского научного фонда № 24-19-00233.

Ссылки:

1. Макарова Е. И. и др. // Экосистемы, их оптимизация и охрана. 2009. 20.С. 120-133.
2. Минюк Г. С. и др. // Морской экологический журнал. 2008. Т. 7, № 2. С. 5-23.

Фоторегуляция системы CRISPR/Cas9 на уровне модифицированных направляющих РНК

Е. С. Горленко^{1,2*}, Л. В. Саковина^{1,2}, В. М. Гольшев^{1,2}, Д. С. Новопашина^{1,2}

¹ Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, г. Новосибирск

² Новосибирский государственный университет, г. Новосибирск

*электронная почта: e.gorlenko@alumni.nsu.ru

Регуляция активности молекулярно-биологических систем для повышения их эффективности и специфичности является важной задачей молекулярной, клеточной и синтетической биологии. Одним из способов управления активностью является воздействие светом на фоточувствительные молекулы в составе олигонуклеотидных конструкций. Так, облучение светом определенной длины волны приводит к расщеплению или изменению структуры фотолабильных вставок, что позволяет изменять функциональную активность модифицированных олигонуклеотидов и "включать" и/или "выключать" созданные системы.

Целью данной работы является создание подходов к фоторегуляции системы CRISPR/Cas9 на уровне модифицированных направляющих РНК.

Нами предложено два подхода к регуляции CRISPR/Cas9-систем путем облучения светом определенной длины волны. Первый подход относится к необратимой регуляции и предполагает активацию системы CRISPR/Cas9 с использованием циклических направляющих РНК, содержащих специально синтезированный фоторасщепляемый линкер на основе 1-(2-нитрофенил)-1,2-этандиола. Циклическая структура сгРНК обеспечивает инактивацию системы до УФ-облучения. При воздействии ультрафиолетом (365 нм) происходит расщепление фотолинкера и линейаризация сгРНК, при этом восстанавливается ее функциональная активность.

Второй подход представляет собой обратимую регуляцию с использованием сгРНК, содержащих фотолинкеры на основе азобензола, которые способны к изомеризации при облучении. В предложенном подходе были использованы два варианта фоточувствительных вставок: в первом варианте фотолинкеры содержат остатки азобензола в качестве боковых радикалов, направленных в сторону от рибозофосфатного остова, во втором – фрагмент азобензола встроен в рибозофосфатный остов. Направляющие РНК, содержащие фотолинкер с азобензолом в виде *транс*-изомера, при облучении видимым светом (505 нм) активируют расщепление ДНК-мишени нуклеазой Cas9. Облучение УФ-светом (365 нм) сопровождается переходом азобензола в *цис*-изомер и блокированием работы системы за счет изменения пространственной структуры сгРНК и уменьшения ее сродства к нуклеазе Cas9 и ДНК-мишени. Использование первого варианта фотолинкера в данном подходе позволяет добиться максимального различия в эффективности расщепления между активированной и дезактивированной системами. Дополнительно на модельных олигонуклеотидах было исследовано влияние фоточувствительных модификаций на физико-химические свойства РНК и стабильность их комплексов.

Полученные результаты подтверждают перспективность предложенных подходов к использованию фоточувствительных линейных и циклических олигонуклеотидов в составе системы редактирования генома CRISPR/Cas9 для регуляции активности расщепления плазмидной ДНК.

Исследование выполнено при финансовой поддержке гранта Российского научного фонда № 22-14-00294.

**Пептидные конъюгаты ингибирующих и направляющих РНКазу Р олигонуклеотидов как
потенциальные антибактериальные агенты**

Н. А. Данилин^{1*}, А. В. Бардашева¹, А. Л. Матвеев¹, В. М. Голышев^{1,2}, Д. С. Новопашина^{1,2}

¹*Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, г. Новосибирск*

²*Новосибирский государственный университет, г. Новосибирск*

*электронная почта: n.danilin@g.nsu.ru

В связи с развитием бактериальной устойчивости к лекарственным препаратам, важной задачей современной биологии, биотехнологии и медицины является разработка принципиально новых антибактериальных препаратов. Перспективным вариантом являются препараты на основе олигонуклеотидов способных взаимодействовать с бактериальной РНКазой Р - жизненно важным ферментом, участвующим в процессинге тРНК. В данной работе были использованы два варианта воздействия на РНКазу Р при помощи олигонуклеотидов: 1) использование олигонуклеотидов, способных связываться с РНК-компонентом РНКазы Р и ингибировать ее действие; 2) использование олигонуклеотидов, которые комплементарно связываются с жизненно важными мРНК так, чтобы имитировать субстрат для РНКазы Р и направлять ее на расщепление этих мРНК. Нарушение процессинга тРНК, как и расщепление жизненно важных мРНК должно подавлять рост бактерий. Для того чтобы олигонуклеотиды эффективнее проникали в бактериальные клетки, в их состав необходимо вводить молекулы доставщики. В нашей работе в качестве таких молекул были использованы пептиды.

Целью работы было создание пептидных конъюгатов ингибирующих и направляющих олигонуклеотидов, изучение их физико-химических свойств, а также исследование их потенциала в качестве антибактериальных агентов.

Пептидные конъюгаты получали методом тиол-малеимидной химии. Исследовано влияние пептидной составляющей на термодинамическую стабильность дуплексов конъюгатов олигонуклеотидов, взаимодействующих с РНКазой Р *E. coli*, с комплементарными РНК методами задержки в геле и термической денатурации дуплексов. Продemonстрировано негативное влияние пептидов на стабильность данного комплекса. Проведено комплексное исследование способности полученных конъюгатов ингибировать или направлять действие РНКазы Р. Для конъюгатов ингибирующих олигонуклеотидов наличие пептида в большинстве случаев оказывает негативное влияние на ингибирующие свойства олигонуклеотидной части. Для направляющих олигонуклеотидов наличие пептида в ряде случаев также снижает эффективность расщепления фрагмента мРНК (мишени). При этом наличие присоединенного через С-конец пептида, соответствующего фрагменту поверхностного белка Т-клеток человека, повышает эффективность расщепления мишени для всех исследованных нами типов олигонуклеотидов. При исследовании способности полученных конъюгатов проникать в клетки бактерий *E. coli* и *A. baumannii*, обнаружено, что конъюгаты с фрагментом модифицированного бычьего лактоферрина, а также с фрагментом поверхностного белка Т-клеток человека в значительной степени повышают эффективность взаимодействия с клеткой.

Таким образом, предложенные нами пептидные конъюгаты взаимодействующих с бактериальной РНКазой Р олигонуклеотидов, могут рассматриваться как потенциальные антибактериальные соединения.

Исследование поддержано в рамках государственного задания ИХБФМ СО РАН № 121031300042-1.

Доклинические исследования высокотехнологичных лекарственных соединений

И. А. Дьяченко

*Филиал Государственного научного центра РФ Института биоорганической химии
им. академиков М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова РАН, г. Пущино*

электронная почта: dyachenko@bibch.ru

Направления современной фармакологии расширили спектр поиска высоко активных соединений и с недавних пор в обиход клинической практики вошли высокотехнологичные лекарственные препараты. Высокотехнологичные лекарственные препараты, в основе которых соматические клетки, препараты тканевой инженерии и генотерапевтические. Если высокотехнологичный лекарственный препарат одновременно является генотерапевтическим с соматическими клетками или тканеинженерным, то его классифицируют как генотерапевтический. Однако новая группа лекарственных препаратов требует оригинальных методов доклинических исследований. В ФЗ РФ "Об обращении лекарственных средств" от 12.04.2010 №61-ФЗ (редакция 30.01.2024) Статья 18. «Подача и рассмотрение заявления о государственной регистрации лекарственного препарата для медицинского применения» сформированы основные требования к регистрационному досье: включает в себя отчеты о результатах доклинических исследований по фармакодинамической активности, фармакокинетической и токсикологические исследования. Минимально необходимый объем доклинических исследований должен учитывать особенности дозирования тестируемого высокотехнологического препарата и включать исследования, основанные на данных особенностях. Планирование доклинических исследований с целью последующего проведения клинических исследований основываются на требования (ICH M3(R2):2009 / ГОСТ Р 56701-2015 / ЕАЭС №202 26.11.2019). Специфичность фармакологической активности с учетом заболевания включает различные направления проведения исследований. Включает разработку моделей генетических заболеваний у лабораторных животных с использованием уникальных нокаутных мышей позволяющих определить спектр эффективности тестируемого высокотехнологичного лекарственного препарат. Однако токсикологический подход основан взаимно дублирующих дизайнах исследования, с ранее зарегистрированными высокотехнологичными лекарственными препаратами и учитывать дизайн и выбор животных. Проведение регистрационных токсикологических исследований необходимо выполнять в испытательных центрах, из списка единой системы аккредитации (Росаккредитация). Проведение исследование выполняются по методологии GLP, что позволит проводить регистрацию на территории ЕАЭС.

Получение биомассы морской диатомеи *Nanofrustulum shiloi* с высоким содержанием фукоксантина в промышленных масштабах

С. Н. Железнова*, Р. Г. Геворгиз, А. А. Благинина, Н. И. Бобко, М. В. Нехорошев
Федеральный исследовательский центр «Институт биологии южных морей имени
А. О. Ковалевского РАН», г. Севастополь

*электронная почта: zheleznovasveta@yandex.ru

Морские диатомовые водоросли являются ценным сырьём для получения биологически активных веществ, включая ценный каротиноид фукоксантин [1], а также полиненасыщенные жирные кислоты, макро- и микроэлементы [2]. Среди всех диатомей можно выделить *Nanofrustulum shiloi* (Lee, Reimer et McEnery) Round, Hallsteinsen et Paasche, которая содержит комплекс компонентов, необходимых организму человека. *N. shiloi* - бентопланктонный вид, космополит, обладает широкой экологической пластичностью. Характеризуется высоким содержанием липидов (27-28% от сухой биомассы) [3] и фукоксантина (18 мг/г сухой массы) [3]. Фукоксантин обладает иммуномодулирующими, противовоспалительными, антиангиогенными, противомаларийными свойствами [4], а также антираковой активностью [5], снижает уровень сахара в крови и уровень плохого холестерина [4]. Эти свойства представляют большой интерес для пищевой и медицинской промышленности [6]. Поэтому все экологические, биохимические и физиологические характеристики вида делают его перспективным объектом для биотехнологии.

Нами было выявлено, что процессы роста и накопления ценных веществ у *N. shiloi* разобщены. Для управления ростом культуры, а также накоплением целевых продуктов в биомассе предлагается использовать проточную культуру. Чтобы учесть разобщённость процессов роста клеток и биосинтеза целевых веществ предлагается использовать двухступенчатую проточную систему культивирования (двухступенчатый хеостат), в общем случае с различной вариацией скорости протока для каждой ступени. Как в лабораторных исследованиях, так и в промышленных масштабах особенность клеток *N. shiloi* оседать на дно при отсутствии перемешивания позволяет легко отделять биомассу от культуральной среды и варьировать величиной протока для каждой ступени системы культивирования, тем самым управляя скоростью роста в первой ступени и накоплением целевого вещества во второй ступени. Эксперименты проводили в газовых реакторах объемом 275 л при естественном освещении, средняя интенсивность освещения составляла 10 клк, температура в культиваторе варьировала от 16 до 20°C. При данных условиях максимальная продуктивность культуры составила 0,05 г/л сухой массы в сутки, поэтому по достижению стационарной фазы роста на 28 сутки культивирования был установлен проток 3,64%. Удельную скорость протока подбирали таким образом, чтобы скорость биосинтеза фукоксантина была максимальной. При данном режиме культивирования выход сухой биомассы составил 5,6 г/кв.м в сутки, а выход фукоксантина во второй ступени составил 63.7 мг/(кв.м*сут).

Ссылки:

1. Peraman M. *et al.* // Pharmac. Magaz. 2019. V. 15, N. 64. P. 243 - 249.
2. Nieri P. *et al.* // Nutrients. 2023. V. 15. P. 1-23.
3. Demirel Z. *et al.* // Brazil. Arch. Biol. Technol. 2020. V. 63, N. 4. P. 1-8.
4. Ahmed S. A. *et al.* // Int. J. Mol. Sci. 2022. V. 23. P. 1-27.
5. Terasaki M. *et al.* // Cancers (Basel). 2021. V. 13, N.10. P. 1-24.
6. Dawczynski C. *et al.* // J. Agric. Food Chem. 2007. V. 55, N. 25. P. 10470–10475.

Использование морских люминесцентных бактерий для мониторинга токсичности растворов селенита натрия и их детоксикации путем биосинтеза наночастиц селена

А. В. Зеньков^{1*}, Е. С. Сушко^{1,2}, Н. С. Кудряшева^{1,2}

¹Сибирский федеральный университет, г. Красноярск

²Институт биофизики – обособленное подразделение КНЦ СО РАН, г. Красноярск

*электронная почта: zenkoviv@mail.ru

Одними из поллютантов в морских средах являются оксоанионы селена – селенаты и селениты. Существует ряд микроорганизмов, которые способны уменьшать концентрацию оксоанионов селена в среде путем их восстановления в элементарный селен [1,2]. Одним из подходов в экологической биотехнологии может стать создание полифункциональных биопрепаратов на основе морских люминесцентных бактерий, которые могут одновременно использоваться для (1) экологического мониторинга избытка селена в морских водах, (2) их детоксикации и (3) биосинтеза наночастиц элементарного селена.

В работе использовали морские люминесцентные бактерии *Photobacterium phosphoreum* 1883 IBSO. Исследовали влияние селенита натрия (Na_2SeO_3) (10^{-8} – 10^{-1} М) на биолюминесценцию бактерий и их ферментативных реакций. Для определения содержания АФК в бактериальных средах применяли хемилюминесцентный метод. Наночастицы селена в бактериальной суспензии регистрировали с помощью сканирующей и просвечивающей электронной микроскопии.

Обнаружено увеличение интенсивности бактериального свечения в диапазоне концентраций 10^{-7} – $5 \cdot 10^{-4}$ М и уменьшение (токсический эффект) при $>10^{-4}$ М Na_2SeO_3 . В ферментативной системе также наблюдалось уменьшение интенсивности свечения при $>10^{-4}$ М. Уменьшение содержания АФК относительно контроля наблюдалось при $>10^{-4}$ М, что свидетельствует об определяющей роли радикальных окислительно-восстановительных процессов в токсическом воздействии Na_2SeO_3 на биолюминесценцию.

