

СБОРНИК ТЕЗИСОВ КОНФЕРЕНЦИИ

ГЕНОМИКА, МЕТАГЕНОМИКА И МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ

Сколтех
19-20 ноября 2022 года

Циркуляцию патогенных микроорганизмов СПб ГБУЗ ДБГ № 2 святой Марии Магдалины в 2019-2021 годах и влияние новой коронавирусной инфекции (2019-nCoV)

Альшаник Л.П.¹, Маслова Н.А.², Афиногенова А.Н.¹

¹ ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Пастера», Санкт-Петербург, Россия

² Детская городская больница №2 Святой Марии Магдалины, Санкт-Петербург, Россия

В XXI веке проблема антибиотикорезистентности приобрела большую значимость во всем мире. Резистентность к антибиотикам имеет огромное социально-экономическое значение и в развитых странах мира рассматривается как угроза национальной безопасности. Согласно оценкам международных экспертов, антимикробная резистентность является причиной более 700 тысяч смертельных случаев ежегодно (в том числе в Европе - 22 тысячи случаев). Предполагается, что к 2050 году эта цифра может увеличиться до 10 млн. человек.

Цель исследования. Оценить влияние новой коронавирусной инфекции на циркуляцию и антибиотикоустойчивость патогенных микроорганизмов в многопрофильном детском стационаре. При анализе мониторинга и изменения уровня циркуляции штаммов, выделенных у пациентов в период 2019-2021 годов, учитывали наиболее важные возбудители госпитальных инфекций (ESKAPE): *Enterococcus faecium* устойчивый к ванкомицину; *Staphylococcus aureus* устойчивый к цефокситину; *Klebsiella pneumoniae* устойчивый к меропенему; *Pseudomonas aeruginosa* устойчивый к меропенему и имепенему; *Enterobacter* spp. (*Escherichia coli*) устойчивый к меропенему. *Acinetobacter baumannii* устойчивый к имепенему, меропенему;

Материалы и методы. Материал от пациентов стационара всех отделений. Видовую идентификацию бактерий, оценку их этиологической значимости, определение чувствительности к антибактериальным препаратам проводили классическими бактериологическими методами и на баканализаторе Microscan AutoScan-4.

Результаты. Получены профили чувствительности для *Enterococcus faecium* устойчивых к ванкомицину; *Staphylococcus aureus* устойчивых к цефокситину; *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* устойчивых к меропенему, имепенему; *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* устойчивых к меропенему. У *S. aureus* за 2020 год снизилась высеваемость, но увеличилось количество устойчивых штаммов с 3% до 4,8%. Высеваемость *K. pneumoniae*, *E. coli* увеличилась с 30% до 37% при неизменных профилях чувствительности. Для *P. aeruginosa* в 2020 году отмечено снижение высеваемости при росте устойчивости к меропенему. В 2021 году отмечена тенденция к снижению высеваемости и устойчивости указанных патогенов к антибиотикам, но при этом наблюдали активный рост *A. baumannii* и усиление его устойчивости к карбапенемам.

Заключение. В 2020-2021 годах по сравнению с 2019 годом отмечено влияние новой коронавирусной инфекции на снижение высеваемости изолятов многопрофильного детского стационара и усиление их устойчивости к антибиотикам. При этом наблюдали активное обнаружение изолятов *A. baumannii*, устойчивых к карбапенемам. Необходим дальнейший мониторинг так, как лечение резистентных инфекций, вызванных грамотрицательной микрофлорой, является длительным, трудоемким, высокочувствительным процессом; требует длительной жизнеспасательной антибактериальной терапии препаратами резерва.

Бактериофаг T3 обходит BREX защиту за счет расщепления и ингибирования синтеза S-аденозилметионина

Андрянов Александр¹, Алена Дробязко¹, Сильвия Тригуис², Мария Селмер², Северинов Константин³, Исаев Артём¹

¹ Сколковский институт науки и технологий, Москва

² Университет Уппсалы, Швеция

³ Институт Микробиологии Ваксмана, Нью Джерси, США

S-аденозилметионин (SAM) лиаза (SAMаза) бактериофага T3 является ингибитором SAM-зависимых систем защиты бактерий. Ферментам рестрикции-модификации (R-M) I типа требуется SAM в качестве донора метильных групп для модификации ДНК и в качестве кофактора для рестрикции немодифицированной ДНК. Ранее было показано, что экспрессия SAMазы во время инфекции фагом T3 ингибирует обе функции этих защитных систем. Мы обнаружили, что T3 SAMаза также ингибирует защитную систему BREX типа I из *Escherichia coli* штамма HS.

Бактериофаг T3 дикого типа способен эффективно заражать BREX культуру, в то время как мутант T3, лишенный гена *0.3*, кодирующего SAMазу, не способен развиваться в клетках, несущих BREX систему. Кроме того, мы обнаружили, что оверэкспрессия SAMазы оказывает лишь незначительное влияние на метилирование BREX сайтов, при этом полностью ингибирует защитную функцию BREX системы. Мы предполагаем, что подобно R-M системам I типа, SAM необходим в качестве кофактора для активного этапа BREX защиты.

Мы обнаружили дополнительный механизм, который вносит свой вклад в анти-BREX активность фага T3. SAMаза эффективно образует комплексы с SAM-синтазой (MetK) *E. coli* и ингибирует синтез SAM. Каталитически-неактивные мутанты SAMазы сохраняли частичную анти-BREX активность, вероятно, за счет ингибирования MetK. Чтобы подтвердить это, мы внесли мутации в интерфейс взаимодействия с MetK и получили ряд мутантов со сниженной анти-BREX активностью. Таким образом, мы предполагаем, что SAMаза T3 имеет два независимых механизма снижения внутриклеточного количества SAM, используемого системами защиты хозяина: прямое ферментативное расщепление и ингибирование синтеза SAM.

Работа поддержана грантами РФФИ (Ко_А_21-54-10001), РНФ (22-14-00004 и 22-74-00126) а также грантом Министерства Науки и Образования Российской Федерации (075-10-2021-114).

Изучение микробного разнообразия в образцах донных осадков северного региона Курило-Камчатского жёлоба

Балдаев Сергей Николаевич¹, Быстрицкая Евгения Петровна¹, Недашкова Ольга Ильинична¹, Исаева Марина Петровна¹

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

Регион Курило-Камчатского жёлоба исследуется более 50 лет, однако, основное внимание уделяется геолого-химическим особенностям и многообразию макроорганизмов, тогда как, микроорганизмы изучены значительно меньше [1]. Исследование микробных сообществ ранее неизученных регионов перспективно с точки зрения обнаружения новых таксонов и продуцентов биологически активных метаболитов, имеющих высокий биотехнологический потенциал [2].

В ходе экспедиционного рейса №91 НИС «Академик Лаврентьев» в 2020 году были получены образцы донных осадков восточной акватории полуострова Камчатка (глубины 26 м и 29 м) и Камчатского региона Курило-Камчатского жёлоба (глубины 2720 м и 2900 м). Суммарная ДНК была выделена с помощью набора PureLink™ Microbiome DNA Purification Kit (Thermo Fisher Scientific, США). Участки V3-V4 16S рДНК бактерий и архей были амплифицированы и секвенированы с использованием платформы MiSeq (Illumina, США). Анализ полученных данных проводился с помощью программного пакета CLC Genomic Workbench 22.0 (Qiagen, Германия) и базы данных SILVA SSU 99% (v138.1).

На основе сформированных OTU (97%) до рода было идентифицировано 92% последовательностей. Среди 26 филумов прокариот наиболее представленными были бактерии *Pseudomonadota* и *Desulfobacterota* (от 22 до 31%) и архей *Crenarchaeota* (от 76 до 90%). Более 98% последовательностей было отнесено к некультивируемым микроорганизмам.

Параллельно, из образцов, поднятых с глубин 2720 м и 2900 м, было изолировано более 160 аксенических культур бактерий. По результатам секвенирования 16S рДНК семь штаммов были классифицированы как «кандидаты на новый вид» таких родов как *Cocleimonas* (3), *Roseovarius* (2) и *Sediminicola* (2). Для уточнения таксономического положения выбранных штаммов были получены геномы штаммов-кандидатов. Сборка прочтений *de novo* осуществлялась с помощью SPAdes 3.15.3. Аннотация и реконструкция метаболических путей полученных геномов выполнялись на серверах RAST, PATRIC, KEGG, dbCAN2 и antiSMASH.

В результате данной работы были получены данные, расширяющие знания о микробных сообществах донных осадков Курило-Камчатского жёлоба и восточной акватории п-ова Камчатка.

Исследование поддержано Грантами Министерства науки и высшего образования Российской Федерации 15.BRK.21.0004 (соглашение № 075–15-2021-1052) и 13.1902.21.0012 (соглашение № 075-15-2020-796).

[1] S. Gorrasi "Metagenetic profiling of the bacterial communities of extreme or sub-extreme marine environments.," *Università degli studi della Tuscia – Viterbo*, 2019, hdl.handle.net/2067/46813.

[2] L. Paoli, H.J. Ruscheweyh, C.C. Forneris et al. "Biosynthetic potential of the global ocean microbiome.," *Nature*, 2022, doi.org/10.1038/s41586-022-04862-3

Динамика микробиома каротиногенной микроводоросли *Coelastrella rubescens* NAMSU R1 в зависимости от условий культивирования

Бахарева Дарья Александровна¹, Зайцева Анна Андреевна¹

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

Каротиногенные микроводоросли широко используются в биотехнологии как продуценты каротиноидов – веществ, обладающих антиоксидантной активностью. Микроводоросль *Coelastrella rubescens* NAMSU R1 способна накапливать одновременно два значимых для промышленности каротиноида: астаксантин и β-каротин [1]. Большинство микроводорослей как в природе, так и в лабораторных условиях существуют в форме сообществ с бактериями, которые составляют ее микробиом и формируют сложные многофакторные взаимодействия с фототрофом [2]. Целью работы является изучение динамики микробиома каротиногенной микроводоросли *C. rubescens* NAMSU R1 в зависимости от условий культивирования.