После 7 суток культивирования *P. phosphoreum* в жидкой питательной среде с 10^{-3} и $2 \cdot 10^{-3}$ М Na_2SeO_3 суспензия имела оранжевый и красный цвет, соответственно, что свидетельствует о наличии восстановленного элементарного селена [2]. Микроскопические данные свидетельствуют об образовании на поверхности бактерий округлых наночастиц селена со средними размерами 50-60 нм.

Таким образом, морские люминесцентные бактерии потенциально могут быть использованы в качестве основы для полифункционального биопрепарата. Требуется дальнейшее изучение отклика *P. phosphoreum* на воздействие селенит-ионов на более длительных периодах наблюдения.

Ссылки:

1. Charya L. S. / Marine Pollution and Microbial Remediation. 2017. Springer.
2. Tugarova A.V. et al. // Microbial Ecology. 2014. V. 68, N. 3. P. 495–503.

**Цистостин – малоизученный антибиотик пуринового ряда, ингибирующий трансляцию
через образование пептидил-цистостина**

П. А. Зотова^{1*}, Д. А. Лукьянов^{1,2}, Е. С. Комарова¹, В. А. Алферова³, П. В. Сергиев^{1,2,4},
С. С. Терехов³

¹Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова, г. Москва

²Сколковский институт науки и технологий, г. Сколково, Московская область

³Государственный научный центр РФ Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина
и Ю. А. Овчинникова РАН, г. Москва

⁴НИИ Физико-химической биологии им. А. Н. Белозерского МГУ, г. Москва

*электронная почта: zotova.polinaa@gmail.com

Цистостин (Cst) принадлежит к классу нуклеозидных антибиотиков и продуцируется *Streptomyces sp.* GCA0001 [1]. Cst структурно схож с известным антибиотиком пурамицином (Puro), который широко используется в молекулярной биологии. Механизм действия Puro заключается в преждевременной остановке трансляции за счёт имитирования им аминокислотированного конца тРНК в А-сайте рибосомы и переноса растущей полипептидной цепи на молекулу антибиотика с образованием пептидил-пурамицина. Для обоих антибиотиков были проведены эксперименты бактериальной и эукариотической *in vitro* трансляции, анализ синтеза коротких пептидов [2] и тоепринт анализ [3,4]. В результате мы впервые детально показали сходство механизмов их действия, а также более высокую антибиотическую активность Puro по сравнению с Cst.

В ходе исследования механизмов саморезистентности Cst и Puro было выявлено, что фермент N-ацетилтрансфераза CstC, обеспечивающий устойчивость к Cst, структурно очень похож на N-ацетилтрансферазу PAC [5], отвечающую за устойчивость к Puro. Кросс-тестирование устойчивости к Puro и Cst на прокариотических и эукариотических клетках показало, что ферменты CstC и PAC обеспечивают резистентность к обоим антибиотикам, однако устойчивость выше для соответствующего соединения. Объяснением этого могут служить различия в активных центрах: по сравнению с PAC активный центр CstC частично заблокирован двумя объёмными остатками фенилаланина, что приводит к снижению связывания Puro в активном центре CstC.

На основании структурного сходства самих антибиотиков Puro и Cst и ферментов их природной устойчивости, а также их схожего поведения в нескольких проведённых нами биологических экспериментах можно сделать вывод о том, что Cst действует по аналогичному механизму, что и Puro, то есть через образование пептидил-цистостина.

Исследование выполнено при финансовой поддержке гранта Министерства науки и высшего образования Российской Федерации, соглашение No. 075-15-2024-536 (хоз. договор № 32413846019 (653/24) от 30 июля 2024 года).

Ссылки:

1. Kyung S-J *et al.* // J. Microbiol. Biotechnol. 2003. V. 13. P. 483-486.
2. Marina V. *et al.* // RNA. 2024. V. 30. P. 298-307.
3. Hartz D. *et al.* // Methods in enzymology. 1988. V. 164. P. 419-425.
4. Carey M. *et al.* // Cold Spring Harbor Laboratory Press. 2013.
5. Vara J. *et al.* // Biochemistry. 1985. V. 24. P. 8074-8081.

**Высокоэффективный промышленный способ очистки терапевтических белков от
бактериальных эндотоксинов**

С. А. Ищук

R&D центр ООО ГЕРОФАРМ, г. Санкт-Петербург

электронная почта: Sergey.Ishchuk@geropharm.com

Бактериальные эндотоксины представляют собой липополисахариды, входящие в состав клеточной стенки грамотрицательных бактерий. Соединения являются сильной пирогенной примесью лекарственных препаратов, поэтому их содержание строго регламентируется.

Для рекомбинантных белков, производимых в прокариотических системах экспрессии, бактериальные эндотоксины являются одной из основных примесей. Особые сложности связаны со способностью липополисахаридов образовывать устойчивые комплексы с биомолекулами, включая целевые терапевтические соединения.

Единого способа очистки белков от эндотоксинов не существует. Методы, описанные в литературе, зачастую не имеют широкого распространения, поскольку они разработаны с учетом характеристик конкретного продукта. Кроме того, некоторые из них требуют введения дополнительных стадий очистки из-за применения токсичных реагентов (тритон X-114 в экстракционном методе), либо использования дополнительных дорогостоящих материалов (аффинные и мультимодальные сорбенты).

В работе описан комбинированный подход очистки целевого белка на основе ионообменной хроматографии. Суть метода заключается в предварительной сорбции целевого продукта, эндотоксинов и комплексов белок-эндотоксин на сорбенте с последующей промывкой неионогенным ПАВом Tween 20 в концентрации 1%. Tween 20 в небольших концентрациях применяется в качестве антиагрегирующего агента в составах готовой лекарственной формы. В концентрациях 1% и более вещество действует как детергент, вытесняя с гидрофобных участков белка связанные с ним эндотоксины. Промывка составом с Tween 20 в концентрации 0,01% возвращает целевой продукт в исходный буфер. Завершающий этап элюции целевого белка в градиенте соли позволяет отделить продукт от свободных эндотоксинов, которые остаются на сорбенте за счет своего большего заряда.

Основными преимуществами предложенного подхода является применение общедоступного недорогостоящего ПАВ, широко применяемого в фармацевтической промышленности. Разработанный подход очистки позволил снизить содержание эндотоксинов в целевом Fc-слитом белке с 50-100 ЕЭ/мг до менее 1 ЕЭ/мг при норме менее 5 ЕЭ/мг.

**Разработка аналитической методики ИО-ВЭЖХ для нового биотехнологического
препарата**

А. В. Кабанова*, С. С. Тимофеев

R&D центр ООО ГЕРОФАРМ, г. Санкт-Петербург

*электронная почта: Alena.Kabanova@geropharm.com

Ионообменная хроматография представляет собой метод, позволяющий разделять ионы и полярные молекулы на основе их заряда.

Целью данной работы было подобрать оптимальные условия разделения целевой молекулы и сопутствующих веществ.

Известные для молекулы GP20091.01-L3-12 первичная последовательность и значение изоэлектрической точки белка pI, равной 5,8 позволили сделать выбор в пользу анионообменной хроматографии с рН подвижных фаз равным 8,0 и градиентным элюированием NaCl. Для хроматографического анализа использовалась колонка SEPAX Proteomix SAX-NP5.

В начале разработки методики был выбран элюент, содержащий 20 mM фосфатного буферного раствора, 500 mM хлорида натрия и имеющий рН 8,0. Выбор был основан на простоте и распространенности компонентов фазы.

Наблюдаемы хроматограммы не давали возможности в полной мере оценить присутствие в анализе родственных или других компонентов.

Затем, опираясь на технологию получения молекулы GP20091.01-L3-12, фосфатный элюент был заменен, на элюент, содержащий в себе 20 mM TRIS, 500 mM хлорида натрия и имеющий рН 8,0. На хроматограммах видно, что происходит более качественное разделение компонентов, отделяется основной пик. На данный момент не удалось получить более качественного разделения компонентов даже при изменении хроматографических условий.

Важным критерием методики является ее пригодность, для подобных систем подбор пригодности является большой проблемой, так как сама молекула является новой, и мы не можем в полной мере опираться на ее хроматограммы, принимая их за истину.

Для оценки пригодности хроматографической системы были выбраны вещества со сходными изоэлектрическими точками.

В результате экспериментов были получены хроматограммы, позволившие оценить количество целевой формы молекулы и соотнести содержания белка, полученного методом Лоури и сигнал, полученный методом анионообменной хроматографии. Этот результат дал возможность оценивать количественное содержание продукта ортогональными методами.

**Разработка технологии выделения полипептидов из органов и тканей КРС с применением
подхода Дизайн эксперимента (DoE)**

А. В. Казакова*, С. А. Ищук

R&D центр ООО ГЕРОФАРМ, г. Санкт-Петербург

*электронная почта: Angelina.Kazakova@geropharm.com

Согласно современным тенденциям фармацевтической разработки, сформулированным в руководстве ICH Q8, определение проектных полей является частью систематизированного подхода углубленной стратегии контроля качества препаратов. Проектное поле (design space) представляет собой многомерную комбинацию параметров процесса, обеспечивающую получение препарата надлежащего качества. Оно может быть представлено в виде графиков поверхности отклика либо в виде контурных диаграмм.

Для определения проектного поля рекомендуется использовать статистические подходы, например, дизайн эксперимента (design of experiments). Основная идея подхода состоит в том, чтобы одновременно изучить влияние многих факторов на систему в рамках набора запланированных экспериментов, а затем соединить результаты с помощью математической модели. Это позволяет получать наибольшее количество информации из собранных данных, экономить время и сокращать затраты материальных ресурсов на оптимизацию процесса.

В данной работе определяли проектные поля для стадий выделения и очистки экстракционного препарата. Технология включала в себя четыре последовательные стадии: экстракция, осаждение, фильтрация и сушка, измельчение. Для каждой из четырех стадий были выбраны факторы, которые могут оказывать влияние на качество и количество получаемого препарата (6, 3, 5 и 3 соответственно). Далее были определены диапазоны (уровни) факторов и выбраны планы экспериментов. Для стадий экстракции и фильтрации были выбраны дробнофакторные планы, включающие в себя 19 экспериментов, для стадий осаждения и измельчения – полнофакторные, 11 экспериментов. В качестве откликов использовали показатели количественного определения, определяемые методами спектрофотометрии и RP-HPLC, и молекулярно-массового распределения, определяемые методами капиллярного электрофореза и SE-HPLC.

В результате экспериментов были получены модели хорошего качества, позволившие описать технологию. Были определены условия, позволяющие увеличить выход продукта на 25% в рамках действующих технологических инструкций за счет изменения температурного режима осаждения. Общая длительность процесса также была снижена на 19 часов за счет изменения длительности стадии экстракции. Предсказанные оптимальные условия были проверены экспериментально – проведением экспериментов в большем масштабе. Полученные значения выходов продукта подтвердили надежность построенных моделей.

Таким образом, были установлены критичные параметры процессов и их диапазоны, а также целевые показатели качества полупродуктов, позволяющие управляемо получать продукт, соответствующий требованиям нормативной документации.

Нейротоксин RpIII из морской анемоны *Heteractis magnifica* – селективный модулятор потенциал-зависимых натриевых каналов насекомых

Р. С. Калина^{1*}, Н. А. Прийменко¹, Н. Ю. Отставных¹, С. Пеньёр², И. Н. Гладких¹, Я. Титгат²,
М. П. Исаева¹, Е. В. Лейченко¹

¹Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г. Б. Елякова ДВО РАН, г. Владивосток

²Католический университет Левена, Левен, Бельгия

*электронная почта: kalinarimma@gmail.com

Потенциал-зависимые натриевые каналы (Nav) являются молекулярными мишенями множества лекарственных препаратов, а также контактных синтетических инсектицидов. Большинство инсектицидов на рынке представлено хлорорганическими соединениями и пиретроидами, которые оказывают сильное нейротоксическое действие, потенцируя Nav каналы насекомых. Однако быстрое распространение устойчивости к этим средствам среди популяций сельскохозяйственных вредителей и переносчиков заболеваний заставляет искать новые классы эффективных и безопасных инсектицидов. В результате исследования комбинаторной библиотеки нейротоксинов морской анемоны *Heteractis magnifica* методом глубокого секвенирования, было обнаружено свыше 30 последовательностей ранее неизвестных нейротоксинов – потенциальных модуляторов Nav млекопитающих и/или насекомых. Установлено, что последовательности сигнальных пептидов и пропептидов значительно более консервативны, чем последовательности зрелых нейротоксинов, которые содержат множественные точечные аминокислотные замены, затрагивающие, в том числе, функционально важные аминокислотные остатки. Нейротоксины RpIII и RpII, ранее выделенные из *H. magnifica* (*Radianthus paumotensis*) [1,2], были мажорными изоформами. Примечательно, что нейротоксины, гомологичные RpIII и RpII, имели различные пептиды предшественники, отличающиеся в области пропептида. Рекомбинантный RpIII был получен методом гетерологической экспрессии в клетках *Escherichia coli*. В экспериментах *in vitro* RpIII в наномолярной концентрации потенцировал канал паразитического клеща *Varroa destructor* (VdNav1), а также тетродоксин-чувствительные Nav каналы млекопитающих, за исключением подтипа Nav1.1, которые экспрессировались в ооцитах лягушки. Однако, максимальную активность RpIII проявлял в отношении каналов насекомых, в частности AaNav1 канала желтолихорадочного комара *Aedes aegypti*, который является переносчиком лихорадки денге, жёлтой лихорадки, вируса Зика и других заболеваний в ряде тропических и субтропических регионов. Моделирование 3D структуры комплекса RpIII с каналом AaNav1, демонстрирует, что высокая эффективность пептида может быть связана с формированием большого числа межмолекулярных контактов, включая электростатические взаимодействия, с, так называемым, сайтом 3 канала, который включает потенциал-чувствительный сегмент IV и пороформирующий домен I [3] и, по-видимому, является достаточно консервативным среди различных каналов насекомых. В качестве активного и видоспецифичного потенциатора Nav насекомых RpIII может стать основой нового биоинсектицида.

Ссылки:

1. Schweitz H. *et al.* // Biochemistry. 1985. V. 24, N. 14. P. 3554-3561.
2. Mettrione R. M. *et al.* // FEBS Lett. 1987. V. 218, N. 1. P. 59-62.
3. Niklas B. *et al.* // Molecules. 2021. V. 26, N. 5. P. 1302.

Получение перспективных для науки и медицины соединений на основе действующих на никотиновые холинорецепторы природных пептидов - успехи и проблемы

И. Е. Кашеверов*, И. В. Шелухина, Е. В. Крюкова, Ю. Н. Уткин, В. И. Цетлин
Государственный научный центр РФ Институт биоорганической химии им. академиков
М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова РАН, г. Москва
*электронная почта: iekash@ibch.ru

Никотиновые ацетилхолиновые рецепторы (холинорецепторы, nAChR) – одни из наиболее хорошо изученных ионных каналов, широко представленных в нервной и мышечной системах, а также клетках иммунной системы, кожи, других органов и тканей. Они участвуют в большом количестве наиважнейших физиологических процессов, включая проведение нервного импульса, мышечные сокращения, когнитивные процессы, воспалительные реакции, боль, канцерогенез. По этой причине они задействованы в разной степени в целом ряде заболеваний и патологических состояний - болезнях Альцгеймера и Паркинсона, шизофрении, эпилепсии, некоторых видах миастении и рака, никотиновой зависимости, болевой чувствительности, что делает nAChR мишенью для разработки соответствующих лекарств. Однако, все это разнообразие функций и локализации nAChR, и связанных с ними заболеваний, вызвано большим количеством существующих подтипов этих рецепторов, обусловленное наличием 10-ти α -, 4-х β -, а также γ -, ϵ - и δ -субъединиц, которые могут образовывать десятки функционально-активных пентамерных комплексов. Поэтому до сих пор проводятся работы по созданию новых высокоактивных и селективных лигандов к определенным подтипам nAChR как для использования в фундаментальных исследованиях, так и для медицинской сферы. Одним из наиболее перспективных направлений является работа с пептидными лигандами nAChR в силу как правило изначально высокой селективности их действия по отношению к своим мишеням. Наиболее известными холинергическими лигандами пептидной природы являются нейротоксины ядов змей и токсины морских брюхоногих. На основе последних (в первую очередь небольших пептидов α -конотоксинов из моллюсков *Conus*) созданы уже сотни самых разнообразных аналогов и соединений, многие из которых обладают уникальными связывающими, кинетическими, селективными свойствами, которые внесли существенный вклад в понимание структурно-функциональных свойств и механизма работы основных подтипов nAChR, а также тестировались в качестве возможных клинических препаратов. Однако, к сожалению, на сегодняшний день очень малое количество таких соединений, которые можно перечислить на пальцах одной руки, смогло дойти до клинической практики. Среди основных причин этого – высокая токсичность пептидных лигандов nAChR, видоселективность в отношении ряда подтипов рецептора, их нестабильность при введении в виде препарата и другие. Эти проблемы в данный момент пытаются решить с использованием различных подходов, ключевым из которых по-прежнему остается химическая или рекомбинантная модификация структуры лиганда, в том числе с привлечением расчетных компьютерных методов. Проблемы и успехи на этом пути, в том числе пройденные авторами представленной работы на примере нескольких пептидных лигандов nAChR (аземиопсин бирманской гадюки и его аналоги, α -конотоксины и их варианты, олигоаргинины), будут подробно освещены в данной презентации.

Исследование выполнено при финансовой поддержке гранта Российского научного фонда № 24-14-00464.

**Исследование противоаллергической активности HCRG21, пептида морской анемоны
*Heteractis crispa***

Ю. В. Кожевникова^{1*}, А. А. Климович¹, Д. В. Попкова¹, Н. А. Прийменко^{1,2}, И. Н. Гладких¹,
Е. В. Лейченко^{1,2}

¹Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г. Б. Елякова ДВО РАН, г. Владивосток

²Дальневосточный федеральный университет, г. Владивосток

*электронная почта: ulya77ya@mail.ru

Аллергические дерматозы – распространённые воспалительные заболевания кожи, имеющие многофакторную этиологию и сложный патогенез. Наиболее известными заболеваниями являются псориаз, контактный дерматит, экзема и др. Патогенез включает в себя повреждение эпидермального барьера, в следствии избыточной воспалительной реакции со стороны иммунной системы, в ответ на действие различных раздражителей. Клинически это проявляется в виде зуда, шелушения, гиперимии (покраснения), лихенизации (уплотнения и утолщения участка воспалённых тканей), геморрагии (кровоточивость при нарушении целостности и проницаемости стенок сосудов), часто с образованием некротических участков [1]. Известно, что одной из причин, приводящих к развитию кожных заболеваний, является дисфункция ионных каналов и ионотропных рецепторов. TRPV1 канал представляет собой полимодальный ноцицептор, который помимо воспалительной и невропатической боли также участвует в патогенезе зуда [2]. Модуляторы TRPV1 представляют собой перспективную молекулярную базу для разработки препаратов для лечения аллергических дерматозов, в частности псориаза. В яде морской анемоны *Heteractis crispa* обнаружен первый пептидный блокатор TRPV1, токсин Кунитц-типа HCRG21 [3]. В данной работе мы показали противоаллергическую активность рекомбинантного пептида HCRG21 *in vivo* на модели псориазоподобного поражения кожи мышей линии CD-1. Моделирование псориазического поражения проводили путем нанесения коммерческого крема «Кераворт» (Glenmark Pharmaceuticals, Индия), содержащего 5%-ный имиквимод, на предварительно лишенный шерстяного покрова участок кожи мышей в дорса-коудальной области 1 раз в сутки в течение 30 дней. Экспериментальное лечение начинали спустя сутки после последней аппликации индуктора. HCRG21 использовали в составе 0,05%-ного и 0,005%-ного геля на основе готового водного геля натрий карбоксиметилцеллюлозы (Na-KМЦ) и гиалуроната натрия (2:1). Лечение проводили в течение 5 дней. В качестве положительного контроля использовали мазь «Синафлан» (Нижфарм АО, Россия). Тяжесть поражения кожи оценивали с помощью клинического индекса распространенности и тяжести псориаза PASI (Psoriasis Area Severity Index). Статистически достоверное снижение значения PASI наблюдалось после трёх аппликаций гелей. При этом противопсориазическое действие HCRG21 было практически сравнимо с действием коммерческой противовоспалительной мази «Синафлан». Так, начиная с третьего дня лечения и до терминальной стадии эксперимента, в опытных группах, и в группе К(+) наблюдалось снижение индекса PASI приблизительно в 1,5 раза относительно группы К(-). HCRG21 способствовал облегчению тяжести клинических проявлений псориазического поражения кожи, снижал выраженность гиперкератоза, шелушения и гиперимии и увеличивал скорость восстановления эпидермиса.

Исследование выполнено при финансовой поддержке гранта МИНОБРНАУКИ России (соглашение № 075-15-2022-1143 от 07 июля 2022 г).

Ссылки:

1. Fonacier L. S. *et al.* // J. Allergy Clin. Immunol. 2010. V. 125, N. 2. P. 138-S149.
2. Гладких И. Н. и др. // Успехи биол. Химии. 2021. Т. 61. С. 107–154.
3. Monastyrnaya M. *et al.* // Mar. Drugs. 2016. V. 12. P. 2–20.

Индукция раннего врожденного иммунного ответа у мышей с помощью рекомбинантных штаммов БЦЖ

Л. Г. Кондратьева^{1,2*}, В. В. Плешкан^{1,2}, И. А. Линге³, Е. В. Снежков¹, И. В. Алексеенко^{1,2}

¹ Государственный научный центр РФ Институт биоорганической химии им. академиков
М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова РАН, г. Москва

² Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт», г. Москва

³ Центральный научно-исследовательский институт туберкулеза, г. Москва

* электронная почта: liakondratyeva@yandex.ru

Известно, что использование вакцины БЦЖ способствует увеличению устойчивости к другим заболеваниям и этот эффект связан с обучением клеток врожденного иммунитета. Феномен «обученного» иммунитета – это усиление врожденных иммунных ответов после первоначального воздействия, в результате чего амплитуда последующих ответов увеличивается, что можно рассматривать в качестве формы неспецифической иммунологической памяти. Этот процесс сопровождается метаболическим и эпигенетическим перепрограммированием клеток врожденного иммунитета, таких как макрофаги, моноциты и дендритные клетки. Усиление такой неспецифической защиты за счёт дополнительной экспрессии иммуномодулирующих цитокинов может быть использовано для разработки рекомбинантных вакцин.

В рамках данной работы на базе микобактериального вектора были получены генетические конструкции, кодирующие последовательности генов мышинных цитокинов mGMCSF, mI12, mI18, слитых с микобактериальным сигналом секреции. С помощью электропорации с последующей селекцией были получены клоны рекомбинантных БЦЖ, продуцирующие целевые цитокины (рБЦЖ). Далее в экспериментах *in vivo* была изучена способность рекомбинантных штаммов БЦЖ, продуцирующих mGMCSF, mI12, mI18 стимулировать иммунный ответ по сравнению с немодифицированным штаммом БЦЖ. Для этого полученные штаммы рБЦЖ и контрольный нативный штамм вводили во внутрибрюшинное пространство мышей, и оценивали динамику изменений в составе популяций клеток врожденного иммунного ответа в селезенке и перитонеальном экссудате мышей, а также исследовали концентрации воспалительного цитокина Ifng в супернатантах перитонеального экссудата. Было обнаружено, что при перитонеальном введении нативного штамма БЦЖ происходит увеличение содержания Cd11b+Ly6G+ нейтрофилов через три часа после инъекции, при этом через три дня их количество значительно снижается относительно 3-часового подъема. Влияния использования рекомбинантных штаммов на количество нейтрофилов обнаружено не было. Показано, что количество CD11b+Ly6C+ моноцитов клеток в группах БЦЖ и рБЦЖ через 3 дня после инфекции значительно растет, при этом моноцитов во всех группах рБЦЖ оказывалось больше на 20-25% чем для БЦЖ дикого типа. При исследовании макрофагального ответа было выявлено, что через три часа после введения микобактерий при начальном развитии инфекционного процесса происходит утрата подпопуляции F4/80+ клеток – LPM (Large Peritoneal Macrophage), количество которых через три дня восстанавливается. При этом при введении рБЦЖ-mGMCSF через три дня после инъекции количество LPM не только восстанавливается, но и превышает исходные значения в 1,5-2 раза, после инъекции рБЦЖ-mI12 – их количество увеличивается в 2 раза относительно содержания LPM в перитонеальном пространстве мышей без инфекции. Эти данные свидетельствуют о том, что полученные штаммы рБЦЖ-mGMCSF и рБЦЖ-mI12 способны усиливать ранний врожденный иммунный ответ *in vivo*.

Исследование выполнено при финансовой поддержке гранта Российского научного фонда № 22-14-00308.

Секрет вампира. Медицинская пиявка как природная аптека новых лекарственных средств

В. Н. Лазарев

Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины имени академика
Ю. М. Лопухина, г. Москва
электронная почта: lazar0@mail.ru

Лечение пиявками используется человечеством с незапамятных времен. Первые упоминания об этом относятся к 15 веку до н.э. – изображения медицинских пиявок обнаружены в настенных росписях гробниц египетских фараонов 18й династии. Гирудотерапия, или лечение с помощью пиявок – один из немногих традиционных методов терапии, не утративший актуальности после начала научного этапа развития медицины. В настоящее время гирудотерапия официально применяется в ряде развитых стран и имеет под собой прочный научный фундамент, не имеющий ничего общего со знахарством или шаманством. Так, в 2004 году FDA разрешило использование медицинских пиявок в качестве медицинского изделия для использования при пересадке кожи и реплантации.

К настоящему времени идентифицировано около 650 видов пиявок, только лишь небольшая часть которых является гематофагами. Медицинская пиявка относится к кровососущим кольчатым червям семейства Hirudinidae, в который входит род *Hirudo*, объединяющий три вида европейской медицинской пиявки *H. medicinalis*, *H. verbana* и *H. orientalis*, а также близкую к ним североафриканскую пиявку *H. troctina* и дальневосточную пиявку *H. nipponia*.

Основной субстанцией, ответственной за главные эффекты гирудотерапии, является секрет слюнных желез медицинских пиявок (ССЖ). Он представляет собой сложную смесь биологически активных веществ различной химической природы. Важным положительным свойством ССЖ является его высокая совместимость с компонентами крови, которая выработалась в ходе длительной совместной эволюции пиявок и млекопитающих. ССЖ не обладает раздражающими, воспалительными или токсичными свойствами, а входящие в его состав вещества специфично взаимодействуют со своими мишенями в организме человека.

Секрет слюнных желез медицинской пиявки содержит активные соединения, способные оказывать антикоагулянтное, противовоспалительное, фибринолитическое, гипотензивное, бактерицидное, противоболевое, иммуномодулирующее и другие действия. К настоящему времени лишь небольшая часть компонентов секрета охарактеризована на молекулярном и функциональном уровнях.

Секрет слюнных желез является природной аптекой, ассортимент которой сформировался в ходе многотысячелетней адаптации медицинской пиявки к питанию кровью теплокровных животных. Несмотря на тысячелетнюю историю использования человечеством пиявок в медицинских целях, мы все еще далеки от понимания механизмов, лежащих в основе гирудотерапии.

Для восполнения этих пробелов, мы впервые определили полную нуклеотидную последовательность генома одного из видов медицинской пиявки (*Hirudo medicinalis*), провели транскрипционное профилирование с последующей функциональной аннотацией клеток слюнных желез трех видов европейской медицинской пиявки, выполнили глубокий протеомный и пептидомный анализы секрета пиявок этих видов, а также метагеномный анализ различных отделов пищеварительного тракта *H. medicinalis*, *H. verbana* и *H. orientalis*.