Микробиом микроводоросли *C. rubescens* изучали на разных степенях очистки культуры. Для оценки влияния условий культивирования микроводоросль выращивали на стандартной, а также модифицированной по содержанию азота и фосфора среде BG-11 [3]; на свету низкой и высокой интенсивности (40 и 150 мкмоль/м²/с ФАР); с добавлением УФ-излучения и без него; в суспензионном состоянии и в иммобилизованном на носителях хитозан-С600 и КДЭГ-60. Таксономический состав прокариотического компонента микробиома *C. rubescens* оценивали с 16S рРНК метабаркодинга на платформе Illumina. На всех этапах изучения бактериального компонента присутствовали представители семейства Micrococcales (в частности, *Microbacterium*), что может быть связано с тем, что данные бактерии формируют устойчивую взаимосвязь с микроводорослью и являются постоянными компонентами ее микробиома. После очистки микроводоросли от бактериального компонента доля прочтений, приходящаяся на представителей семейства Micrococcales, возросла с 31 до 99%, что говорит о доминировании данных бактерий над другими компонентами микробиома. Аналогичный состав сообщества сохранялся при культивировании микроводоросли в условиях дефицита азота и фосфора. Влияние изменений яркости освещения, а также добавление УФ проявлялось в увеличении или уменьшении доли представителей семейства Micrococcales (90-98% чтений), а также отмечен выход в субдоминанты представителей родов *Cutibacterium* (при культивировании на свету низкой интенсивности) и *Acinetobacter* (при культивировании на свету низкой и высокой интенсивности с добавлением УФ), что может говорить о перестройке сообщества под влиянием данных факторов. При иммобилизации микроводоросли на носители количественный и качественный состав сообщества также изменялся по более сложному механизму, доминирующее положение в микробиоме стал занимать род *Devosia*. В целом, микроводоросли *C. rubescens* сопутствуют бактерии, характеризующиеся способностью к формированию взаимовыгодных отношений с растениями; при этом микробиом данного фототрофа характеризуется стабильностью и доминированием актиномицетов и протеобактерий.

Данная работа была поддержана грантом президента № МК-1952.2021.1.4

[1] Zaytseva A. et al. “Sunscreen effect exerted by secondary carotenoids and mycosporine-like amino acids in the aeroterrestrial chlorophyte *Coelastrella rubescens* under high light and UV-A irradiation” *Plants*, vol. 10, no. 12, pp. 2601, Nov. 2021.

[2] Bell W., Mitchell R. “Chemotactic and growth responses of marine bacteria to algal extracellular products” *Biol. Bull.*, vol. 143, no. 2, pp. 265 – 277, Nov. 1972.

[3] Stanier R. Y., Kunisawa R., Mandel M., “Cohen-Bazire G. Purification and properties of unicellular blue-green algae (order Chroococcales)” *Bacteriol. Rev.*, vol. 35, no. 2, pp. 171, Nov. 1971.

Механизмы abortивной защиты и распознавания вирусной инфекции бактериальной иммунной системой PARIS

Белухина Светлана¹, Чеченина Анна¹, Скутель Михаил¹, Исаев Артем¹

¹ Сколковский Институт Наук и Технологий, 143028 Москва, Сколково, Россия

Бактерии и бактериофаги находятся в режиме постоянной “гонки вооружений”. В последние годы открыто большое разнообразие систем бактериального иммунитета, и их общее количество уже превышает 120. В свою очередь, бактериофаги приобрели собственные стратегии избегания систем защиты хозяина, и можно ожидать открытия новых вирусных анти-защитных белков. Среди новых систем бактериального иммунитета превалируют abortивные системы, которые при обнаружении вирусной инфекции запускают токсичный ответ убивающий клетку, но останавливающий развитие инфекции на уровне популяции. Abortивные системы можно рассматривать как “вторую линию” обороны так как они активируются на поздних этапах инфекции, в случае если фаг смог обойти действие ДНК-деградирующих систем рестрикции-модификации (Р-М) или CRISPR-Cas. Особый способ активации abortивного ответа был недавно показан для системы PARIS (Phage Anti-Restriction Induced defense System), которая защищает клетки от фагов кодирующих ингибиторы систем “первой линии” обороны Р-М и BREX.

В нашей работе мы подтвердили abortивный фенотип системы PARIS и показали, что триггерами, т.е. активаторами токсичного ответа PARIS могут являться разнообразные вирусные белки обладающих ДНК-мимикрирующими свойствами. Экспрессии одного лишь белка Osg фага T7 в присутствии PARIS было достаточно для гибели клеток в течение 20-30 минут после индукции. Помимо этого, мы показали, что ДНК-мимикрирующие белки из группы ArgA, белок 5.9 фага T7, а также ДНК-мимикрирующие анти-CRISPR белки способны активировать PARIS токсичность. Это предполагает, что PARIS система обладает способностью распознавать инфекцию разнообразными неродственными фагами, выработавшими стратегии обхода Р-М, CRISPR-Cas либо других систем бактериального иммунитета. В то же время, система PARIS может послужить инструментом для открытия новых вариантов вирусных анти-защитных белков, поскольку длительная ко-культивация фага с культурой PARIS приводит к отбору мутантов по генам кодирующим белки-триггеры. Мы получили серию мутантов фага T5, утративших способность активировать PARIS и установили мутации сразу в 2 ORF - 094 и 103. Данные белки обладают крайне низкой изоэлектрической точкой и на основании предсказания их структуры можно предположить ДНК-мимикрирующие свойства. Как и в случае других триггеров, экспрессия ORF094 и ORF103 приводила к гибели PARIS культуры.

PARIS система состоит из двух компонентов – белка ArgA с SMC-подобным АТФазным доменом и белка ArgB с TOPRIM доменом, для которого можно предположить нуклеазную активность. Обычно, SMC домен отвечает за распознавание ДНК, и мы предположили, что в случае PARIS данный домен приобрел способность специфически связываться с ДНК- мимикрирующими белками и выполняет роль сенсора системы. Для проверки этой гипотезы мы провели pull-down эксперимент с белком-триггером Osg и показали его специфичное взаимодействие с SMC-содержащим белком ArgA. Помимо этого, было показано что белки ArgA и ArgB находятся в комплексе в отсутствие вирусного триггера. Дальнейшие исследования позволят установить, как взаимодействие с белками-триггерами приводит к активации PARIS и что является внутриклеточной мишенью системы при запуске токсичного ответа.

Работа поддержана грантом РФФ (22-14-00004) а также грантом Министерства Науки и Образования Российской Федерации (075-10-2021-114).

Ассоциация компонентов легочного микробиома человека с генетической составляющей организма-хозяина

Буслаев Владислав Юрьевич¹

¹ Федеральный исследовательский центр угля и углехимии Сибирского отделения РАН, Кемерово

В настоящее время активно рассматривается роль легочного микробиома в развитии многих социально значимых заболеваний. В особенности наибольший интерес представляют механизмы развития рака лёгкого [1]. Однако вопрос о взаимодействии легочного микробиома с генетической составляющей организма-хозяина продолжает изучаться [2], [3]. Исследование данной ассоциации может способствовать выявлению новых биологических маркеров для диагностики патологии.

С этой целью был выполнен мета-анализ публично-доступных данных с использованием ресурса Pubmed. Для анализа использовался пакет программы MicrobiomeAnalyst, интегрированной с языком R-программирования [4]. Метод TSEA (Taxon Set Enrichment Analysis) применялся для выявления ассоциации таксонов легочного микробиома, вносящих вклад в развитие рака лёгкого, с генетической составляющей организма-хозяина.

В результате анализа наиболее достоверная степень ассоциации представителей легочного микробиома была отмечена для гена *KDM4D* (p-value=0,00215, FDR=1,0). В частности, была установлена наибольшая ассоциация данного гена с бактериальными родами *Veillonella* и *Megasphaera*. Данный ген кодирует лизин-специфическую деметилазу 4D и может в дальнейшей перспективе рассматриваться как потенциальный диагностический маркер рака лёгкого.

[1] A.G. Ramírez-Labrada AG, D.Isla D, A.Artal , et al, "The Influence of Lung Microbiota on Lung Carcinogenesis, Immunity, and Immunotherapy.," Trends in Cancer., vol. 6,pp.86-97, 2020,doi:10.1016/j.trecan.2019.12.007.

[2] Y.Qin, A.S.Havulinna, Y.Liu, et al, "Combined effects of host genetics and diet on human gut microbiota and incident disease in a single population cohort.," Nat Genet.,vol.54,pp.134-42, 2022,doi:10.1038/s41588-021-00991-z

[3] E.A. Lopera-Maya, A.Kurilshikov, A.van der Graaf, et al, "Effect of host genetics on the gut microbiome in 7,738 participants of the Dutch Microbiome Project.," Nat Genet., vol.54, pp.143-51, 2022, doi:10.1038/s41588-021-00992-y.

[4] A.Dhariwal, J.Chong, S.Habib, I.L.King, L.B.Agellon, J.Xia, "MicrobiomeAnalyst: a web-based tool for comprehensive statistical, visual and meta-analysis of microbiome data.," Nucleic Acids Research.,vol.54, pp.180-88,2017, doi:10.1093/nar/gkx295.

Изучение трёхмерной организации ДНК в районе праймирующего протоспейсера в ходе праймированной адаптации с применением метода 3C

Ваулин Никита Сергеевич¹, Ширяева Анна Александровна¹, Северинов Константин Викторович^{2,3}

¹ Сколковский институт науки и технологий, Москва

² Институт микробиологии Ваксмана, Ратгерский университет, Нью-Джерси

³ Институт биологии гена Российской академии наук, Москва

CRISPR-Cas – прокариотические системы адаптивного иммунитета, состоящие из генов *cas* и CRISPR-кассет. Мишенью CRISPR-Cas иммунитета являются протоспейсеры – последовательности нуклеиновых кислот полностью или почти идентичные спейсерам CRISPR-кассет. CRISPR-кассета транскрибируется с образованием коротких молекул крРНК, которые вместе с белковым комплексом Cascade формируют эффекторный комплекс. В системах CRISPR-Cas первого типа распознавание протоспейсера эффекторным комплексом приводит к привлечению нуклеазы-хеликазы Cas3 и запускает CRISPR интерференцию – деградацию ДНК-мишени [1]. Одновременно с этим происходит выбор новых спейсеров из участков ДНК, расположенных около протоспейсера-мишени. Данный процесс называется праймированной адаптацией, а соответствующий протоспейсер – праймирующим. Выбор новых спейсеров осуществляется комплексом Cascade/Cas3/Cas1-Cas2 за счёт хеликазной активности Cas3. *In vitro* Cas3 остается связанным с эффекторным комплексом, а эффекторный комплекс – с протоспейсером, что приводит к образованию петель одноцепочечной ДНК между Cascade и Cas3 [1]. Остаётся ли Cascade связанным с Cas3 *in vivo* – неизвестно.

Спейсеры, приобретённые в ходе праймированной адаптации, выравниваются на участки с обеих сторон от праймирующего протоспейсера [2]. Можно предположить, что (а) выбор нового спейсера происходит либо слева, либо справа от праймирующего протоспейсера, а итоговый результат складывается за счет наложения данных из разных клеток; (б) на одной и той же мишени выбор новых спейсеров происходит с обеих сторон от праймирующего протоспейсера.