Разработка лекарственного препарата на основе пептидного блокатора TRPV1 канала

Е. В. Лейченко^{1,2}

¹Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г. Б. Елякова ДВО РАН, г. Владивосток

²Дальневосточный федеральный университет, г. Владивосток

электронная почта: leychenko@gmail.com

Канал TRPV1 (transient receptor potential vanilloid type 1) – важнейший интегратор болевых и воспалительных стимулов, рассматривается как перспективная терапевтическая мишень в лечении болевых состояний различной этиологии. В организме млекопитающих он отвечает за терморегуляцию и передачу болевых сигналов от периферии в мозг, активируется температурой (выше 43°C), закислением внеклеточной среды и агонистами различной природы.

Традиционные анальгетические средства по основному механизму действия либо подавляют воспалительные процессы, либо тормозят функционирование болевой (ноцицептивной) системы. Антагонисты TRPV1, блокируя важный рецептор и интегратор болевых стимулов на чувствительных нейронах, вызывают длительную анальгезию, поэтому их следует рассматривать как реальную альтернативу традиционным анальгезирующим средствам.

Установлено, что пептид морской анемоны *Heteractis crispa*, HCRG21, ингибирует на 95% индуцированные капсаицином токи, проходящие через TRPV1 канал (IC₅₀ 6,9 мкМ). В результате *in vivo* экспериментов показано, что HCRG21 обладает длительным анальгетическим, противовоспалительным и гипотермическим действием как при парентеральном, так и интраназальном введении. Доказана эффективность пептида HCRG21 в составе геля в *in vivo* моделях аллергического контактного дерматита и псориаза в сравнении с кортикостероидными препаратами. Разработан биотехнологический способ получения HCRG21.

Все вышеперечисленное позволяет использовать пептид HCRG21 индивидуально или как активный компонент ГЛФ обезболивающего средства для нужд ветеринарии и медицины.

Исследование выполнено при финансовой поддержке гранта МИНОБРНАУКИ России (соглашение № 075-15-2022-1143 от 07 июля 2022 г.).

Поиск продуцентов биологически активных метаболитов среди изолятов фомоидных микромицетов, выделенных из растений Приморского края

Е. Г. Лукина^{1*}, Е. И. Хмелькова^{1,2}, А. О. Берестецкий¹

¹Всероссийский Научно-Исследовательский Институт Защиты Растений, г. Санкт-Петербург

²Санкт-Петербургский государственный университет, г. Санкт-Петербург

*электронная почта: elizaveta121999@mail.ru

Поиск биологически активных веществ (БАВ), продуцируемых различными микроорганизмами, изучение биологических функций данных соединений и исследование их механизмов действия, являются важными задачами для разработки лекарственных препаратов и химических средств защиты растений. Микроскопические грибы, в частности, представители фомоидных микромицетов (группа неродственных анаморфных грибов, обладающих общими морфологическими признаками) могут быть рассмотрены как одна из наиболее перспективных групп микроорганизмов, способных синтезировать вторичные метаболиты с широким спектром биологической активности. Особый интерес с точки зрения поиска продуцентов БАВ представляют фомоидные грибы Приморского края, региона с малоизученной микобиотой, которая нуждается в ревизии.

Одна из стратегий в поиске БАВ природного происхождения состоит в создании коллекции экстрактов потенциальных микроорганизмов-продуцентов, а также оценки спектра их биологической активности. Из дикорастущих растений, собранных на территории Приморского края, выделено 30 изолятов, относящихся к группе фомоидных микромицетов. Цель данной работы состояла в том, чтобы провести скрининг экстрактов данных изолятов и отобрать наиболее перспективных продуцентов биологически активных метаболитов.

Идентификацию выделенных изолятов осуществляли по морфолого-культуральным признакам, а также проводили секвенирование ITS-локуса рДНК. В рамках проведения скрининга были получены экстракты в результате культивирования изолятов на картофельно-глюкозном агаре. Метаболитные профили экстрактов анализировали с помощью метода ВЭЖХ-УФ/Вид-МС. Оценивали фитотоксическую активность комплексов метаболитов в отношении *Cirsium arvense*, *Triticum aestivum* и проростков *Lactuca sativa*. Исследовали антимикробную активность против *Bacillus subtilis* и энтомотоксическую в отношении *Galleria mellonella*. Из 30 исследованных экстрактов четыре проявили фитотоксическую активность в отношении *C. arvense*, девять – в отношении *T. aestivum*. Действие четырех экстрактов привело к ингибированию развития корней проростков *L. sativa*, шесть – супрессировали рост *B. subtilis*. Энтомотоксической активности метаболитов выявлено не было. В результате качественного анализа метаболитных профилей в составе экстрактов изолятов *Paraphoma* sp., продемонстрировавших высокую фитотоксическую активность, предварительно идентифицирован известный фитотоксин, феосферид А. Среди представителей грибов рода *Paraboeremia* найдены продуценты соединений из группы цитохалазинов. Экстракты данных микромицетов показали наиболее высокую фитотоксическую активность в отношении *T. aestivum*, обладали антимикробной активностью и ингибировали рост корней проростков *L. sativa*. Экстракт гриба, предварительно идентифицированного как *Dothiorella* sp., показал высокую фитотоксическую активность в отношении *C. arvense*, а метаболиты изолята, отнесенного к порядку *Pleosporales*, ингибировали рост *B. subtilis*. Однако, известные соединения в составе экстрактов данных грибов пока не были идентифицированы.

Таким образом, среди изолятов фомоидных микромицетов, выделенных из дикорастущих растений Приморского края, обнаружено несколько наиболее интересных продуцентов БАВ. Дальнейшие исследования будут направлены на более точную идентификацию данных изолятов, а также выделение и идентификацию продуцируемых ими метаболитов.

Исследование выполнено при финансовой поддержке гранта Российского научного фонда РФФ-NSFC (проект № 24-46-00005).

Мутантные аналоги ингибитора α -амилаз из морской анемоны *Heteractis magnifica*

А. С. Меньшов^{1*}, А. С. Парамонов², Д. В. Попкова¹, О. В. Синцова¹, З. О. Шенкарёв²,
И. Н. Гладких¹, Е. В. Лейченко¹

¹Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г. Б. Елякова ДВО РАН, г. Владивосток

²Государственный научный центр РФ Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина
и Ю. А. Овчинникова РАН, г. Москва

*электронная почта: al.bc-mensh@yandex.ru

Ингибирование действия α -амилаз является одной из стратегий терапии сахарного диабета и различных патологических состояний, связанных с повышенным уровнем сахара в крови. Применение препаратов на основе псевдоолигосахаридных ингибиторов влечет за собой ряд побочных эффектов, вызванных малой избирательностью действия. Белковые ингибиторы, выделенные из бактерий рода *Streptomyces*, обладают большей селективностью, но в то же время иммуногенны; для одного из них, тендамистата из *S. tendae*, рентгеноструктурным анализом комплекса со свиной панкреатической α -амилазой (РРА), показано, что высокая аффинность (с константой ингибирования (K_i) 9 пМ) достигается электростатическим соответствием ингибирующего мотива (-WRY-) и активного центра фермента. В 2015 году был охарактеризован комплекс РРА и синтетического аналога хелиантамида, пептида (44 а.о.) из морской анемоны *Stichodactyla helianthus*, являющегося первым выделенным из животных ингибитором α -амилаз [3]. Позже из морской анемоны *Heteractis magnifica* были выделены гомологи хелиантамида, магнификамиды. Установлено, что их действие осуществляется по механизму конкурентного ингибирования [4]. Полученный в результате экспрессии в *Escherichia coli* магнификамид-2 ($K_i \sim 0,02$ нМ), практически равный тендамистату и хелиантамиду ($K_i \sim 0,1$ нМ) по эффективности ингибировать α -амилазы, представляет интерес в качестве лекарственного препарата.

В работе исследована структура и динамика магнификамид-2 методом гетероядерной ЯМР-спектроскопии (вода, 30 °С, pH 6,0) с использованием ¹⁵N-меченного аналога пептида. Показано, магнификамид-2 как и большинство β -дефензин-подобных пептидов морских анемонов образует β -лист, состоящий из четырех β -тяжей. Данные о релаксации ядер ¹⁵N позволили установить, что ингибирующая петля магнификамид-2 (Y7-IYHGV-Y13) обладает высокой подвижностью в широком временном диапазоне, что, вероятно, необходимо для адаптации структуры пептида к сайту связывания фермента. Кинетический анализ показал снижение аффинности мутантных аналогов магнификамид-2 к РРА: точечные замены Y7A, Y9A, Y13A имели существенный эффект увеличения значений K_i вплоть до 20 нМ, тогда как замена H10R не привела к ожидаемому уменьшению K_i ($\sim 1,5$ нМ). Вероятно, эффективность ингибирования α -амилаз пептидами определяется гидрофобными контактами в сайте связывания фермента.

Исследование выполнено при финансовой поддержке гранта Российского научного фонда (<https://rscf.ru/en/project/21-74-20147/>).

Ссылки:

1. Vertesy L. *et al.* // Eur. J. Biochem. 1984. V. 141, N. 3. P. 505-512.
2. Wiegand G. *et al.* // J. Mol. Biol. 1995. V. 247, N. 1. P. 99-110.
3. Tysoe C. *et al.* // ACS Cent. Sci. 2016. V. 2, N. 3. P. 154-161.
4. Sintsova O. *et al.* // Mar. Drugs. 2019. V. 17, N. 10. P. 1-15.

Использование гетеросфероидов раковых клеток и опухоль-ассоциированных фибробластов для моделирования опухолевых межклеточных взаимодействий

А. В. Моисеева^{1,2*}, А. А. Белоусова^{1,3}, В. В. Плешкан^{1,4}, И. В. Алексеенко^{1,4}

¹ Государственный научный центр РФ Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова РАН, г. Москва

² Первый Московский государственный медицинский университет им. И. М. Сеченова, г. Москва

³ Национальный исследовательский ядерный университет «МИФИ», г. Москва

⁴ Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт», г. Москва

* электронная почта: sasha.moiseeva.03@mail.ru

Специфические клеточные контакты между эпителиальными раковыми клетками (РК) и опухоль-ассоциированными фибробластами (ОАФ) в составе опухоли способствуют прогрессии опухоли [1]. Трехмерные клеточные модели ближе к структуре опухоли человека и дают больше информации о межклеточных взаимодействиях, относительно культур монослойных клеток. Использование смешанных 3D ко-культур из РК и ОАФ дает возможность моделировать контакты в составе опухоли [2].

Целью исследования было проанализировать экспрессию поверхностных маркеров в 3D культурах первичных ОАФ и клеточных линий рака молочной железы (РМЖ), как релевантной модели исследований межклеточных взаимодействий опухоль-строма. Для этого была получена первичная клеточная линия ОАФ и использованы две клеточные линии: MCF7 и MDA-MB-231, для создания 3D ко-культур. Проведено окрашивание флуоресцентно мечеными антителами рецептора CD44 на поверхности опухолевых клеток. CD44 - это гликопротеин, играющий важную роль в межклеточных взаимодействиях, клеточной адгезии и миграции. Его сверхэкспрессия обнаружена почти во всех опухолях эпителиального происхождения [3]. Он играет важную роль в возникновении опухоли и ее метастазировании [4,5].

Сравнили разные 3D модели монокультур РК и ко-культур РК/ОАФ. Показано, что сфероиды на основе линии MDA-MB-231 были нестабильными, а наибольшее сходство с трехмерной клеточной моделью демонстрировали крупные гетеросфероиды MCF7/ОАФ. На этой модели было проведено окрашивание маркера CD44, и выявлено, что экспрессия CD44 гораздо выше в ко-культурах чем в монокультурах раковых клеток.

Таким образом, в ко-культурах MCF7/ОАФ происходит увеличение экспрессии CD44, которое предположительно происходит вследствие взаимодействия РК и ОАФ.

Исследование выполнено при финансовой поддержке гранта Российского научного фонда № 22-15-00483.

Ссылки:

1. Glabman R. A. *et al.* // Cancers. 2022. V. 14, N. 16. P. 3906-3920.
2. Ganguly D. *et al.* // Cancers. 2020. V. 12, N. 9. P. 2652-2634.
3. Ying F. *et al.* // Cell Mol Gastroenterol Hepatol. 2023. V. 15. N. 4. P. 985-999.
4. Lin Y. *et al.* // Neoplasia. 2019. V. 21, N. 12. P. 1133-1142.
5. Faezeh V. *et al.* // J Nanobiotechnology. Lett. 2023. V. 21, N. 1. P. 249.

Антимикробная активность некоторых антрахинонов морских грибов

Л. Е. Нестеренко*, Е. А. Юрченко, А. Н. Юрченко, Е. А. Чингизова

Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г. Б. Елякова ДВО РАН, г. Владивосток

*электронная почта: nesterenko_le@piboc.dvo.ru

Целью данного исследования было оценить антимикробную активность ряда антрахинонов, выделенных из морских грибов *Penicillium hispanicum* КММ 4689 и *Asteromyces cruciatus* КММ 4696.

Из морского гриба *Penicillium hispanicum* КММ 4689, культивированного в гипосолевых условиях, был выделен эндокротин. Этот метаболит в концентрации 25, 50 и 100 мкМ подавлял образование биоплёнок грамположительных бактерий *Staphylococcus aureus* на 11.9, 35.7 и 39.7% соответственно. Кроме того, он замедлял рост дрожжеподобных грибов *Candida albicans*. Антимикробная активность эндокротина ранее не была известна.

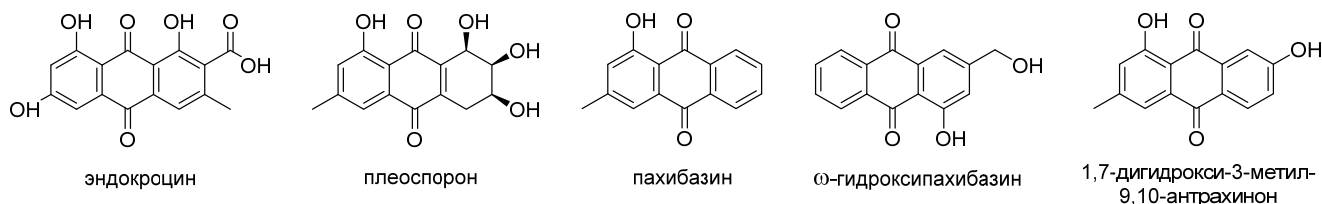


Рисунок 1 – Структуры выделенных антрахинонов

Антрахиноны, выделенные из морского гриба *Asteromyces cruciatus* КММ 4696, в разной степени ингибировали рост микроорганизмов и/или подавляли образование их биопленок. Плеоспорон ингибировал рост *S. aureus*, *Escherichia coli* и *C. albicans* на 50% в концентрациях 3.11, 35.04 и 2.63 мкМ соответственно. Ранее было показано, что плеоспорон ингибирует рост *S. aureus*, *E. coli* и *C. albicans* при значении МИК 64 мкг/мл (220.69 мкМ) [1]. Способность плеоспорона ингибировать образование биопленок *S. aureus*, *E. coli* и *C. albicans* на 50% в концентрациях 11.07, 18.72 и 10.44 мкМ соответственно была утановлена нами впервые.

Пахибазин в концентрации 100 мкМ подавлял рост *S. aureus* на 48.5%, а образование биопленок – на 44% в концентрации 50 мкМ и на 24.5% в концентрации 25 мкМ. ω-гидроксипахибазин подавлял на 50% рост *S. aureus* в концентрации 55 мкМ, а образование биопленок – на 45.6% в концентрации 100 мкМ. Очевидно, что наличие дополнительной гидроксильной группы в ω-гидроксипахибазине привело к усилению его антимикробного действия, и снижению способности подавлять образование биопленок. По литературным данным пахибазин в концентрации 32 мкг/мл (134.45 мкМ) подавлял рост *S. aureus*, *E. coli* и *C. albicans* на 53, 3.3 и 5.8 % соответственно [2].

1,7-дигидрокси-3-метил-9,10-антрахинон в концентрации 100 мкМ ингибировал рост *S. aureus*, *E. coli* и *C. albicans* на 48.6, 46.7 и 71.4%, при этом влиял на образование биопленок только *C. albicans*. Для этого соединения ранее была известна антимикробная активность только в отношении *E. coli* [3].

Исследование выполнено при финансовой поддержке гранта Министерства науки и высшего образования Российской Федерации 15.BRK.21.0004 (доп. соглашение № 075–15-2021-1052/9).

Ссылки:

1. Zhang C. *et al.* // Bioorg. Med. Chem. 2009. V. 17, N. 6. P. 2162-2166.
2. Cadelis M. M. *et al.* // Molecules. 2021. V. 26, N. 11.
3. Sun P. *et al.* // Chirality. 2013. V. 25, N. 2. P. 141-148.

Модифицированные направляющие РНК как компоненты систем CRISPR/Cas9

Д. С. Новопашина

Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, г. Новосибирск
электронная почта: danov@niboch.nsc.ru

Повышение эффективности и точности систем геномного редактирования является актуальной задачей современной молекулярной биологии и генетической инженерии. Особый интерес вызывает создание регулируемых систем CRISPR/Cas, активностью которых можно управлять с различных физико-химических стимулов, такие как, облучение светом, изменение pH, температура, изменение концентраций определенных веществ и др [1]. Многообещающим направлением в этой области является разработка подходов к регуляции активности на уровне направляющей РНК за счет введения определенных модификаций в структуру и последовательность направляющей РНК, а также вспомогательных олигонуклеотидов.

Целью данной работы является создание регулируемых систем CRISPR/Cas9 с использованием модифицированных направляющих РНК и блокирующих олигонуклеотидов.

Нами было выбрано два варианта регуляции системы: облучение светом определенной длины волны и аллостерическая регуляция. Был проведен дизайн и синтез линейных и циклических фоторасщепляемых направляющих РНК и вспомогательных олигонуклеотидов. Линейные направляющие РНК содержали фоторасщепляемые линкеры, позволяющие разрушить РНК путем облучения и, таким образом, отключить систему редактирования в определенный момент времени [2,3]. Циклические направляющие РНК не активны вплоть до облучения, а в результате облучения происходит их линейаризация и активация системы [4]. Линейные фоторасщепляемые блокирующие олигонуклеотиды ингибируют расщепление ДНК-мишени до облучения, а циклические - после облучения. Еще один вариант направляющих РНК содержал в своем составе линкеры на основе азобензола, изменяющего свою конформацию при облучении. Облучение в УФ-диапазоне приводит к переходу молекулы в цис-изомер, а облучение в видимом диапазоне приводит к образованию транс-изомера. Такой вариант модификации РНК позволяет обратимо изменять ее пространственную структуру и влиять на сродство РНК к ДНК-мишени, а также к белку Cas9, активируя или инактивируя систему геномного редактирования в зависимости от длины волны облучения. Для создания систем с аллостерической регуляцией нами были созданы направляющие РНК с внедренными в их структуру аптамером к теофиллину. В зависимости от положения аптамера в составе направляющей РНК система CRISPR/Cas9 может как активироваться, так и дезактивироваться в присутствии теофиллина.

Нами предложены подходы к созданию систем CRISPR/Cas9, действие которых можно регулировать светом или аллостерически.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ № 22-14-00294.

Ссылки:

1. Новопашина Д.С. и др. // Биофизика (обзор) 2024. Т. 69, № 3. С. 421-431.
2. Akhmetova E.A. *et al.* // Russ. J. Bioorg. Chem. 2024, V. 50, N. 4, P.1314–1324.
3. Новопашина Д.С. и др. Патент РФ 2765159. 26.01.2022.

Влияние фосфорилгуанидиновых модификаций в химерных направляющих РНК на активность системы CRISPR/Cas9

Д. В. Прохорова^{1*}, М. С. Купрюшкин¹, И. С. Довыденко¹, А. М. Матвеева¹, Г. А. Степанов¹

¹ Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, г. Новосибирск

*электронная почта: dvprohorova1994@mail.ru

В настоящее время самым распространенным инструментом для редактирования генома и регуляции экспрессии генов является система CRISPR/Cas9. Однако ее применение в терапии ограничено возникновением нецелевых эффектов, которые способны повлиять на целостность генома посредством неспецифических и нежелательных изменений в нем. Существуют различные методы для решения данной проблемы. Одним из перспективных подходов является включение модификаций в структуру направляющих РНК.

Ранее была продемонстрирована возможность использования РНК/ДНК-химерных направляющих для улучшения специфичности работы системы CRISPR/Cas9 [1,2]. В данной работе были сконструированы и описаны новые химерные направляющие РНК, содержащие как единичные, так и несколько фосфорилгуанидиновых (ФГ) групп.

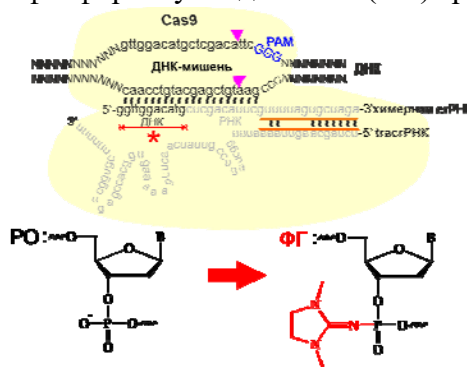


Рисунок 1 – Включение ФГ-модификаций в направляющие РНК системы CRISPR/Cas9

Впервые была продемонстрирована возможность формирования каталитически активных комплексов белка Cas9 с химерными направляющими РНК, содержащими ФГ-модификации (Рисунок 1). Было показано, что включение фосфорилгуанидиновых группировок в РАМ-дистальном районе направляющих РНК позволяет сохранить высокую эффективность гидролиза ДНК-субстратов и увеличить точность системы CRISPR/Cas9. Кроме того, ФГ-модификации в сравнении с известными и широко распространенными фосфоротиоатными группами и 2'-F модификациями значительно повышают специфичность Cas9 без существенного снижения эффективности расщепления *in vitro*. Также было выявлено, что систему CRISPR/Cas9 с ФГ-химерными направляющими РНК можно использовать для геномного редактирования клеток человека в культуре.

Таким образом, использование фосфорилгуанидиновых групп в структуре направляющих РНК позволяет контролировать активность и повышать специфичность системы CRISPR/Cas9.

Исследование выполнено при финансовой поддержке гранта Российского научного фонда № 21-64-00017.

Ссылки:

1. O'Reilly D. *et al.* // NAR. 2019.
2. Kim H. Y. *et al.* // Chem. Commun. 2019.

**Фармакологическая коррекция пептидными производным семакса и НАЕЕ
нейродегенеративных процессов при моделировании болезни Альцгеймера на мышах
линии APPswe/PS1dE9/Blg**

А. И. Радченко^{1*}, Е. В. Кузубова¹, М. В. Корокин¹, К. Д. Чапров²

¹Белгородский государственный национальный исследовательский университет, г. Белгород

²Институт физиологически активных веществ РАН, г. Черноголовка

*электронная почта: sandrinkaradchenko@gmail.com

Болезнь Альцгеймера представляет собой наиболее распространенную форму первичных дегенеративных деменций позднего возраста, которая характеризуется постепенным малозаметным началом в пресенильном или старческом возрасте, неуклонным прогрессированием расстройств памяти и высших корковых функций вплоть до тотального распада интеллекта и психической деятельности в целом, а также типичным набором нейropатологических признаков [1,2].

Одним из явных признаков наличия болезни Альцгеймера является наличие амилоидных включений. Для понимания фармакологического эффекта производного НАЕЕ - тетрапептида Ацетил-DGlu-DGlu-DAla-DHis-амида и производного лекарственного препарата Семакс, а именно гептапептида Ацетил-Met-Glu-Asp-Arg-Pro-Glu-Pro-амида в ходе исследования был проведен гистологический анализ животных линии APPswe/PS1dE9/Blg в возрасте 7. Введение субстанций было начато в возрасте 6 месяцев, продолжалось в течении 1 месяца, при этом инъекции производили с промежутком в 2 суток. В качестве препаратов сравнения для тетрапептида был взят Семакс, а для гептапептида – Пирацетам. На рисунке 1 изображено количество амилоидных включений в коре и гиппокампе головного мозга с учетом фармакологической коррекции.

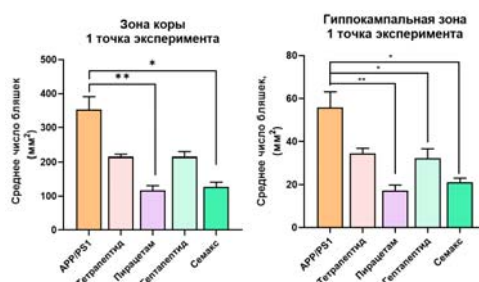


Рисунок 1 – Среднее число Аβ бляшек мозга с учетом фармакологической коррекции. ($p > 0,05$, * - $p < 0,1$, Критерий Колмогорова-Смирнова). $n = 10$

Результаты показали, что количество включений в коре у мышей в группе «Тетрапептид» в 1,6 раза меньше, чем у группы «APP/PSEN1», в группе «Пирацетам» в 3 раза меньше, в группе «Гептапептид» в 1,6 раза меньше, в группе «Семакс» в 2,8 раза меньше. В то же время, в гиппокампе в группе «Тетрапептид» в 1,6 раза меньше, чем у группы «APP/PSEN1», в группе «Пирацетам» в 3,2 раза меньше, в группе «Гептапептид» в 1,7 раза меньше, в группе «Семакс» в 2,6 раза меньше, что коррелирует с подсчетами бляшек в коре головного мозга животных, что свидетельствует о тенденции к меньшему числу включений у мышей, которым давали препарат.

Исследование выполнено при финансовой поддержке гранта Министерства науки и высшего образования Российской Федерации, соглашение № 075-15-2021-1346, а также соглашение № FZWG-2021-0016.

Ссылки:

1. Лысикова Е. А. и др. // Молекулярная биология. 2023. Т. 57, №. 1. С. 85-94.
2. Pan J. X. *et al.* // Communications biology. 2021. V. 4. P. 1326-1337.

Диатомовая микроводоросль *Nitzschia cf. thermaloides* как источник насыщенных жирных кислот

Н. С. Репкина^{1*}, В. П. Воронин¹, О. И. Давидович², Н. А. Давидович², С. А. Мурзина¹

¹Институт биологии – обособленное подразделение Федерального исследовательского центра «Карельский научный центр Российской академии наук», г. Петрозаводск

²Карадагская научная станция им. Т. И. Вяземского – природный заповедник Российской академии наук – филиал Федерального исследовательского центра «Институт биологии южных морей имени А. О. Ковалевского Российской академии наук», г. Феодосия

*электронная почта: nrt9@ya.ru

Вид *Nitzschia cf. thermaloides* обнаружен в водоемах грязевых вулканов восточного Крыма. Виды – экстремалы, представляют особый интерес, как с точки зрения фундаментальной науки при исследовании механизмов адаптации к нетипичным условиям среды, так и с прикладной точки зрения. Многие виды диатомовых способны синтезировать определенные биологически активные вещества, интересные с точки зрения биотехнологии. Известно, что микроводоросли представляют собой удобный объект для исследований, так как их возможно содержать в лабораторных условиях, а за счет манипуляций с условиями среды усиливать или снижать накопление целевых компонентов. Одним из важных лимитирующих факторов является соленность. Учитывая это, цель данной работы заключалась в исследовании жирнокислотного состава в зависимости от солености среды. Биомическое исследование данного вида проводилось впервые. Для анализа состава жирных кислот (ЖК) использовали метод ГХ-МСД с детектором «Маэстро-αМС» («Сайтегра», Россия). Разделение общих липидов на классы проводили методом ВЭТСХ с применением комплекса SAMAG (SAMAG, Швейцария).

Установлено, что *N. cf. thermaloides* выживает в широком диапазоне солености от 0 до 110‰. Клетки водоросли были способны вегетативно размножаться в среде с соленостью от 0 до 110‰. Процесс полового воспроизведения происходил в более узком диапазоне от 6 до 54‰ и оптимальная соленость для полового воспроизведения и вегетативного роста составляла 30‰. Анализ ЖК, показал, что *N. cf. thermaloides* преимущественно содержит насыщенные жирные кислоты (НЖК). Профиль НЖК в порядке убывания: 16:0, 18:0, 22:0, 20:0, 14:0, 15:0. При изменении солености среды их качественный состав не меняется, а их количественное содержание слабо варьирует. Данный факт, подчеркивает удобство содержания данного вида в лабораторных условиях, так как существует возможность его содержания в широком диапазоне солености без потери качественного и количественного состава НЖК. Установлены следовые количества 2,4-ди-трет-бутилфенола (2,4-DTBP) и 2-этоксиэтанол (2-ENMP), вторичных метаболитов, обладающих аутоксичными свойствами. Регистрируемая детектором интенсивность этих веществ у исследуемого вида стабильно выше в некоторых образцах при 110‰, 50‰ и 20‰. Полученный результат может иметь особое значение для отслеживания реакции отдельных компонентов экосистемы в ответ на изменение условий среды (в частности солености).