Для проверки данных гипотез *in vivo* мы используем метод 3C (chromosome conformation capture) [3], заключающийся в фиксации белок-белковых и ДНК-белковых взаимодействий формальдегидом, рестрикции ДНК и лигировании концов ДНК, сближенных в пространстве. Полученные нами данные свидетельствуют о сближении в пространстве участков на расстоянии 25 т.п.н слева и 15 т.п.н справа от праймирующего протоспейсера в клетках, в которых происходит праймированная адаптация. Этот результат согласуется с гипотезой о том, что выбор спейсеров происходит одновременно с двух сторон от протоспейсера, и Cas3 остаётся связанным с эффекторным комплексом *in vivo*.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда №19-74-20130.

[1] K. E. Dillard *et al.*, “Assembly and Translocation of a CRISPR-Cas Primed Acquisition Complex,” *Cell*, vol. 175, no. 4, pp. 934-946.e15, Nov. 2018, doi: 10.1016/j.cell.2018.09.039.

[2] A. A. Shiriaeva *et al.*, “Detection of spacer precursors formed *in vivo* during primed CRISPR adaptation,” *Nat Commun*, vol. 10, no. 1, pp. 1–9, Dec. 2019, doi: 10.1038/s41467-019-12417-w.

[3] J. Dekker, K. Rippe, M. Dekker, and N. Kleckner, “Capturing Chromosome Conformation,” *Science* (1979), vol. 295, no. 5558, pp. 1306–1311, Feb. 2002, doi: 10.1126/SCIENCE.1067799.

Получение модели для *in vivo* анализа структуры преспейсеров наивной адаптации в CRISPR-Cas системе I-E типа *Escherichia coli*

Виноградова С. В.¹, Мушарова О. С.^{2,3}, Ширяева А. А.³, Северинов К. В.²

¹ Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет), Долгопрудный, Россия

² Институт молекулярной генетики НИЦ «Курчатовский институт», Москва, Россия

³ Сколковский институт науки и технологий, Москва, Россия

CRISPR-Cas системы адаптивного иммунитета прокариот состоят из CRISPR-кассет (участков генома с идентичными повторами и разделяющими их уникальными спейсерами) и генов *cas*. CRISPR-кассеты и гены *cas* вместе обеспечивают устойчивость клеток к бактериофагам и плазмидам, которые содержат протоспейсеры – последовательности, комплементарные спейсерам CRISPR-кассеты. Механизм действия CRISPR-Cas систем условно можно разбить на два модуля: CRISPR-адаптация (изменение генома клетки за счет встраивания новых спейсеров в кассету) и CRISPR-интерференция (высокоспецифичное узнавание протоспейсеров мишени и внесения в них разрывов). Несмотря на значительный прогресс в понимании структуры спейсеров, встраиваемых внутрь кассеты в ходе адаптации [1], ранние стадии этого процесса остаются до конца не исследованными.

Из-за низкой эффективности наивной адаптации детекция преспейсеров является нетривиальной задачей и требует разработки новых подходов. Для того, чтобы повысить концентрацию предшественников в цитоплазме клеток, методом P1 трансдукции [3] был сконструирован штамм с делецией гена интеграции *ihfA* (*integration host factor*), который является необходимым фактором при встраивании новых спейсеров в кассету [2]. Эффективность детекции предшественников спейсеров в мутантном штамме значительно повышается по сравнению со штаммом дикого типа. Полученные штаммы в дальнейшем будут использованы для анализа структуры предшественников спейсера методом FragSeq. Процедура FragSeq позволяет целенаправленно выделить низкомолекулярные фрагменты ДНК, присутствующие в цитоплазме клеток, и проанализировать их структуру методом высокоэффективного секвенирования. Параллельно с FragSeq в клеточной культуре с активно идущим процессом CRISPR адаптации будет реализован стандартный протокол иммунопреципитации хроматина с антителами, специфичными к Cas1-Cas2 адаптационному комплексу, с последующим секвенированием преципитированных фрагментов ДНК. Сравнение структур коротких фрагментов ДНК, полученных в результате процедур FragSeq и ChIP-Seq, позволит охарактеризовать структуру предшественников спейсеров в клетках *E. coli* с активно идущим процессом наивной адаптации.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ №19-14-00323.

[1] A. A. Shiriaeva et al., “Detection of spacer precursors formed *in vivo* during primed CRISPR adaptation,” *Nat. Commun.*, vol. 10, no. 1, Dec. 2019, doi: 10.1038/s41467-019-12417-w.

[2] J. K. Nuñez, L. Bai, L. B. Harrington, T. L. Hinder, and J. A. Doudna, “CRISPR Immunological Memory Requires a Host Factor for Specificity,” *Mol. Cell*, vol. 62, no. 6, pp. 824–833, Jun. 2016, doi: 10.1016/j.molcel.2016.04.027.

[3] L. C. Thomason, N. Costantino, and D. L. Court, “*E. coli* genome manipulation by P1 transduction,” *Curr Protoc Mol Biol.*, Chapter 1:1.17.1-1.17.8., 2007 Jul, doi: 10.1002/0471142727.mb0117s79.

Характеристика комплекса рибосом-ассоциированного контроля качества у архей: структура и взаимодействия нового архейного Rqc2-подобного белка.

Гайворонский Ф.А.¹, Пуэртас Л. М.¹, Гирард Э. ¹, Габель Ф. ¹, Франзетти Б.¹

¹ CNRS, CEA, Institut de Biologie Structural (IBS), Университет Гренобль-Альп (UGA), Гренобль, Франция.

В эукариотических и бактериальных клетках ключевым белком, отвечающим за рибосом-ассоциированный контроль качества (RQC), является Rqc2. Данный белок участвует в рециклинге застрявших на матрице мРНК рибосом, а именно большой субъединицы, находящейся в комплексе с пептидил-тРНК [1]. Предполагают, что Rqc2 с одной стороны стимулирует связывание с большой субъединицей дополнительных белков, помогающих освободить ее от тРНК в Р-сайте и застрявшего в рибосомном тоннеле насцентного пептида, а с другой стороны сам способен модифицировать С-конец насцентного пептида путем добавления специальных аланин-треонионовых (у эукариот) или аланиновых хвостов (у бактерий). Эти хвосты имеют множественную функцию и могут выступать в том числе и в качестве дегронов.

Целью нашей работы было получить структуру данного белка в несвязанном с рибосомой состоянии и структурную информацию о конкретных доменах этого белка методом рентгеноструктурного анализа (РСА) с высоким разрешением. Для этой цели использовали архейный белок arc-Rqc2 из *Pyrococcus abyssi*. Нами был наработан полноразмерный рекомбинантный белок и различные его фрагменты в гетерологичной системе экспрессии в клетках *E. coli*. После чего данные конструкторы были выделены из клеточных лизатов с помощью His- или Strep-тагов. Полученный материал был очищен с помощью ионообменной хроматографии и гель-фильтрации в случае конструкторов с His-тагом или только гель-фильтрации в случае конструкторов со Strep-тагом. Затем мы использовали полученные белки для первичного скрининга кристаллизационных условий или для pull-down экспериментов. В результате была получена предварительная модель кристаллической структуры С-терминальных NFACT-R и NFACT-C доменов у архей с разрешением 3.1 Å. Мы предполагаем, что домен NFACT-R состоит из 142 аминокислот. На N-конце этого домена α -спирали зажаты между β -тяжами. На С-конце данного домена расположено 3 β -тяжа. Все β -тяжи в домене NFACT-R по ходу цепи формируют антипараллельные β -листы. Элементы вторичной структуры домена NFACT-R соединяются друг с другом неструктурированными линкерными участками. Домен NFACT-R архейного белка arc-Rqc2 по структуре гомологичен домену NFACT-R бактериального белка RqcH (PDB ID 7ASA). Значение среднеквадратичного отклонения позиции атомов (RMSD) между двумя наложенными друг на друга NFACT-R доменами составляет 1.43 Å. Структура второго С-терминального домена NFACT-C, идущего по ходу цепи за доменом NFACT-R, была разрешена впервые. Данный домен присутствует только в архейных и эукариотических белках Rqc2 и отсутствует в бактериальном аналоге RqcH. NFACT-C предположительно состоит из 51 аминокислот, из идущих друг за другом β -тяжа, 2 α -спиралей и снова β -тяжа, связанных между собой неструктурированными линкерными участками. β -тяжи в этом домене также формируют антипараллельный β -лист. Между доменами NFACT-R и NFACT-C расположен линкерный междоменный участок из 10 аминокислот. В середине линкера находится α -спираль, состоящая из 7 аминокислот. Данная α -спираль фланкирована двумя неструктурированными элементами с N- и С-конца. Благодаря полученным протеомным данным нами было установлено, что архейный белок arc-Rqc2 является функциональным гомологом эукариотического белка Rqc2 и находится на интерфейсе между архейной рибосомой и протеасомой.

Данная работа была поддержана Гренобльским Альянсом Интегративной Структурной Биологии (GRAL) и Докторской школой Университета Гренобль-Альп CBH-EUR-GS (Грант: ANR-17-EURE-0003).

[1] Filbeck S., Cerullo F., Pfeffer S., Joazeiro C.A.P. Ribosome-associated quality-control mechanisms from bacteria to humans. *Mol Cell*. 2022 Apr. 21;82(8):1451-1466. doi: 10.1016/j.molcel.2022.03.038.

Роль доменов топоизомеразы I, участвующих во взаимодействии с РНК полимеразой, в физиологии *Escherichia coli*

Галивонджян А.Х.¹, Северинов К.В.², Сутормин Д.А.¹

¹Центр наук о жизни, Сколковский институт науки и технологий

²Waksman University for Microbiology, Rutgers

Топоизомераза I (ТороI) - незаменимый белок *Escherichia coli*, отвечающий за релаксацию избыточной отрицательной суперспирализации, формируемой согласно двудоменной модели преимущественно в процессе транскрипции за транскрипционным комплексом [1]. Было обнаружено взаимодействие между β и β' доменами РНК полимеразы (РНКП) и С-терминальным (СТД) и Zn-связывающим доменами ТороI (ZBD) [2,3]. Ранее мы предположили, что ТороI и РНКП формируют активный функциональный комплекс, что позволяет ТороI своевременно удалять отрицательные супервитки. Ранее мы показали, что разобщение этого взаимодействия при помощи экспрессии конкурентного белка (СТД или неактивной формы ТороI с мутацией в каталитическом сайте) приводит к снижению жизнеспособности клеток, повышению уровня отрицательной суперспирализации, а также накоплению R-петель [3].