Работа выполнена в рамках государственного задания FMEN-2022-0006.

Вторичные метаболиты морского гриба *Penicillium chermesinum* 2104NT-1.3

А. Д. Савагина¹, Ngo Thi Duy Ngoc², А. Н. Юрченко³, Е. А. Юрченко^{3*}

¹Дальневосточный федеральный университет, г. Владивосток

²Nhatrang Institute of Technology Research and Application, Vietnam Academy of Science and Technology, Nha Trang, Vietnam

³Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г. Б. Елякова ДВО РАН, г. Владивосток

*электронная почта: eyurch@piboc.dvo.ru

Целью данной работы было выделение вторичных метаболитов из культуры вьетнамского морского гриба *Penicillium chermesinum* 2104NT-1.3 и их идентификация, а также исследование *in vitro* их кардиопротекторных эффектов.

Из морского гриба *Penicillium chermesinum* 2104NT-1.3, выделенного ранее из бурой водоросли *Hormorphysa cuneiformis*, собранной в заливе Нячанг (Вьетнам, Южно-Китайское море), было выделено четыре соединения (Рисунок 1).

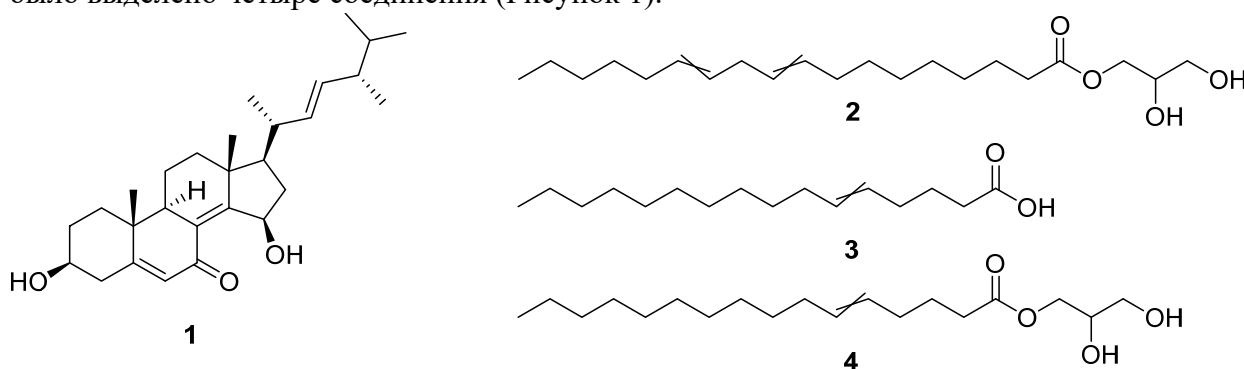


Рисунок 1 – Структуры выделенных соединений

Соединение 1 было идентифицировано как известный 3 β ,15 β -дигидрокси-(22*E*, 24*R*)-эргоста-5,8(14),22-триен-7-он, соединения 2-4 были идентифицированы как обычные грибные липиды: глицериновый эфир 9,12-октадиеновой кислоты (2), гексадека-5-еновая кислота (3) и ее глицериновый эфир (4).

Соединение 1 ускоряло прохождение клеточного цикла нормальными кардиомиоцитами линии H9c2 и, как следствие, скорость пролиферации. Более того, это соединение оказало защитное действие в отношении кардиомиоцитов в условиях гипоксии, имитированной с помощью хлорида кобальта (II). Экспериментальные данные и результаты молекулярного докинга указывают на то, что соединение 1 может действовать как агонист эстрогеновых рецепторов.

Исследование поддержано Вьетнамской академией науки и технологии (Vietnam Academy of Science and Technology, grant number VAST04.07/22-23).

Вторичные метаболиты морского микроскопического гриба
Penicillium yezoense КММ 4679 культивированного согласно стратегии OSMAC

М. А. Соловова^{1,*}, Н. П. Шлык¹, Г. В. Боркунов^{1,2}, Е. В. Лещенко^{1,2}

¹Дальневосточный федеральный университет, г. Владивосток

²Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г. Б. Елякова ДВО РАН, г. Владивосток

*электронная почта: solovova.ma@dvfu.ru

Рак молочной железы (РМЖ) является самой распространенной злокачественной опухолью, угрожающей женскому здоровью во всем мире. Метастазы опухоли являются основной причиной смертности от РМЖ. Возникновение резистентности к лекарственным препаратам ограничивает эффективность лечения [1]. Необходимы новые препараты, с повышенной эффективностью и сниженной токсичностью. Известно, что более 60% лекарственных препаратов созданы на основе природных соединений. Одним из ключевых направлений в разработке новых лекарственных средств является поиск «молекул-лидеров» среди природных соединений, проявляющие желаемую биологическую активность. Ранее из гриба *Penicillium yezoense* КММ 4679 выделен поликетид 1-ацетилпаллидопениллин А, принадлежащий серии паллидопениллинов и зостеропениллинов, который оказался мощным ингибитором образования колоний опухолевых клеток молочной железы MCF-7 (ИК₅₀ = 0.66 мкМ) при этом не проявляя цитотоксического эффекта в отношении нормальных клеток почки человека (HEK-298) при концентрации до 100 мкМ [2].

С целью изучения биосинтетического потенциала гриба *P. yezoense* КММ 4679 была применена стратегия OSMAC (один штамм-много соединений). Культивирование штамма КММ 4679 на рисовой среде с добавлением MgCl₂*9H₂O продемонстрировало увеличение разнообразия вторичных метаболитов, продуцируемых этим грибом. В результате, выделено шесть новых поликетидов серии паллидопениллинов и зостеропениллинов (Рисунок 1). Полученные результаты обеспечивают новые перспективы для изучения их биологической активности и потенциального применения в медицине и биотехнологии.

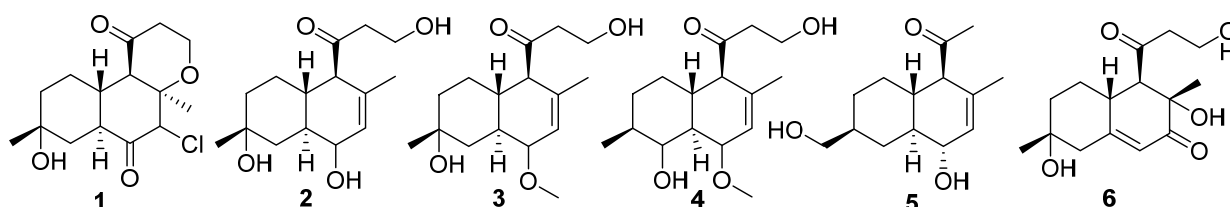


Рисунок 1 – метаболиты *Penicillium yezoense* КММ 4679 выделенные при культивировании согласно стратегии OSMAC

Исследование поддержано грантом РФФ № 22-73-00190.

Ссылки:

1. Wang, J., et al. / Breast Cancer: An overview of current therapeutic strategies, challenge, and perspectives. breast cancer: targets and therapy 2023. V. 15. P. 721-730. 10.2147/BCTT.S432526.
2. Leshchenko E.V., et al. // Mar. Drugs. 2024. V. 22, N. 7. P. 22070317.

* электронная почта: starnovskaya ss@piboc.dvo.ru

Исследование выполнено при финансовой поддержке гранта Министерства науки и высшего образования Российской Федерации 15.BRK.21.0004 (доп. соглашение № 075–15-2021-1052/9).

1. Zhuravleva O. I. *et al.* // Marine drugs. 2019. V. 17, N. 11. P. 616.

**Биологически активные вторичные метаболиты грибов рода *Aspergillus*,
ассоциированных с морскими губками**

О. О. Хмель^{1,2*}, Е. А. Чингизова¹, А. Н. Юрченко¹

¹Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г. Б. Елякова ДВО РАН, г. Владивосток

²Дальневосточный федеральный университет, г. Владивосток

*электронная почта: khmel.oo@dvfu.ru

Морские грибы являются основным источником новых низкомолекулярных соединений среди прочих морских организмов – более 40% новых морских природных соединений, выделяемых ежегодно из различных источников, являются вторичными метаболитами морских грибов [1]. В свою очередь грибы рода *Aspergillus* являются продуцентами более четверти всех новых соединений из морских грибов. При этом метаболиты грибов целого ряда морских экосистем, в частности грибы морских губок, остаются малоизученными.

В рамках данного исследования были изучены грибы *Aspergillus flavus* KMM 4695, *A. subramanianii* 1901NT-1.40.2, *A. versicolor* 1.5.1, выделенные из образцов губок, собранных в Южно-Китайском море. В результате разделения этилацетатных экстрактов грибов были выделены 15 индивидуальных вторичных метаболитов, в том числе четыре ранее не описанных в литературе. Структуры соединений были установлены при помощи ЯМР-спектроскопии и масс-спектрометрии высокого разрешения. Определение абсолютных стереоконфигураций осуществлялось с использованием хиральных производных, а также КД спектроскопии.

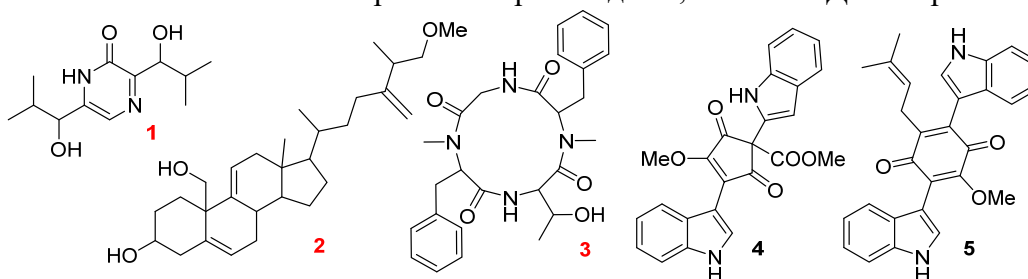


Рисунок 1 – Структуры некоторых соединений, выделенных из грибов *A. subramanianii* 1901NT-1.40.2, *A. versicolor* 1.5.1

Было показано, что кумбицин D проявил антибактериальную активность в отношении *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Candida albicans*. Все метаболиты гриба *A. subramanianii* в концентрации 1.5 мкМ ингибировали активность фермента уреазы. Кроме того, кумбицин D, петромуриин С и диметиловый эфир астеррихинола показывали цитотоксическую активность в отношении клеток рака молочной железы линии MCF-7.

Исследование выполнено при финансовой поддержке гранта Министерства науки и высшего образования Российской Федерации 15.BRK.21.0004 (доп. соглашение № 075–15-2021-1052/9).

Ссылки:

1. Carroll A. R. *et al.* // Natural Product Reports. 2024. V. 41. P. 162–207.

Применение цельноклеточных биосенсоров для исследования биоактивных соединений

А. А. Черенкова^{1,2*}, О. Е. Мелькина¹

¹Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт», г. Москва

²Российский химико-технологический университет им. Д. И. Менделеева, г. Москва

*электронная почта: anncheren@gmail.com

Цельноклеточный биосенсор – это микробная клетка, в геном которой встроены два основных элемента: регуляторная система и подконтрольные ей гены-репортеры (*lacZ*, *gfp*, *luxCDABE* или др.). В последнее время в качестве регуляторных элементов используются различные индуцируемые промоторы, сформированные в процессе эволюции и специфически реагирующие на наличие в среде химического вещества определенного типа [1]. Помимо детекции веществ, индуцируемые цельноклеточные биосенсоры позволяют изучать их биологическую активность, а также выявлять способы действия, лежащие в основе этой активности.

У бактерий *Escherichia coli* выделено несколько крупных регулонов, гены которых одновременно экспрессируются в результате действия на клетку токсических агентов: SOS-регулон (реакция на повреждение ДНК); регулон «теплового шока» (реакция на повреждение белков); регулоны окислительного стресса *soxRS* и *oxyRS* (реакция на активные формы кислорода); регулон, гены которого экспрессируются при повреждении мембран. Путем расположения генов люциферазы *luxCDABE* под промоторно-операторными областями данных регулонов сконструированы цельноклеточные *lux*-биосенсоры, биолюминесценция которых может свидетельствовать о характерном влиянии исследуемого вещества [2]. Например, с помощью *lux*-биосенсоров показано, что некоторые летучие органические соединения (лимонен, α -пинен, β -ионон) индуцируют промоторы, реагирующие на окислительный стресс, повреждения ДНК, белков или мембраны бактериальной клетки [3,4].

Подавляющая часть подобных биосенсоров основана на прокариотических организмах [1], однако у эукариот могут быть свои особенности клеточного ответа на биоактивные компоненты среды. В качестве модели эукариотического биосенсора авторами сконструирован штамм дрожжей *Yarrowia lipolytica*, в геном которого интегрирован промотор гена форматдегидрогеназы и транскрипционно-слитый с ним ген-репортер *hrGFP*.

Показано, что созданный биосенсор индуцируется ионами формиата с пороговой концентрацией 10 мкМ. Это сопоставимо с хроматографическими методами анализа и позволяет использовать биосенсор для детекции формиат-ионов в различных средах, что может быть актуально при мониторинге природных экосистем и различных технологических процессов [5]. Вместе с тем, полученный дрожжевой штамм может выступать в качестве платформы для создания специфических цельноклеточных биосенсоров с целью изучения влияния биоактивных соединений на клетки эукариот.

Работа выполнена в рамках Государственного задания НИЦ «Курчатовский институт».

Ссылки:

1. Moraskie M. *et al.* // Biosens. Bioelectron. 2021. V. 191.
2. Bazhenov S. V. *et al.* // Biosens. Bioelectron. 2023. V. 13.
3. Melkina O. E. *et al.* // Biomolecules. 2021. V. 11. P. 806.
4. Plyuta V. A. *et al.* // Res. Microbiol. 2024.
5. Liu A. *et al.* // Enzyme Microb. Technol. 2016. V. 91, P. 59–65.

Астеррипептиды А-С из морского микроскопического гриба *Aspergillus terreus* LM5.2 как новые перспективные препараты для лечения инфицированных ран

Е. А. Чингизова*, Е. А. Юрченко, Е. А. Пислягин, А. В. Климович, Е. С. Менчинская,
А. С. Кузьмич, А. Р. Чингизов, Д. Л. Аминин, А. Н. Юрченко
Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г. Б. Елякова ДВО РАН, г. Владивосток
*электронная почта: martyyas@mail.ru

Морские микроскопические грибы являются известным источником вторичных метаболитов с биологической активностью широкого спектра действия, включая антибактериальную. Известно, что за период с 1991 по 2023 год из морских грибов было выделено 366 пептидов, принадлежащих к разным классам, пятая часть которых обладала ингибирующим действием в отношении формирования биопленок и роста микроорганизмов [1]. Недавно в лаборатории химии микробных метаболитов ТИБОХ ДВО РАН были выделены новые циклопептиды с необычным фрагментом коричной кислоты астеррипептиды А-С (**1-3**) из гриба *Aspergillus terreus* LM5.2. Ранее мы показали для астеррипептидов **2** и **3** высокую ингибирующую активность в отношении фермента сортазы А [2].

В представленной работе мы изучали противовоспалительное и цитопротекторное действие соединений **1-3** в *in vitro* модели инфицированной *Staphylococcus aureus* раны и соединение лидер астеррипептидов С (**3**) было изучено на мышах в *in vivo* моделях ожоговой и лоскутной ран. Астеррипептиды А-С незначительно подавляли рост грамположительных бактерий *S. aureus*, при этом проявляя выраженное ингибирующее действие в отношении формирования биопленок. Инкубация клеток HaCaT с *S. aureus* приводила к значительному подавлению жизнеспособности клеток кератиноцитов, повышению уровня NO и ROS в клетках HaCaT и высвобождению цитокинов TNF- α и IL-18. Соединения **2** и **3** повышали жизнеспособность кератиноцитов и снижали уровень ROS в клетках. Астеррипептиды А-С снижали уровень NO в HaCaT и способствовали уменьшению выхода цитокинов. Инфицирование HaCaT бактериями *S. aureus* приводило к значительному ингибированию пролиферации клеток, блокировке клеточного цикла в фазе G1 и остановке миграции. Соединения **1-3** индуцировали нормализацию клеточного цикла и пролиферации, а также нивелировали негативное действие бактерий на миграцию HaCaT, а соединение **3** показало наиболее выраженный эффект в восстановление миграции. Мы также изучили противовоспалительный эффект **1-3** путем обработки клеток HaCaT рекомбинантным цитокином TNF- α , в результате которой наблюдалось повышение уровня продукции NO и снижению жизнеспособности клеток. Все астеррипептиды снижали уровень NO в клетках HaCaT и повышали их жизнеспособность, что свидетельствует об их противовоспалительном действии. Все проведенные *in vitro* эксперименты показали, что астеррипептид С (**3**) – самое перспективное соединение для дальнейшего изучения его свойств в *in vivo* моделях ожоговой раны и лоскутной раны, инфицированной *S. aureus* (10^9 КОЕ/мл). Было отмечено, что нанесение гидрогелевой основы с астеррипептидом С на ожоговую рану приводило к ускорению ее заживления. Более того, было отмечено, что ожоговая рана у мышей сопровождалась двукратным увеличением концентрации нейтрофилов и тромбоцитов в образцах периферической крови, а применение гидрогеля с астеррипептидом С приводило в норму эти показатели. Лечение гидрогелем с астеррипептидом С лоскутных ран, ускоряло заживление, снижало уровень их инфицированности и нормализовало лейкоцитарный профиль образцов крови. Таким образом, астеррипептиды А-С являются перспективными соединениями с антибактериальным и противовоспалительным действием.

Исследование выполнено при финансовой поддержке гранта Российского научного фонда № 23-24-00471.

Ссылки:

1. Hafez Ghoran S. *et al.* // Mar. Drugs 2023. V. 21, N. 10. P. 510-592.
2. Girich E. V. *et al.* // Mar. Drugs 2022. V. 20, N. 1. P. 77-88.

Структура и биологическая активность вторичных метаболитов морского
микроскопического гриба *Aspergillus niveoglaucus* КММ 4176

Н. П. Шлык^{1,2*}, Е. А. Чингизова¹, А. Р. Чингизов¹, Е. В. Лещенко^{1,2}

¹Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г. Б. Елякова ДВО РАН, г. Владивосток

²Дальневосточный федеральный университет, г. Владивосток

*электронная почта: shlyk.np@dvfu.ru

Известно, что морские микроскопические грибы зарекомендовали себя как перспективный источник новых биологически активных метаболитов [1,2]. В рамках поиска новых грибных штаммов-источников вторичных метаболитов был проведен широкомасштабный скрининг более чем трехсот штаммов из Коллекции морских микроорганизмов (КММ) ТИБОХ ДВО РАН. В рамках скрининга для культивирования и выделения индивидуальных соединений был отобран штамм гриба *Aspergillus niveoglaucus* КММ 4176, изолированный из зеленой водоросли *Ulva fenestrata*. Структуры выделенных соединений **1–4** с помощью масс-спектрометрии высокого разрешения и ЯМР-спектроскопии были идентифицированы как известные грибные метаболиты эмодин антрон (**1**), 4-гидроксиэмодин антрон (**2**), алоэсон (**3**) и неоэхинулин В (**4**) (Рисунок 1).

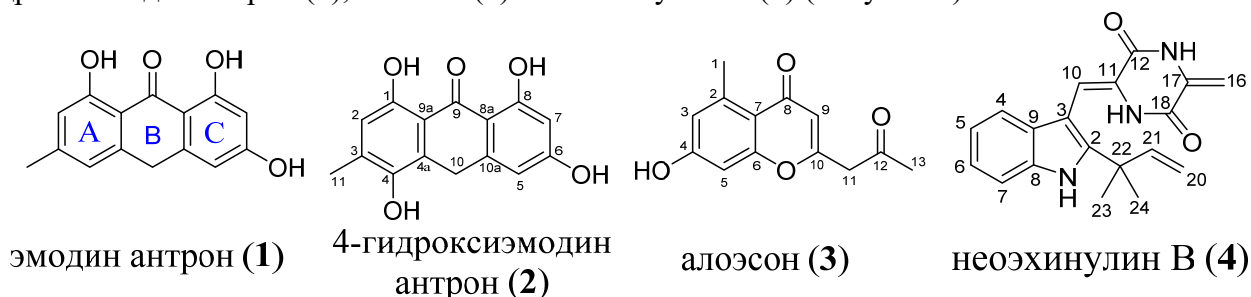


Рисунок 1 – Структуры выделенных индивидуальных соединений

Была исследована антимикробная активность соединений **1–4** в отношении тест-культур микроорганизмов *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* и *Candida albicans*, а также их влияние на формирование биопленок. Установлено, что исследованные соединения **1–4** в концентрации 100 мкМ ингибировали рост тест-культур только на 11–28%, но значительно подавляли образование биопленок грамположительных бактерий *Staphylococcus aureus*. С помощью бесклеточной тест-системы было определено, что соединения **1–4** ингибируют активность фермент сортаза А, который играет важную роль в формировании биопленок грамположительными бактериями. Используя метод молекулярного докинга, было показано взаимодействие соединений **1–4** с активным центром этого фермента.

Исследование выполнено при финансовой поддержке гранта Министерства науки и высшего образования Российской Федерации 15.BRK.21.0004 (доп. соглашение № 075–15-2021-1052/9).

Ссылки:

1. Carroll A. R. *et al.* // Natural Product Reports. 2024. V. 41. P. 162–207.
2. Rateb M. E. *et al.* // Journal of Natural Products. 2011. V. 28. P. 290–344.

Оценка уровня маркеров нейродегенерации головного мозга у трансгенных мышей P301S при применении фармацевтической композиции НАЕЕ-Zn-HAS

В. С. Шмигера

Белгородский государственный национальный исследовательский университет, г. Белгород
электронная почта: belyaeva_v@bsu.edu.ru

Нейродегенеративные заболевания характеризуются широким спектром патологических состояний, поражающих нейроны и вызывающих проблемы с движениями и психическими функциями, влекут за собой гибель нейронов. У данных заболеваний есть свои отличительные особенности, которые различаются по своим патогенетическим механизмам. Они включают невропатологию, анатомическую уязвимость и агрегацию белков при болезненных состояниях [1]. Болезнь Альцгеймера (БА) генетически связанная с отложением тау-белка в мозге людей, где доминантные мутации в гене, кодирующем белок-предшественник амилоида, продуцирующий Аβ, и MAPT, который кодирует тау-белок и NFT (нейрофибриллярные клубки). NFT, присутствующие при БА человека, содержат равное соотношение 3R: 4R тау [2].

Цель исследования – произвести оценку уровня нейродегенерации головного мозга у трансгенных мышей P301S при применении фармацевтической композиции НАЕЕ-Zn-HSA.

Для оценки уровня нейродегенерации был выбран анализ уровня экспрессии белков GFAP, S100β и NSE.

В экспериментальной группе трансгенных мышей P301S, получавших Пирацетам наблюдалось снижение уровня экспрессии белка GFAP на 33% ($p < 0,0001$) по сравнению с группой положительного контроля. Так же наблюдались снижение показателей уровня экспрессии белка S100β в группе данных животных на 39% ($p < 0,0001$) по сравнению с группой положительного контроля. Показатели экспрессии белка NSE в группе данных животных были ниже на 42%, ($p < 0,0001$) по сравнению с группой положительного контроля. Уровень экспрессии белка GFAP у трансгенных мышей P301S, которые получали фармацевтическую композицию НАЕЕ-Zn-HSA, был снижен на 65% ($p < 0,0001$) по сравнению с группой положительного контроля. Так же наблюдалось снижение показателей уровня белка S100β на 65%, ($p < 0,0001$) по сравнению с группой положительного контроля. Наблюдалось снижение уровня экспрессии белка NSE в данной группе на 62%, ($p < 0,0001$) по сравнению с группой положительного контроля.

Выводы: НАЕЕ-Zn-HSA продемонстрировал более выраженное снижение уровня GFAP, S100β и NSE, чем Пирацетам. Это говорит о более выраженном нейропротекторном эффекте НАЕЕ-Zn-HSA по сравнению с Пирацетамом в модели таупатии P301S. НАЕЕ-Zn-HSA может иметь нейропротекторные свойства, защищая астроциты от повреждения, что приводит к снижению экспрессии GFAP и S100β. Этот эффект может быть частью компенсаторного механизма, направленного на восстановление нейронной функции.

Работа с животными была поддержана грантом МИНОБРНАУКИ России (Соглашение № 075-15-2021-1346). Разработка автоматизированной системы проводилась при финансовой поддержке государственного задания лаборатории генетических технологий и геномного редактирования для биомедицины и ветеринарии (FZWG-2024-0003).

Ссылки:

1. Jellinger K. A. // J. Cell. Mol. Med. 2010. V. 14, N. 3. P. 457-487.
2. Maccioni R. B. *et al.* // Arch. Med. Res. 2001. V. 32, N. 5. P. 367-381.

Двадцать пять лет исследований вторичных метаболитов грибов Коллекции морских микроорганизмов ТИБОХ ДВО РАН

А. Н. Юрченко*, М. В. Пивкин

Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г. Б. Елякова ДВО РАН, г. Владивосток
*электронная почта: yurchenkoan@riboc.dvo.ru

Единственная в России Коллекция морских микроорганизмов содержит более 1000 штаммов морских грибов, выделенных, главным образом, из различных экосистем морей Тихоокеанского региона. С конца 1990-х годов в Лаборатории химии микробных метаболитов ТИБОХ ДВО РАН началось изучение вторичных метаболитов грибов Коллекции морских микроорганизмов, и к настоящему моменту исследованы биосинтетические способности более 80 штаммов грибов, относящихся к родам *Acremonium*, *Amphichorda*, *Aspergillus*, *Asteromyces*, *Beauveria*, *Chaetomium*, *Curvularia*, *Eurotium*, *Geomyces*, *Gliocladium*, *Humicola*, *Isaria*, *Lopadostoma*, *Myceliophthora*, *Paragliomastix*, *Penicillium*, *Stilbella*, *Thermomyces*, *Tilachlidium*, *Trichoderma*, *Walemia* и *Wardomyces*. Из изученных штаммов грибов было выделено более 400 индивидуальных соединений, в том числе более 200 новых, среди которых есть представители всех основных классов низкомолекулярных природных соединений: углеводы, жирные кислоты, терпеноиды, поликетиды, меротерпеноиды, алкалоиды и пептиды.

Некоторые из полученных соединений характеризуются структурными элементами, уникальными не только для грибов, но и в целом для природных соединений. Так, из гриба *Amphichorda* sp. КММ 4639 были выделены не имеющие аналогов пиран-содержащие поликетиды: полигидроксильированные хроменовые производные с 1,3,5 – ортоацетатным и хлороалленовым фрагментами. Гриб *Penicillium antarcticum* КММ 4685 продуцировал целый ряд меротерпеноидов с уникальными 6/5/6/6, 6/5/6/5/6 и 6/5/6/5 полициклическими системами, а облигатный морской микромицет *Asteromyces cruciatus* КММ 4696 способен синтезировать единственное в своем роде антрахиноновое производное с 6/6/5-циклической системой.

Для многих выделенных вторичных метаболитов показана разнообразная биологическая активность: антимикробная, цитопротекторная, цитотоксическая, а некоторые соединения являются перспективными кандидатами для дальнейшей разработки лекарственных препаратов.

Исследование выполнено при финансовой поддержке гранта Министерства науки и высшего образования Российской Федерации 15.BRK.21.0004 (доп. соглашение № 075–15-2021-1052/9).