Для дальнейшего изучения роли ТороI СТД и ZBD во взаимодействии с РНКП, мы получили штаммы *E. coli* с делециями различных С-концевых фрагментов ТороI: *topA111* (удален 11кДа фрагмент СТД), *topA114* (удален СТД) и *topA130* (удалены СТД и ZBD) (Рис. 1А). Далее мы изучили влияние этих делеций на физиологию *E. coli*. Сравнив скорости роста этих штаммов и штамма дикого типа, мы обнаружили, что только штамм *topA130* имел увеличенное время удвоения: 36 минут против 30 минут для дикого типа (Рис. 1Б). Для *topA111* и *topA114* регистрировалось увеличенное количество аномально удлинённых клеток (11% против 0.3% для дикого типа), в то время как штамм *topA130* содержал 23% удлинённых клеток (Рис. 1В). Эксперименты по измерению конкурентоспособности мутантных штаммов против штамма дикого типа при совместном попарном культивировании показали, что только штамм *topA130* достоверно проигрывал штамму дикого типа (Рис. 1Г).

Для изучения роли РНКП-связывающих доменов ТороI во взаимодействии с ДНК, были проведены ChIP-Seq эксперименты для данных штаммов в нативных условиях и ChIP-qPCR эксперименты в условиях ингибирования транскрипции рифампицином. В нативных условиях обогащение в вышележащих от транскрипционных единиц областях для штаммов *topA111* и *topA114* было выше, чем для *topA130*, что свидетельствует о том, что СТД не критичен для распознавания отрицательных супервитков, в то время как удаление СТД и ZBD лишает топоизомеразу этой способности. Снижение обогащения в области транскрипционных единиц у штамма *topA130* может быть объяснено нарушением взаимодействия между ТороI и РНКП (Рис. 1Д). Ингибирование транскрипции рифампицином приводило к снижению обогащения в промоторной области для тестового гена (*dps*) во всех мутантных штаммах относительно дикого типа, что говорит в пользу разобщения взаимодействия с РНКП (Рис. 1Е).

Мы заключаем, что ZBD критичен для функционирования ТороI и поддержания взаимодействия с РНКП в ходе транскрипции; удаление ZBD приводит к замедлению роста клеток, патологическому изменению их физиологии и снижению конкурентоспособности. Роль СТД в функционировании ТороI выражена слабее и, возможно, этот домен критичен в иных условиях роста клеток.

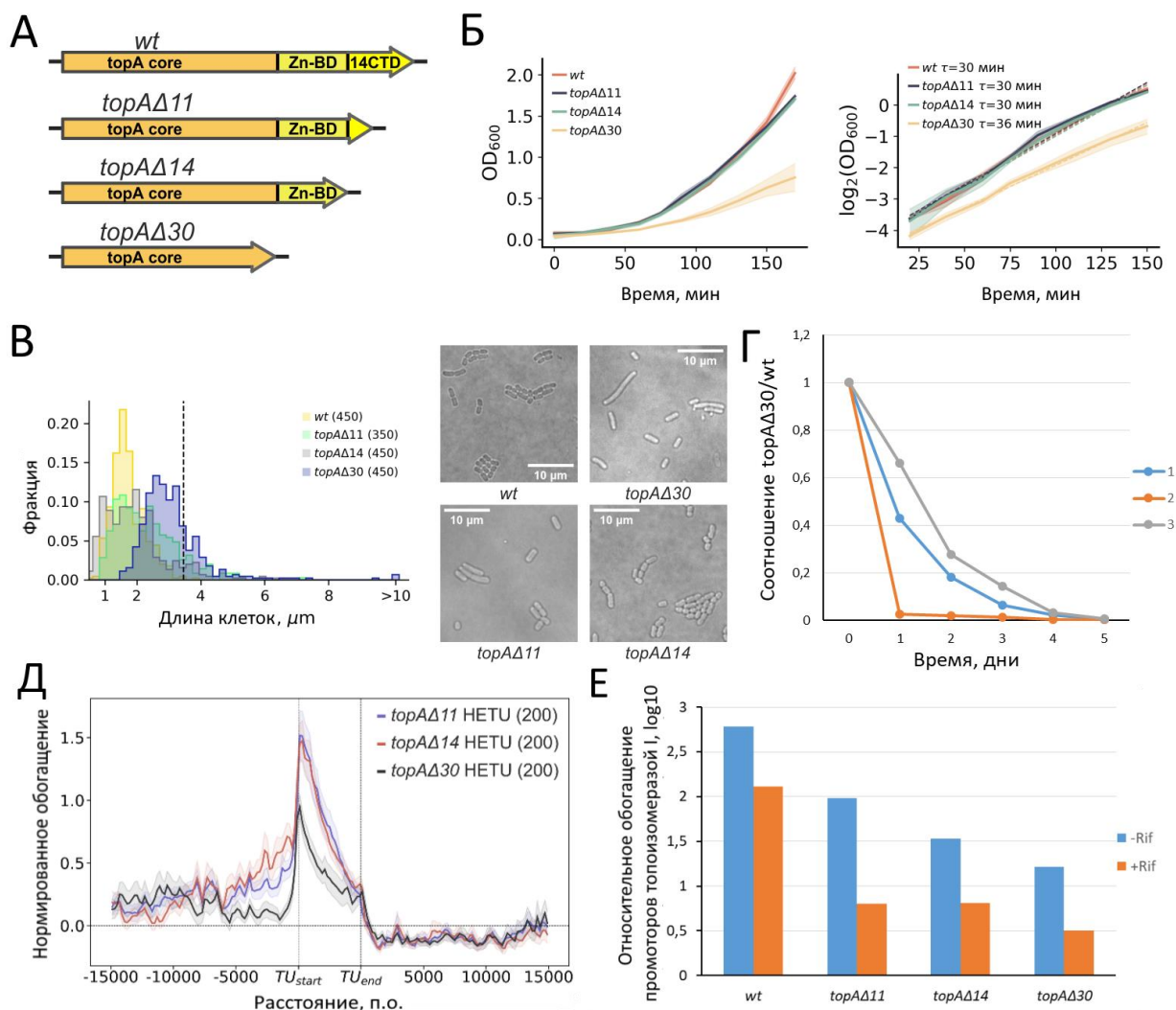


Рисунок 1. А. Ген *topA* и набор мутантов. Б. Кривые роста штаммов *E. coli* с делециями различных С-концевых фрагментов ТопоI и дикого типа (слева), количественная оценка времени удвоения для экспоненциальных регионов кривых роста (справа). В. Микрофотографии клеток *E. coli* с делециями различных С-концевых фрагментов ТопоI. Г. Эксперимент по конкурентоспособности штаммов *topAΔ30* и дикого типа (три повторности). Д. Обогащение транскрипционных единиц ТопоI в изучаемых штаммах. Е. Относительное обогащение ТопоI в промоторной области *dps* в нативных условиях (-Rif) и при добавлении рифампицина (+Rif), на вертикальной оси представлена логарифмическая шкала.

Работа поддержана РФФИ (№20-34-90069). Секвенирование обеспечено грантом Программы Наук о Жизни Сколтехе.

- [1] Wu H.Y., Shyy S.H., Wang J.C., Liu L.F., 'Transcription generates positively and negatively supercoiled domains in the template.002C' Cell., 53(3):433-40., 1988, doi: 10.1016/0092-8674(88)90163-8.
- [2] Cheng B., Zhu C.X., Ji C., Ahumada A., Tse-Dinh Y.C., 'Direct Interaction between Escherichia coli RNA Polymerase and the Zinc Ribbon Domains of DNA Topoisomerase I,' J Biol Chem., 278(33), pp. 30705–30710., 2003, doi: 10.1074/jbc.M303403200
- [3] Sutormin D., Galivondzhyan A., Musharova O., Travin D., Rusanova A., Obratsova K., Borukhov S., Severinov K., 'Interaction between transcribing RNA polymerase and topoisomerase I prevents R-loop formation in E. coli.,' Nat Commun 13, 4524, 2022, doi: 10.1038/s41467-022-32106-5

Анализ антимикробных компонентов тканей моллюсков рода *Littorina*

Гафарова Елизавета Рустамовна¹, Мальцева Арина Леонидовна¹

¹ Санкт-Петербургский Государственный Университет, Санкт-Петербург

Прокариотические организмы могут иметь решающее значение для адаптации многоклеточных к занимаемой последними экологической нише. Так, например, бактерии, ассоциированные с желудочно-кишечным трактом позвоночных и беспозвоночных животных, могут влиять на обмен веществ и развитие различных систем органов, модифицировать поведение животных, тем самым опосредуя адаптацию. Длительное сожительство с многоклеточными может вызывать изменения в геноме бактерий: симбионты могут утрачивать элементы каскадов биосинтеза аминокислот, целые блоки энергетического метаболизма и пр; с другой стороны, и генетические элементы бактерий могут включаться в геном организма-хозяина. Изучение прокариот, интегрированных в экологию и физиологию многоклеточных, значимо для эволюционных исследований.

В качестве объекта нами были выбраны микробные сообщества, ассоциированные с моллюсками рода *Littorina* – информативной модели для анализа разновозрастных эволюционных процессов, связанных со специализацией и освоением новых экологических ниш. Анализ микробиомов, с которыми виды рода *Littorina* формируют стабильные ассоциации и механизмов регуляции этих ассоциаций – актуальная задача и в контексте частной биологии литторин, и с общепроцессуальной точки зрения исследования эволюционных процессов. Выход в новую экологическую нишу сопровождается сменой набора микроорганизмов, с которыми организм контактирует, что влияет на физиологию и поведение хозяина, и может иметь значение для дивергенции.

Ранее анализ результатов 16S-рДНК-метабаркодинга образцов кишки, поверхности тела и биопленок среды обитания *Littorina* позволил нам выявить ряд закономерностей, касающихся структуры микробных сообществ в ассоциации с этими улитками. В частности, что состав ассоциированных с литторинами микробных сообществ отличается от средовых и что в составе ассоциированных сообществ есть выражено доминирующие по обилию бактерии. Состав доминантов достаточно консервативен у разных видов в разных регионах обитания. Основу альфа-разнообразия ассоциированных сообществ составляют мало представленные таксономические единицы, причем именно такие бактерии специфичны для определенных видов литторин.

Стабильность ассоциированных с литторинами бактериальных сообществ подразумевает функционирование механизмов, регулирующих состав таких ассоциаций. Наибольший интерес представляют активные эффекторы, проявляющие антимикробную активность, среди которых наиболее интересны антимикробные пептиды. Эти вещества пептидной природы могут иметь широкий спектр действия и через проявление бактерицидного или бактериостатического эффекта осуществлять регулирование ассоциированного микробного сообщества. Антимикробные свойства тканей моллюсков рода *Littorina* подробно не описаны.

Для выявления природы и места локализации антимикробных компонентов в организме литторин мы зафиксировали заселенные бактериями части тела моллюсков *L. littorea* (жабры, кишечник, протоки половой системы). Серии антимикробных тестирований показали, что тотальные экстракты всех собранных тканей *L. littorea* проявляют антимикробную активность в отношении грамположительных и грамотрицательных бактерий.

Состав активных экстрактов был изучен с применением метода ЖХ-МС/МС с последующей идентификацией компонентов по тканевому транскриптому *L. littorea*. На основе молекулярных свойств (длина полипептидной цепочки, наличие сигнального пептида, аминокислотный состав, pI и пр.) были выбраны шесть пептидов-кандидатов, предположительно вовлеченных в реализацию и/или регуляцию антимикробной активности. Чтобы верифицировать предсказанное *in silico* участие выбранных пептидов в иммунном реагировании, было произведено экспериментальное ранение с инфицированием улиток рода *Littorina*. От экспериментальных животных были собраны различные ткани для количественной оценки возможного изменения уровня экспрессии. Данные находятся на промежуточной стадии анализа.

Распределение видов макрофитов и беспозвоночных животных на литорали Белого и Баренцева морей в рамках комплексной экспедиционной работы по отбору проб для метагеномных исследований

Герцен Люси Александровна¹, Юрикова Дарья Андреевна^{1,2}, Сашова Ольга Алексеевна^{1,2}, Коновалова Ольга Петровна¹

¹ ООО «Центр морских исследований МГУ им. М.В. Ломоносова», Москва

² Биологический факультет, Московский Государственный Университет им. М.В. Ломоносова, Москва

В сентябре 2022 года сотрудники ЦМИ МГУ провели седьмую экспедицию в рамках проекта «Атлас микробных сообществ Российской Федерации». Ниже представлены результаты экспедиционной работы и распределение видов макрофитов и беспозвоночных животных в местах сбора. Экспедиция проводилась 5-16 сентября 2022 г. Места сбора: Белое море (окрестности ББС МГУ, литораль, **рис. 1**), Баренцево море (окрестности п. Териберка, литораль, **рис. 2**).

Цель проекта: молекулярно-генетическими методами выделить активные вещества из отобранных проб.

Задачи экспедиции: выбрать места с наибольшим биоразнообразием, в которых встречаются макрофиты и беспозвоночные животные в достаточном количестве для дальнейшего выделения ДНК; отобрать пробы грунта, воды, макрофитов и животных. Далее образцы были переданы для молекулярно-генетического анализа в лабораторию Сколтеха.

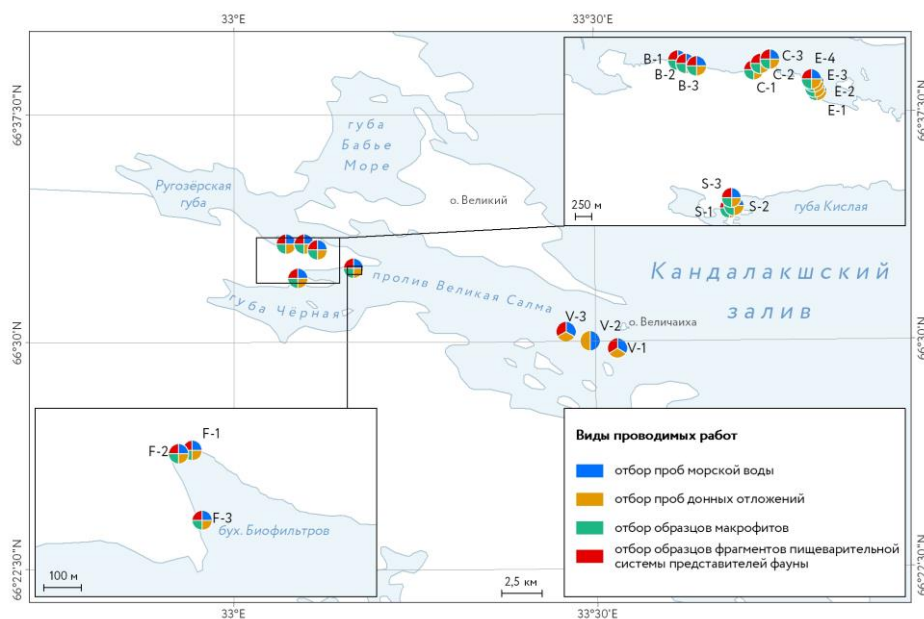


Рисунок 1. Расположение точек отбора в окрестностях ББС МГУ в Белом море

Всего было отобрано и обработано 1104 пробы, из них воды - 84 пробы, грунта - 252, макрофитов - 186, животных - 582. При отборе проб измеряли температуру и соленость воды с помощью CTD-зонда YSI-Castaway, измеряли pH воды с помощью pH-метра. Идентификация видов проводилась с помощью стандартных определителей, актуальность проверялась по базе данных WoRMS. [1]

Сравнительный анализ показал, что эдификаторами литоральных сообществ обоих морей являются водоросли семейства *Fucaceae*, однако распределение видов на морях было разным. Среди беспозвоночных животных на литорали Белого моря доминантами были моллюски *Littorina* и *Mytilus*, морские звезды *Henricia* и *Asterias rubens*. На Баренцевом море доминировал другой вид *Littorina*, морские звезды не были отмечены. Мы предполагали, что более высокая соленость Баренцева моря будет способствовать большему разнообразию беспозвоночных животных. Однако из-за особенностей грунта полностью отсутствовали виды, обитающие в илу, а также морские

звезды. Мы предполагаем, что это связано с сильным волновым воздействием, которое не позволяет им закрепиться на литорали.

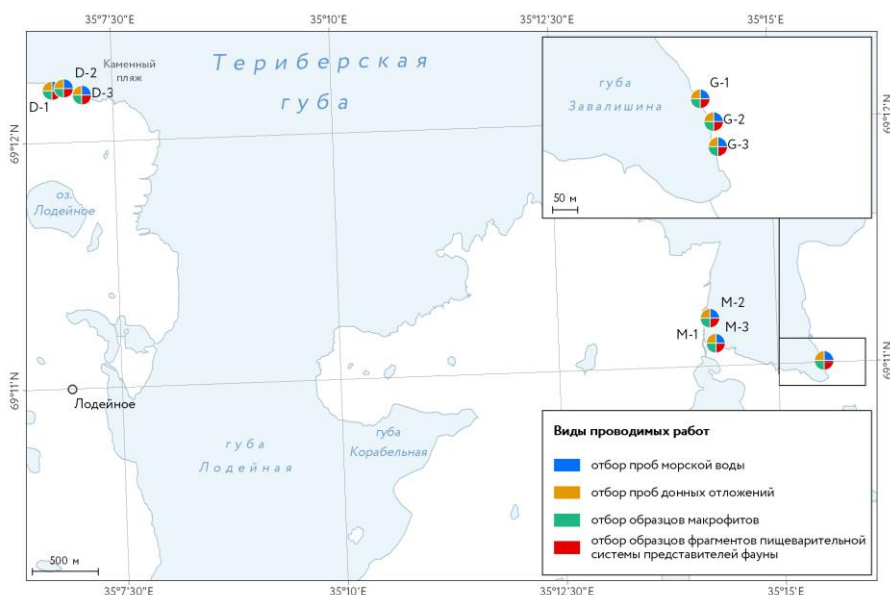


Рисунок 2. Расположение точек отбора в окрестностях п. Териберка

[1] World Register of Marine Species (WoRMS) [WoRMS - World Register of Marine Species](http://www.marinespecies.org/)

Таблица 1. Параметры точек отбора и количество видов и проб макрофитов и животных

М о р е	Место отбора	Температура, °C	Соленость воды, PSU	pH воды, моль/л	Кол-во точек	Проб животных	Видов животных	Проб макрофитов	Видов макрофитов
Б е л о е	о. Величаиха (V)	-0.09	27.7	7,66	3	9	2	0	0
	Черные щели (B)	11	23.43	7.72	3	108	4	22	12
	Крест (C)	10.69	24.13	7.9	3	66	4	27	15
	Еремеевский порог (E)	9.7	23.92	7.81	4	89	4	44	20
	Кислая губа (S)	10.74	23.97	7.87	3	72	6	25	11
	б. Биофильтров (F)	9.59	24.71	8.27	3	40	3	19	10
Б а р е н ц е в о	Северная бухта (G)	10.61	31.98	8.31	3	56	2	16	8
	Губа Завалишина (M)	10.14	27.62	8.24	3	54	4	21	10
	Каменный пляж (D)	10.39	33.01	8.26	3	88	3	12	7

Полногеномный анализ субпопуляций *Neisseria gonorrhoeae*

Горшкова Софья Андреевна¹, Шаскольский Борис Леонидович¹, Кандинов Илья Денисович¹, Дементьева Екатерина Игоревна¹, Кравцов Дмитрий Витальевич¹, Винокурова Александра Сергеевна¹, Грядунов Дмитрий Александрович¹

¹ Центр высокоточного редактирования и генетических технологий для биомедицины, Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук, Москва

В последнее десятилетие в российской популяции возбудителя гонококковой инфекции доминируют изоляты, относящиеся к молекулярным типам геногруппы G807 [1]. Примечательно, что такие изоляты, как правило, отличаются чувствительностью к антимикробным препаратам [2], поэтому причины сохранения существенной доли штаммов G807 в популяции, т.н. маркеры адаптивного преимущества, остаются невыясненными.

Для выявления причин стабильно высокой встречаемости штаммов геногруппы G807 нами было проведено полногеномное секвенирование 50 российских изолятов на двух платформах, MinION (Oxford Nanopore, Великобритания) и MiniSeq (Illumina, США), и последующая сборка геномов *de novo*. Последовательности полученных геномов депозированы в GenBank (BioProject PRJNA768989).

Проведен сравнительный полногеномный анализ молекулярных типов *N. gonorrhoeae*, доминирующих в России и в мире, с целью установления их филогенетических отношений и определения генов и аллелей, характерных для каждого типа. Для этого были отобраны геномы изолятов, принадлежащих к наиболее распространенным в мире молекулярным типам 225, 1407, 2400, 2992 и 4186, а также полученные геномы российских изолятов G807. В ходе анализа впервые обнаружены уникальные гены, входящие в core-геном изолятов одного типа и не найденные, либо присутствующие только как минорные компоненты в пангеноме других типов. Эти гены кодировали пилины, белки мутности, фаговые белки, токсины, трансферин-связывающий белок, пенициллин-связывающий белок и компоненты гонококкового острова (GGI) – важнейшей структуры для осуществления бактерией горизонтального переноса ДНК. Детальный анализ последовательностей генов, входящих в состав GGI, показал существенные различия в структуре острова для изолятов различных типов. Изоляты типов 807, 2992, 4186 либо не имели гонококкового острова, либо несли мутации в значимых для осуществления секреции ДНК генах. Во всех анализируемых российских изолятах обнаружена замена гена *atfA* на ген *epfA* одновременно с изменением аллели *traG*, заменой гена *uch* на *ych1* и потерей гена *exp1*. В гонококковых островах изолятов типов 225, 1407 и 2400, как правило, не обнаруживали преждевременных стоп-кодонов или сдвигов рамки считывания. Доля изолятов *N. gonorrhoeae*, устойчивых к цефтриаксону, ципрофлоксацину и пенициллину, значительно выше для изолятов типов 225, 1407 и 2400, способных секретировать ДНК, в сравнении с молекулярными типами 807, 2992, 4186 без GGI или имеющими остров с поломками в функционально-значимых генах. Таким образом, для глобально распространенных молекулярных типов нами обнаружена связь между снижением чувствительности *N. gonorrhoeae* к антимикробным препаратам и целостностью и функциональностью гонококкового острова, кодирующего систему секреции ДНК IV типа.