АВТОРСКИЙ УКАЗАТЕЛЬ

Ngo Thi Duy Ngoc	96
Агеенко А. Б.	69
Агеенко Н. В.	65
Адедибу П. А.	14
Аксёнов-Грибанов Д. В.	41
Алейнова О. А.	29, 33
Алексеев И. В.	85, 90
Алферова В. А.	78
Аминин Д. Л.	101
Амирджанов Ф. Ф.	66
Ананьев А. А.	29
Антосюк О. Н.	68
Балабанова Л. А.	14, 48
Балдаев С. Н.	15
Барашкова А. С.	62
Бардашева А. В.	74
Белоусова А. А.	90
Бельшенко А. Ю.	41
Берестецкий А. О.	88
Береш А. А.	29
Бизикашвили Е. Т.	16
Благинина А. А.	76
Бобко Н. И.	72, 76
Бойко А. В.	15
Бондарев Г. А.	48
Боркунов Г. В.	67, 97
Бороздина Н. А.	61
Бурьгин Г. Л.	28, 49
Бывакина А. А.	69
Быстрицкая Е. П.	17, 25, 35
Бычкова А. А.	30
Вавилина Т. Н.	41
Вайнутис К. С.	18
Валидов Ш. З.	45
Валлиахметов Э. Э.	45
Василевская А.-В. В.	68
Васильева Н. С.	69
Винников К.А.	19
Волкова И. И.	23
Воронин В. П.	95
Воронина Е. Н.	31

Воронова А. Н.	18
Воротнева А. П.	70
Галенко-Ярошевский П. А.	71
Геворгиз Р. Г.	72, 76
Гладких И. Н.	61, 82, 84, 89
Глухова Л. Б.	32, 40
Глущенко М. Ю.	32
Голышев В. М.	73, 74
Горленко Е. С.	73
Гризанова Е. В.	44, 50, 52, 56
Гузев К. В.	35
Давидович Н. А.	95
Давидович О. И.	95
Данилин Н. А.	74
Деснева К. Д.	30
Днепровская А. А.	33
Довыденко И. С.	93
Доколин Д. А.	34
Должикова О. А.	51
Дреничев М. С.	64
Дубовский И. М.	37, 44, 50, 52, 56
Дырхеева Н. С.	64
Дьяченко И. А.	61, 75
Евланенков К. К.	71
Еремеев В. И.	17, 21, 25, 47
Ермошин А. А.	68
Ефимова С. С.	60
Жгун А. А.	53
Железнова С. Н.	72, 76
Загребяев А. Д.	66
Зайцева Ю. В.	20, 30, 34, 43
Захаренко А. Л.	64
Захарова Е. Е.	42
Зеньков А. В.	77
Злобин И. В.	20, 43
Зотова П. А.	78
Зубков И. Н.	70
Иващенко А. И.	21
Ильин И. Е.	35
Имидоева Н. А.	41
Исаева К. В.	15

**II Всероссийская научная школа-конференция молодых ученых и студентов
«Генетические технологии в исследованиях природных соединений»**

Исаева М. П.	15, 17, 21, 22, 25, 26, 32, 35, 39, 42, 46, 47, 55, 82
Исламов Б. Р.	45
Ищук С. А.	79, 81
Кабанова А. В.	80
Казакова А. В.	81
Казанцева Д. И.	23
Казыргүлова А. А.	54
Калина Р. С.	82
Карначук О. В.	32, 36, 40, 42
Кашеверов И. Е.	83
Кветкина А. Н.	55, 60
Ким С.-Г.	17
Киричук Н. Н.	38, 46
Киселев К. В.	29, 33, 65
Климович А. А.	55, 84
Климович А. В.	101
Ковалева Е. Г.	58
Коваль О. А.	13
Кожевникова Ю. В.	84
Козлов С. А.	71
Козлова А. С.	37
Кокоулин М. С.	26
Комарова Е. С.	78
Комиссаров Э. Н.	45
Кондратьева Л. Г.	59, 85
Корниенко Т. Е.	64
Корокин М. В.	24, 94
Королева А. Г.	27
Кочнева Г. В.	13
Крохмалёва Я. В.	38
Крыцына Т. И.	44, 56
Крюкова Е. В.	83
Кудряшева Н. С.	77
Кузнецов Н. А.	12
Кузнецова А. А.	57
Кузубова Е. В.	24, 94
Кузьмич А. С.	101
Кулигина Е. В.	13, 69
Купрюшкин М. С.	93
Куриленко В. В.	35, 39, 47
Лаврик О. И.	64
Лазарев В. Н.	86
Лейберова А. К.	58

Лейченко Е. В.	55, 60, 61, 82, 84, 87, 89
Лещенко Е. В.	67, 97, 102
Лимаев И. С.	24
Линге И. А.	85
Личманюк Д. О.	39
Лукина А. П.	32, 40, 42
Лукина Е. Г.	88
Лукьянов Д. А.	78
Лысюк П. А.	35
Майор Т. Ю.	27
Мальгина Е. В.	41
Маркова А. Ю.	59
Масленникова В. С.	37
Матвеев А. Л.	74
Матвеева А. М.	93
Матора Л. Ю.	28
Мелькина О. Е.	100
Менчинская Е. С.	101
Меньшов А. С.	61, 89
Меньшов А. С.	61
Михель И. М.	62
Мишукова О. В.	31
Моисеева А. В.	90
Мурзина С. А.	95
Наумов И. В.	72
Недашковская О. И.	17, 25
Нестеренко Л. Е.	91
Нехорошев М. В.	72, 76
Нитяговский Н. Н.	29, 33
Новопашина Д. С.	51, 73, 74, 92
Онасенко К. А.	66
Осмаков Д. И.	71
Остроумова О. С.	60
Отставных Н. Ю.	17, 25, 39, 55, 82
Павленко А. П.	60
Парамонов А. С.	89
Пеньёр С.	82
Перова Е. Д.	43
Пивкин М. В.	38, 104
Пислягин Е. А.	55, 101
Плешкан В. В.	85, 90
Попкова Д. В.	61, 84, 89
Попов Р. С.	98
Прийменко Н. А.	82, 84

**II Всероссийская научная школа-конференция молодых ученых и студентов
«Генетические технологии в исследованиях природных соединений»**

Прозоров А. И.	54
Прохорова Д. В.	93
Радченко А. И.	24, 94
Ракитин А. В.	40
Репкина Н. С.	95
Рихтер В. А.	13, 69
Рогожин Е. А.	62
Романенко Л. А.	21, 26
Русанов И. И.	32, 40, 42
Савагина А. Д.	96
Савичева Ю. В.	26
Саковина Л. В.	73
Сапожникова Ю. П.	27
Свиридов Б. В.	54
Сейткалиева А. В.	48
Сергиев П. В.	78
Сидорова Т. В.	27
Сикорская Т. В.	16
Сингх М.	18
Синельников И. Г.	58
Синцова О. В.	61, 89
Слепченко Л. В.	48
Смирнова Н. В.	31
Снежков Е. В.	85
Соколов М. Н.	20, 43
Соколова Е. А.	31
Соколянская Л. О.	32, 40, 42
Соловова М. А.	97
Сон О. М.	14
Старновская С. С.	98
Степанов Г. А.	93
Степенко Ю. В.	63
Супрун А. Р.	29
Суханов А. Ю.	45
Суханова Л. В.	27
Сушко Е. С.	77
Сысуев А. С.	43
Табанюхов К. А.	37

Текутьева Л. А.	14
Терехов С. С.	78
Терещенко Д. С.	44
Тимофеев С. С.	80
Титгат Я.	82
Троменшлегер И. Н.	31
Трофимов Б. А.	71
Уткин Ю. Н.	83
Фадеева Ю. В.	28
Фролов М.	45
Хлистун И. В.	31
Хмель О. О.	99
Хмелькова Е. И.	88
Худякова Ю. В.	38, 46
Цетлин В. И.	83
Чапров К. Д.	94
Чаусова В. Е.	35, 38, 46
Черезова В. М.	27
Черенкова А. А.	100
Чернышова И. А.	64
Чингизов А. Р.	101, 102
Чингизова Е. А.	67, 91, 99, 101, 102
Шаматова М. М.	71
Шамшурина Е. В.	16
Шевцова С. Е.	47
Шелихова Е. В.	37
Шелухина И. В.	83
Шенкарёв З. О.	89
Шишлянников С. М.	70
Шлык Н. П.	67, 97, 102
Шмигерова В. С.	103
Шпатова Т. В.	37
Шульга Е. Ю.	45
Щеголев С. Ю.	28
Щуряков Д. С.	23
Юрченко А. Н.	35, 91, 96, 98, 99, 101, 104
Юрченко Е. А.	91, 96, 101
Яковлев И. А.	24

ООО «Компания Хеликон» — один из ведущих российских поставщиков лабораторного оборудования, реагентов и расходных материалов с 1997 года.

Компания оказывает комплекс услуг и сопровождает Клиентов на всех этапах — помогает в проектировании лабораторий, подбирает и доставляет необходимую продукцию, проводит пуско-наладку оборудования, обучает персонал на местах, обеспечивает квалифицированное сервисное обслуживание.

20 000+

наименований
продукции

60+

производителей



Развитая логистическая
и складская сеть



доставка
в кратчайшие сроки

Направления деятельности:

- Молекулярная и клеточная биология.
- Клиническая диагностика.
- Ветеринария.
- Пищевая безопасность.
- Агрогеномика.
- Биоиндустрия.
- Криминалистика.



Для своих ключевых клиентов Компания предоставляет возможность тестирования продукции до принятия решения о покупке.

«Компания Хеликон» также имеет собственную производственную базу и выпускает лабораторное оборудование, расходные материалы и мебель под торговой маркой Helicon.

Региональные представительства Компании находятся в Санкт-Петербурге, Новосибирске, Казани, Ростове-на-Дону, Владивостоке и Екатеринбурге.

helicon

ЛУЧШИЕ РЕШЕНИЯ ДЛЯ ЛАБОРАТОРИИ

Единый телефон

8 800 770 71 21

бесплатный звонок по России

Адрес: 121374, Москва,
Кутузовский проспект, д. 88

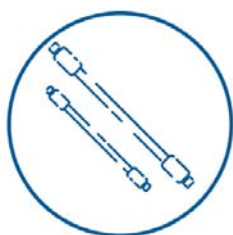
E-mail: mail@helicon.ru

Сайт: www.helicon.ru





КОМПЛЕКСНОЕ ОСНАЩЕНИЕ ЛАБОРАТОРИЙ



Хроматографические
колонки



Стандартные
образцы



Растворители
для ВЭЖХ / ОСЧ



Аналитические
приборы



Лабораторное
оборудование



Оборудование
Life Sciences



Микробиология



Химические
реактивы



Биохимические
реактивы

chimmed.ru



Более 20 тысяч позиций в наличии на складе в Москве!

ООО «ТД «ХИММЕД»

Москва, 115230, Каширское шоссе, дом 3, корпус 2, строение 4, этаж 6
Тел.: +7 495 640 4192, mail@chimmed.ru

Новосибирск, 630090, проспект Академика Лаврентьева, 6/1
Тел.: +7 383 330 9346, sibir@chimmed.ru

СИНТОЛ НАУЧНО-ПРОИЗВОДСТВЕННАЯ КОМПАНИЯ

Обеспечивает **качественный**,
быстрый и **надёжный** синтез независимо
от объёмов и сложности продукта



ПЦР



Реагенты



Секвенирование нового поколения



Генетика



Лабораторный пластик



Молекулярная биология



Оборудование



Подбор праймеров и зондов



Олигонуклеотиды



Синтол — лидер на отечественном рынке
олигонуклеотидного синтеза

Компания СИНТОЛ

Москва, 127434, Тимирязевская, д. 42, корпус Б, офис 316

Тел.: +7 (495) 984-69-93 многоканальный

E-mail: syntol@syntol.ru; syntol@mail.ru

<https://www.syntol.ru/>



**Компания БМТ - поставщик современного
лабораторного оборудования и расходных
материалов для научных исследований**



**Расходные
материалы**



Ламинарные боксы



Инкубаторы



**Фармацевтические
холодильники**



Антитела



ИФА наборы



БМТ делает медицинские технологии доступней

ООО «БМТ»

Москва, 117342, ул. Бутлерова, д. 17Б

Тел.: +7 (495) 504-15-52

E-mail: info@bmtltd.ru

www.bmtltd.ru



Мировые бренды

для научных
открытий



Реагенты и оборудование

для молекулярной
и клеточной биологии,
генной инженерии



SkyGen

Вдохновляем на научные открытия!



Новые направления:

ветеринария,
клинико-лабораторная
диагностика, фармацевтика,

info@skygen.com

www.skygen.com

8 (800) 333-12-26



Установка и сервис

оборудования
от проверенных
производителей

skyklad

ОНЛАЙН-ПЛОЩАДКА ТОВАРОВ ДЛЯ ЛАБОРАТОРИЙ

- Быстрая доставка по всей России от 3-х дней
- Товары со складов разных поставщиков объединены на одной площадке
- Простое оформление заказа и онлайн оплаты



www.klad.skygen.com

| 8 800 500 94 42

| klad@skygen.com



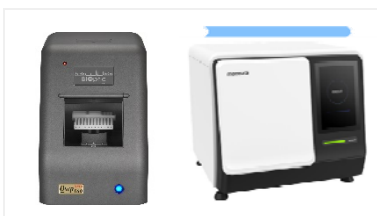
ООО Промышленно-торговая фирма
«Корпус»

г. Владивосток, ул. Дальзаводская, 27 «Б», тел/факс (423) 2222-616

E-mail: 222616@ptf-korpus.ru сайт www.ptfkorpus.ru

<http://vladivostok.simple-pro.com> (сайт по лабораторной мебели)

***Поставка аналитического и лабораторного оборудования,
гарантийное и постгарантийное обслуживание.
Оптимальные решения для лабораторий.***



➤ **Оборудование для молекулярно-генетических исследований**

Секвенаторы, амплификаторы, оборудование для электрофореза



➤ **Общелабораторное оборудование и приборы**

Центрифуги, шейкеры, весы, микроскопы, дозаторы, рН-метры/ионометры, сушильные шкафы, печи муфельные, термостаты, дистилляторы, системы криохранения



➤ **Лабораторная посуда, реактивы и расходные материалы**



➤ **Лабораторная мебель**

Повышенное внимание к потребностям каждого заказчика



ПЦР



Иммунология



Биохимия



Клеточная
биология



Бактериология



Лабораторный
пластик



Комплексное оснащение
ваших лабораторий с ProfiLab
www.pfgroup.ru