Работа выполнена при поддержке соглашения с Министерством науки и высшего образования о предоставлении гранта в форме субсидии № 075-15-2019-1660.

[1] B. Shaskolskiy *et al.*, “Genetic diversity of *Neisseria gonorrhoeae* multi-antigen sequence types in Russia and Europe,” *International Journal of Infectious Diseases*, vol. 93, pp. 1–8, Apr. 2020, doi: 10.1016/j.ijid.2020.01.020.

[2] A. Kubanov *et al.*, “Summary and Trends of the Russian Gonococcal Antimicrobial Surveillance Programme, 2005 to 2016,” *Journal of Clinical Microbiology*, vol. 57, no. 6, May 2019, doi: 10.1128/JCM.02024-18.

Влияние метода кластеризации сырых прочтений на оценку биоразнообразия микробиоты антропогенно-преобразованных почв

Дёмин К.А.¹, Горовцов А.В.¹, Сушкова С.Н.¹

¹ Южный федеральный университет, Академия Биологии и Биотехнологии имени Д.И. Ивановского, Ростов-на-Дону, Россия.

Существование большого числа программ и пакетов для обработки данных секвенирования ставит множество методологических вопросов, например — какая часть данных искажается при применении тех или иных методов, что особенно важно в метагеномных исследованиях. В данном исследовании было оценено биоразнообразие почв с использованием наиболее распространённых программ для кластеризации прочтений ДНК: Mothur [1] и DADA2 [2]. Объектом исследования были почвы высушенного озера Атаманское, расположенного в Ростовской области. В прошлом веке промышленные отходы химических производств аккумулировалась в его донных отложениях, где последние два десятка лет происходит почвообразовательный процесс. Было отобрано 15 образцов почв: 4 контрольных (Fluvisol) и 11 с территории озера (Spolic Technosol). Из почв экстрагировалась тотальная ДНК набором FastDNA SPIN Kit for soil (MP Biomedicals, UK). Амплификационировался регион V3-V4 гена 16S рРНК. Секвенирование проводили на платформе MiSeq (Illumina) в центре коллективного пользования Казанского федерального университета. Фильтрация прочтений ДНК и таксономическая аффилиация проводились в программном обеспечении Mothur (порог кластеризации - 3%), а также с помощью пакета DADA2 для R. Для визуализации использовался язык программирования R (v 4.2.1).

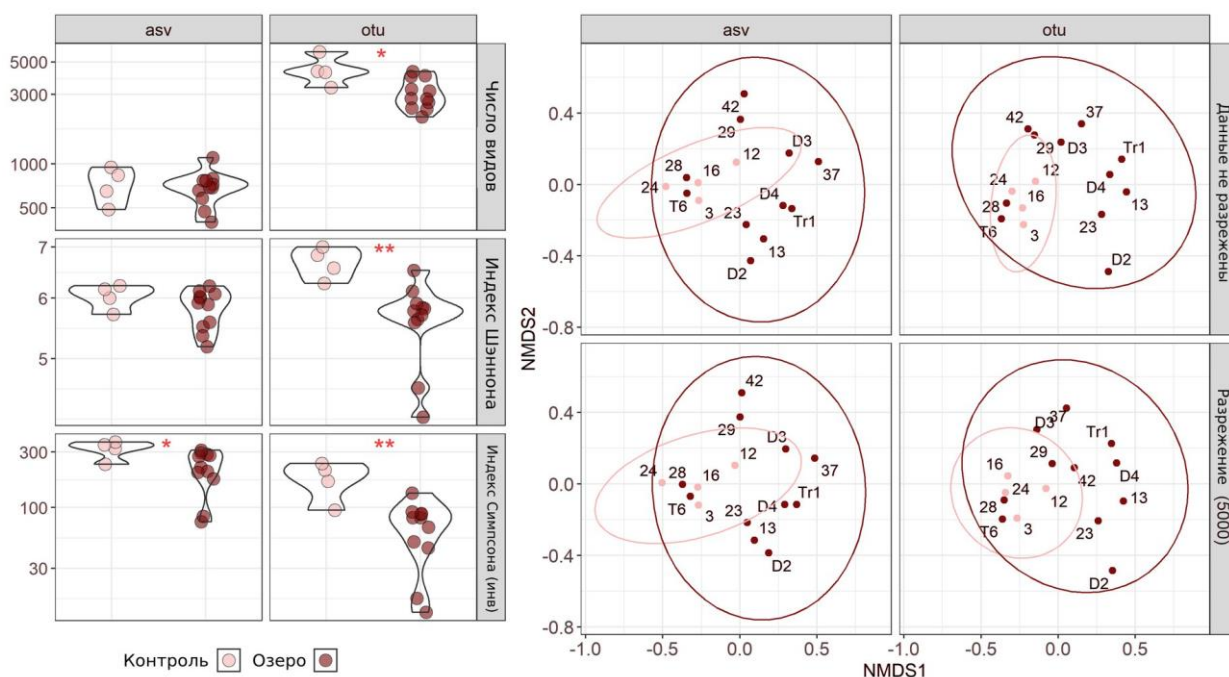


Рисунок 1. Альфа- и бета-разнообразие исследованных почв. Альфа-разнообразие представлено числом видов, а также индексами Шэннона и инвертированного Симпсона. Бета-разнообразие оценено сравнением схожести почв с помощью расстояний Брэя-Кёртиса (bray-curtis distances, NMDS-метод ординирования).

Оценки альфа- и бета-разнообразия (Рис. 1) получены с помощью пакета *vegan* для R. Оценки альфа-разнообразия значительно отличаются между двумя методами. Кластеризация прочтений в операционные таксономические единицы даёт большую оценку количества видов и индекс Шэннона, при этом разнообразие по Симпсону выше для метода определения точных ампликонных последовательностей (ASV). Это может быть связано с тем, что индекс Симпсона чувствителен к равномерности выборки видов. Пакет DADA2 отсеивает малопредставленные прочтения, что

делает таксоны более равномерно распределенными в образцах. На бета-разнообразии выбор метода оказал незначительный эффект, как и разрежение прочтений для уравнивания размеров выборок образцов. Это можно видеть по идентичной картине ординирования почв. Несмотря на возрастающую популярность метода получения точных ампликонных последовательностей, его применение в анализе почв неоднозначно. В почвах представлена так называемая «редкая биосфера» [3], представители которой в некоторых случаях могут даже не попадать в область зрения метагеномных методов либо отсеиваться как не имеющие статистический вес на этапе предобработки прочтений такими строгими методами как ASV. Кластеризация последовательностей, в свою очередь, сохраняет такие таксоны, представленные такими прочтениями, и может быть более оптимальным выбором для исследования разнообразия почвенной микробиоты.

Исследование выполнено в лаборатории «Здоровье почв» Южного федерального университета при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации, соглашение № 075-15-2022-112.

- [1] P. D. Schloss *et al.*, “Introducing mothur: Open-Source, Platform-Independent, Community-Supported Software for Describing and Comparing Microbial Communities,” *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 75, no. 23, pp. 7537–7541, Oct. 2009, doi:10.1128/aem.01541-09.
- [2] B. J. Callahan, P. J. McMurdie, M. J. Rosen, A. W. Han, A. J. A. Johnson, and S. P. Holmes, “DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data,” *Nature Methods*, vol. 13, no. 7, pp. 581–583, May 2016, doi: 10.1038/nmeth.3869.
- [3] A. Shade, C. S. Hogan, A. K. Klimowicz, M. Linske, P. S. McManus, and J. Handelsman, “Culturing captures members of the soil rare biosphere,” *Environmental Microbiology*, vol. 14, no. 9, pp. 2247–2252, Jul. 2012, doi: 10.1111/j.1462-2920.2012.02817.x.

Сравнение эффективности методов выделения тотальной ДНК для метагеномных исследований морских сообществ

Демкина Алина Олеговна^{1,2}, Слонова Дарья Александровна¹, Мамонтов Виктор Александрович¹, Сутормин Дмитрий Александрович^{1*}, Северинов Константин Викторович³, Исаев Артем Борисович^{1*}

¹ Сколковский институт науки и технологий, Москва

² Институт Биоорганической Химии РАН, Москва

³ Институт Микробиологии Ваксмана, Нью Джерси, США

В рамках проекта “Атлас микробных сообществ РФ” мы исследуем разнообразие микроорганизмов Северного Ледовитого Океана методами метагеномики. Всестороннее изучение микробиома океанов позволит понять закономерности микробной экологии, а также осуществлять мониторинг состояния окружающей среды и антропогенной нагрузки. Выделение ДНК проводится из 3-х типов природных образцов: донных отложений, воды и микробных сообществ, ассоциированных с морскими беспозвоночными, что позволяет составить полную картину микробного состава сообщества. Получение из природных источников образцов ДНК высокого качества, подходящих для секвенирования длинными прочтениями, часто осложняется изначальной бедностью некоторых образцов, различной эффективностью разрушения клеточных стенок микроорганизмов разных таксономических групп, наличием ингибиторов ферментативных реакций, либо нуклеаз, приводящих к деградации ДНК. Для учета и компенсации этих факторов мы провели сравнительный анализ методов выделения тотальной ДНК из природных образцов коммерческими наборами: Stool, Microbiome, PowerFecal, Blood&Tissue, PowerSoil (все Qiagen), PureLink (Invitrogen), Monarch (NEB), Soil (LSBio). Для образцов ДНК, выделенных из стандартизованных проб воды, донных отложений и содержимого кишечника моллюска *Magallana gigas*, были оценены: концентрация, наличие примесей, степень фрагментации, присутствие ингибиторов ПЦР, содержание эукариотической ДНК. По результатам секвенирования ампликонов V3-V4 региона 16S рРНК генов были определены альфа-разнообразие микробных сообществ, “китом” (набор контаминирующих бактерий характерный для коммерческого набора), а также уровень этого загрязнения.

Наибольший выход ДНК для всех типов образцов был получен с использованием наборов PowerSoil и PowerFecal, а также Blood&Tissue для проб воды. Целостность ДНК для проб из донных отложений определяли на приборе Agilent 4150 TapeStation. Образцы ДНК, полученные наборами PowerSoil и PowerFecal, наименее фрагментированы. Все полученные из донных отложений образцы ДНК имели смещенный в сторону 230нм профиль поглощения, что говорит о загрязнении органическими соединениями и солями. Для всех типов образцов ДНК характерно присутствие большого количества ингибиторов, которые значительно снижали эффективность ПЦР, разведение приводило к снижению уровня ингибирования. Для некоторых образцов ДНК из донных отложений требовалась дополнительная очистка с использованием спин-колонок с сорбентом (ThermoScientific/Evrogen/NEB) или магнитных частиц (AMPure XP), что приводило к потерям ДНК. Образцы ДНК, полученные из содержимого кишечника *M. gigas*, по данным qPCR со специфическими праймерами имеют высокий уровень примеси эукариотической ДНК. Использование дополнительного набора NEB Enrichment по обогащению бактериальной ДНК не привело к ожидаемым результатам.

Для исследования качественного и количественного состава микробных сообществ проводилась обработка данных секвенирования 16S рРНК ранее разработанным пайплайном [1], включающим предварительную фильтрацию последовательностей, анализ DADA2, кластеризацию MMseqs2 и определение таксономической принадлежности с использованием базы SILVA. Визуализация и статистический анализ проводились с использованием R.

Для всех образцов была достигнута насыщающая глубина секвенирования (**Рис. 1А**). Для ряда наборов был зафиксирован высокий уровень привносимого загрязнения (в порядке убывания): Stool, Microbiome, PureLink, Monarch, Soil (**Рис. 1Б**). Из наборов без загрязнения высокий уровень альфа-разнообразия демонстрировали PowerFecal, PowerSoil и Blood&Tissue (кроме образцов, полученных из животных) (**Рис. 1В**). Следует отметить наборы PowerFecal и PowerSoil, как наиболее универсальные для выделения микробной ДНК с низким уровнем загрязнения и с сохранением высокого разнообразия сообщества из разных типов образцов (**Рис. 1Г**).

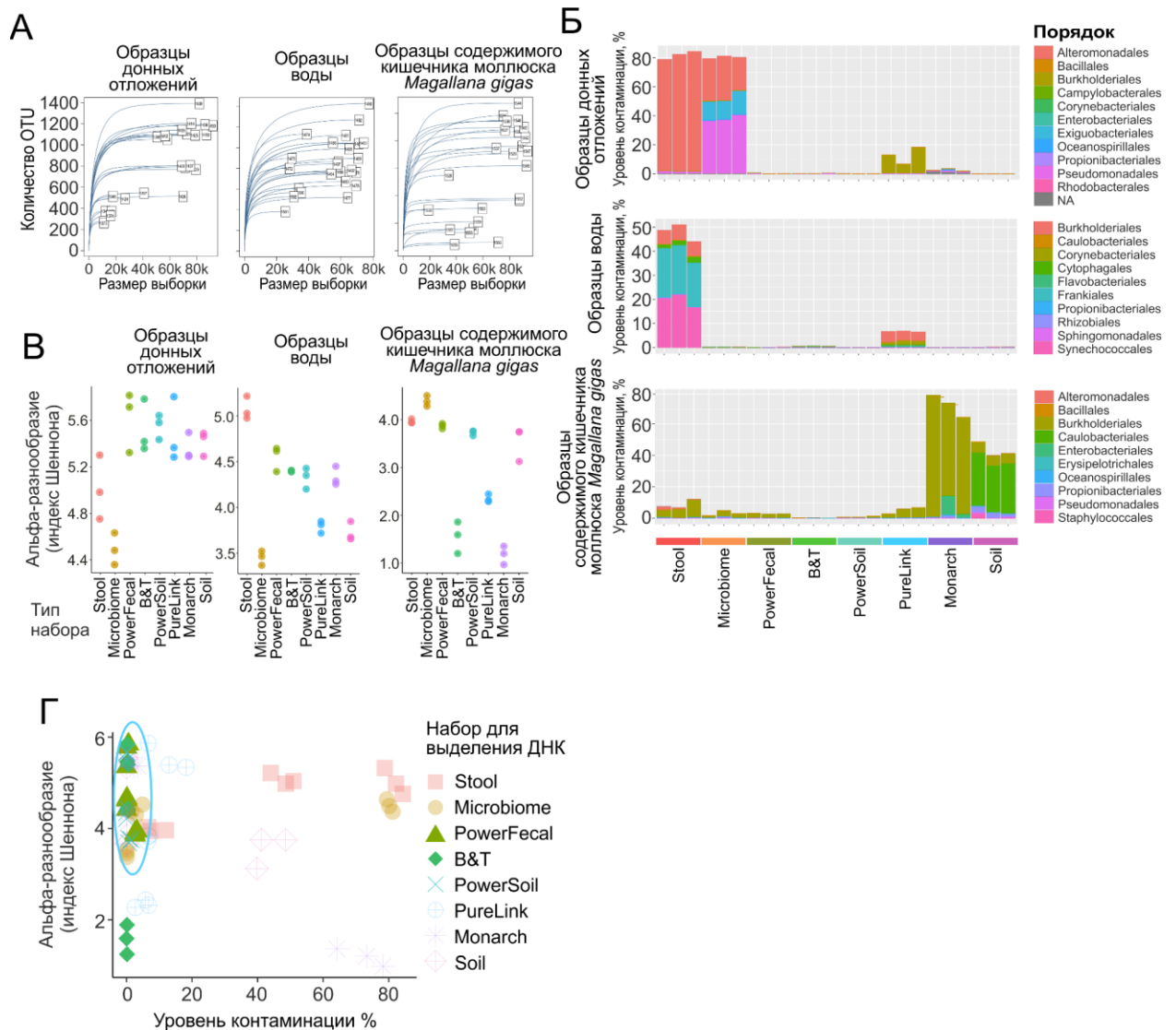


Рисунок 1. А. Кривые насыщения глубины секвенирования образцов. Б. Уровень загрязнения, привносимого используемым набором, для разных типов образцов и наборов. В. Альфа-разнообразие микробных сообществ в зависимости от типа образца и используемого для выделения ДНК набора. Г. Зависимость между уровнем загрязнения, привносимым используемым набором, и альфа-разнообразием микробных сообществ. Овалом обозначена группа образцов, выделенных наборами, демонстрирующими наилучший результат.

Работа поддержана грантом РФ (22-14-00004), а также грантом Министерства Науки и Образования Российской Федерации (075-10-2021-114).

[1] GitHub repository: 16S_analysis, https://github.com/sutormin94/16S_analysis.

Абортивные системы противовирусной защиты профага P2 - Old нуклеаза является сенсором целостности RecBCD комплекса

Держаев Антон Андреевич^{1,2}, Исаев Артем Борисович¹

¹ Сколковский институт науки и технологий, Москва

² Московский физико-технический институт, Москва

За последние годы было выявлено огромное разнообразие бактериальных систем защиты от вирусных инфекций и показано что абортивный иммунитет является крайне распространенным способом защиты от фагов. Абортивные системы приводят к гибели зараженной клетки, но при этом не высвобождается фаговое потомство и инфекция замедляется на уровне популяции. Что интересно, умеренные фаги также могут кодировать системы абортивного иммунитета и находясь в состоянии профага могут защищать своих хозяев от инфекции другими фагами. Бактериофаг P2 кодирует сразу 3 системы защиты с предполагаемым абортивным механизмом: Old, FunZ и Tin, которые совместно предоставляют клеткам, лизогенизированным P2, практически полную защиту от широкого спектра фагов. Old защищает от λ и многих сифовирусов, FunZ от T5-подобных фагов, в то время как Tin дает защиту от T-четных фагов. Для того чтобы выяснить механизмы абортивного ответа данных белков, а также установить принципы их активации, мы клонировали Old, FunZ и Tin и проверили спектр их защиты против нашей коллекции фагов. В большинстве случаев, спектры защиты этих систем не перекрываются, но в то же время лизоген P2 обладал намного более высоким уровнем защиты от конкретных фагов, по сравнению со штаммом, несущим лишь отдельные иммунные белки, что предполагает кумулятивный защитный эффект.

Наиболее интересным представлялось установить механизмы активации системы Old. Ранее было известно, что Old отвечает за защиту от λ , а также является крайне токсичным в клетках с делециями RecBC. Old включает 2 домена: SMC с АТФазной активностью и TOPRIM обладающий *in vitro* нуклеазной активностью. При этом, доменная организация Old крайне похожа на недавно открытую систему абортивного иммунитета PARIS, которая активируется при обнаружении вирусных анти-рестрикционных белков. Для SMC домена PARIS/Old можно предложить роль сенсора, а для TOPRIM нуклеазы - эффектора, однако, принципы активации этих систем различаются. Мы показали, что каждая из делеций RecB/RecC/RecD, но не RecA, приводит к смерти клеток, в которых экспрессируется Old. Из этого можно предположить, что Old является сенсором целостности комплекса RecBCD, но при этом не влияет на его репаративную/рекомбинационную функции.

Поскольку многие фаги манипулируют активностью RecBCD в ходе инфекции, это может привести к запуску абортивного ответа Old. Чтобы проверить эту гипотезу мы клонировали ингибиторы RecBCD - белки Gam фага λ и 5.9 фага T7. В то время как экспрессия этих белков в контрольной культуре не была токсична, в присутствии Old она приводила к гибели клеток. Более того, фаг λ с мутациями в гене, кодирующем Gam, был способен эффективно инфицировать Old культуру. Поскольку в нашей коллекции обнаружилось большое количество фагов чувствительных к Old, но не кодирующих гомологов Gam, 5.9 или Abc белков (RecBCD ингибитор фага P22), это предполагает возможность открытия новых классов вирусных анти-RecBCD белков. Помимо этого, некоторые фаги, явно манипулирующие активностью RecBCD, не активировали Old защиту, что в свою очередь предполагает наличие у них уже специальных механизмов, позволяющих избежать активации Old.

Работа поддержана грантом РФФИ (22-14-00004) а также грантом Министерства Науки и Образования Российской Федерации (075-10-2021-114).

Метилтрансфераза VrxX (PglX) определяет сайт-специфичность системы защиты BREX I типа

Дробязко Алёна¹, Дмитрий Гиляров², Тим Бловер³, Северинов Константин⁴, Исаев Артём¹

¹ Сколковский институт науки и технологий, Москва

² Центр Джона Иннеса, Норидж, Великобритания

³ Университет Дарема, Дарем, Великобритания

⁴ Институт Микробиологии Ваксмана, Нью Джерси, США

Бактериофаги (или фаги) - это внутриклеточные бактериальные паразиты, способные синтезировать новые фаговые частицы только внутри хозяйского организма. Так как высвобождение новых частиц чаще всего сопровождается гибелью клетки, в ходе эволюции бактерии приобрели множество разнообразных систем защиты против фаговой инфекции. Мы исследуем механизм бактериальной защитной системы BREX I типа, которая состоит из шести белков, гомологичных метилтрансферазе (VrxX), AAA+ АТФазе (VrxC), щелочной фосфатазе (VrxZ), Lon протеазе (VrxL). Подобно некоторым системам рестрикции-модификации (R-M), BREX метилирует специфические асимметричные участки в геноме хозяина, чтобы отличить свою ДНК от ДНК фага. Несмотря на это, в отличие от R-M систем, механизмы рестрикции фаговой ДНК все еще неизвестны.

Каким бы ни был механизм работы системы BREX, он начинается с обнаружения неметилированных BREX сайтов в геноме фага на ранних стадиях инфекции. Таким образом, мы решили исследовать, как белки BREX взаимодействуют с ДНК *in vivo* и *in vitro*. С помощью EMSA мы показывали, что белок VrxX (PglX), аденинметилтрансфераза, специфично и SAM-зависимо связывает дцДНК *in vitro*. При этом белок VrxX обладал повышенным сродством к ДНК субстратам, содержащим BREX сайты, что указывает на то что метилтрансфераза VrxX содержит домены распознавания мишени (TRD) и ответственна за взаимодействие с чужеродной ДНК при инфекции фагом. С помощью модифицированного варианта ChIP-Seq протокола мы продемонстрировали *in vivo* связывание VrxX с BREX сайтами в геноме фага T7 на ранних стадиях инфекции. Кроме того, в работе был исследован механизм ингибирования BREX защиты ДНК- мимикрирующим белком Osg, кодируемым фагом T7. При почти эквимоллярных концентрациях димеров Osg по отношению к VrxX было продемонстрировано, что Osg полностью препятствует связыванию VrxX с ДНК *in vitro*. И наконец, мы разрешили структуру метилтрансферазы VrxX в апоформе с разрешением 2.5 Å и сравнили её со структурами отдаленных гомологов - метилтрансфераз SamA и MmeI. Благодаря этому удалось показать, что VrxX содержит не только ДНК-распознающий и метилирующий домены, но и дополнительные участки на N и C концах белка, вероятно, необходимые для образования комплексов с другими белками системы BREX.

В целом, наши результаты показывают, что метилтрансфераза VrxX определяет сайт-специфичность системы BREX, и что Osg ингибирует защиту BREX, предотвращая распознавание ДНК, опосредованное VrxX.

Работа поддержана грантами РФФИ (Ко_А_21-54-10001), РНФ (22-14-00004 и 22-74-00126) а также грантом Министерства Науки и Образования Российской Федерации (075-10-2021- 114).

Метагеномика *Apis mellifera* Северного Кавказа: микробный состав, индикаторные виды, потенциальные патогены

Козлова А. Д.¹, Федоров Д. И.², Изотова А. О.¹, Виноградова Е. Н.^{1,3}, Кочетова Э. С.¹, Тошаков С.В.¹

¹ НИЦ Курчатовский институт, Курчатовский геномный центр

² НИИ системной биологии и медицины

³ Биологический факультет, Московский Государственный Университет им. М.В. Ломоносова, Москва

Бактериальный состав кишечника пчел *Apis mellifera* является важным фактором, определяющим жизнеспособность и продуктивность колонии [1]. По литературным данным, коровый состав микробиоты кишечника пчел является постоянным [2], однако в зависимости от места обитания, рациона питания и факторов окружающей среды может наблюдаться вариабельность.

В рамках данной работы при помощи *shotgun*-метагеномики и профилирования сообществ по гену 16S рРНК был проведен анализ состава микробиома *Apis mellifera*, отобранных в высокогорных пасеках республики Северная Осетия-Алания с целью (а) провести сравнительный анализ корового состава микробных сообществ в зависимости от местообитания и (б) выявить потенциально энтомопатогенные микроорганизмы в составе микробиоты.

Гипотеза о различиях состава микробиоты в зависимости от местообитания проверялась при помощи пермутационного многомерного дисперсионного анализа состава сообществ в различных экспериментальных группах. Результаты анализа показали отсутствие достоверных различий состава микробиоты у пчел, отобранных в разных ущельях и на разной высоте. Однако, у некоторых особей в экспериментальных группах был выявлен нестандартный состав микробиоты, что дало возможность предположить, что данные пчелы подвержены инфекции.

Для проверки данного предположения, на биоматериале пчел, имеющих в составе кишечника потенциальные патогены, было проведено *shotgun*-секвенирование. Анализ полученных данных проводился двумя методами: (1) сборка, биннинг и таксономическая классификация MAG, и (2) реконструкция полноразмерных генов рРНК при помощи *phyloflash*. Оба подхода показали присутствие энтомопатогенных микроорганизмов *Serratia marcescens* и представители рода *Pantoea* в кишечнике 2х пчел из 5ти проанализированных. В составе микробного сообщества трех других пчел также наблюдалось доминирование родов, отдельные представители которых являются патогенами насекомых. Возможно, эти микроорганизмы представляют собой не описанные патогенные штаммы. С целью подтверждения данного предположения, был проведен *gene calling* и функциональная аннотация полученных бинов для поиска генов, кодирующих потенциальные энтомотоксины.

Полученные результаты предполагают, что состав микробиоты может служить достоверным диагностическим признаком жизнеспособности пчелиных колоний, а доминирующие в составе метагенома MAGи могут представлять собой интерес, как новые, не описанные патогенные штаммы.

[1]. Raymann K., Moran N. A. The role of the gut microbiome in health and disease of adult honey bee workers //Current opinion in insect science. – 2018. – Т. 26. – С. 97-104.

[2]. Kešnerová L. et al. Disentangling metabolic functions of bacteria in the honey bee gut //PLoS biology. – 2017. – Т. 15. – №. 12. – С. E2003467.

Сравнительный анализ микробиома рака полости рта у молодых и пожилых пациентов

Кононова Л.А.¹, Колегова Е.С.², Федорова И.К.², Кульбакин Д.Е.², Жалсанова И.Ж.³, Сивцев А.А.³,
Скрябин Н.А.³, Денисов Е.В.²

¹ Сибирский государственный медицинский университет, Россия, г. Томск

² НИИ онкологии, Томский НИМЦ Российской академии наук, Россия, г. Томск

³ НИИ медицинской генетики, Томский НИМЦ Российской академии наук, Россия, г. Томск

Актуальность. Плоскоклеточная карцинома полости рта (ПКПР) наблюдаются преимущественно у мужчин на шестом-седьмом десятилетий жизни, злоупотребляющих табаком и алкоголем [1]. Однако за последние 30 лет возросло число пациентов с ПКПР моложе 45 лет [2]. При этом для молодых пациентов с ПКПР характерно отсутствие этиологических факторов, характерных для больных опухолями головы и шеи старшего возраста: употребление табака, алкоголя и инфицирование вирусом папилломы человека [3], [4]. Одной из возможных причин возникновения ПКПР может быть дисбиоз ротовой полости.

Цель исследования. Изучить особенности микробиомного сообщества ПКПР у пациентов молодого возраста (≤ 45 лет) в сравнении с больными старше 45 лет.

Материал и методы. Исследование было выполнено на базе НИИ онкологии и НИИ медицинской генетики Томского НИМЦ. Сформированы две группы больных ПКПР стадии T2-3N0-2M0 в возрасте до ($n=5$) и старше 45 лет ($n=5$), не курящих и не получавших неоадьювантную химиотерапию. Материалом для исследования явилась опухолевая ткань. Из образцов опухолевой ткани была выделена ДНК с помощью набора DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen, США) для дальнейшей амплификации 16S рДНК (Illumina, США). Статистическая обработка результатов была выполнена с использованием программы Statistica 10 и RStudio 2022.07.2.

Результаты. Был проанализирован профиль микробиомного сообщества ПКПР у пациентов моложе и старше 45 лет. Индекс Chao1 варьирует для микробиомов опухоли у молодых пациентов от 171 до 197, для микробиомов опухоли у пациентов старше 45 лет – от 166 до 197. Индекс Шеннона микробиома опухоли молодых пациентов составил $3,48 \pm 0,24$, у пожилых $3,1 \pm 0,47$. Статистически значимых различий по индексам Chao1 и Шеннона выявлено не было. Количество сиквенсов бактерий рода *Vibersteinia*, *Haemophilus*, *Erysipelothrix* и *Rubrivivax* в ткани ПКПР в 3,0-5,7 раз выше у молодых пациентов по сравнению с пациентами старше 45 лет. У возрастных пациентов значимо выше в 3,1 раза содержание бактерий рода *Fusobacterium* по сравнению с молодыми больными (рис. 1А). На уровне вида у молодых больных с ПКПР в 4,2 раза выше количество *Haemophilus parainfluenzae*, а у возрастных больных в 4,8 раз увеличено содержание *Ruminococcus gnavus*. Вид *Vibersteinia trehalosi* встречался только у пациентов с ПКПР моложе 45 лет в 60% случаев (рис. 1Б).

Заключение. Результаты работы демонстрируют специфический профиль микробиомного сообщества ПКПР у пациентов моложе 45 лет. Полученные данные могут послужить основой для разработки новых методов мониторинга возникновения и прогрессирования ПКПР у молодых пациентов.

Работа выполнена при финансовой поддержке Гранта Президента РФ № МК-1940.2022.3 и при использовании оборудования Центра коллективного пользования «Медицинская геномика» Томского НИМЦ.

[1] C. Rivera, “Essentials of oral cancer,” *Int J Clin Exp Pathol*, vol. 8, no. 9, pp. 11884–11894, 2015.

[2] E. Majchrzak *et al.*, “Oral cavity and oropharyngeal squamous cell carcinoma in young adults: a review of the literature,” *Radiol Oncol*, vol. 48, no. 1, pp. 1–10, Jan. 2014, doi: 10.2478/raon-2013-0057.

[3] H. J. Ryu, E. K. Kim, B. C. Cho, and S. O. Yoon, “Characterization of head and neck squamous cell carcinoma arising in young patients: Particular focus on molecular alteration and tumor immunity,” *Head Neck*, vol. 41, no. 1, pp. 198–207, Jan. 2019, doi: 10.1002/hed.25507.

[4] T. N. Toporcov *et al.*, “Risk factors for head and neck cancer in young adults: a pooled analysis in the INHANCE consortium,” *Int J Epidemiol*, vol. 44, no. 1, pp. 169–185, Feb. 2015, doi: 10.1093/ije/dyu255.

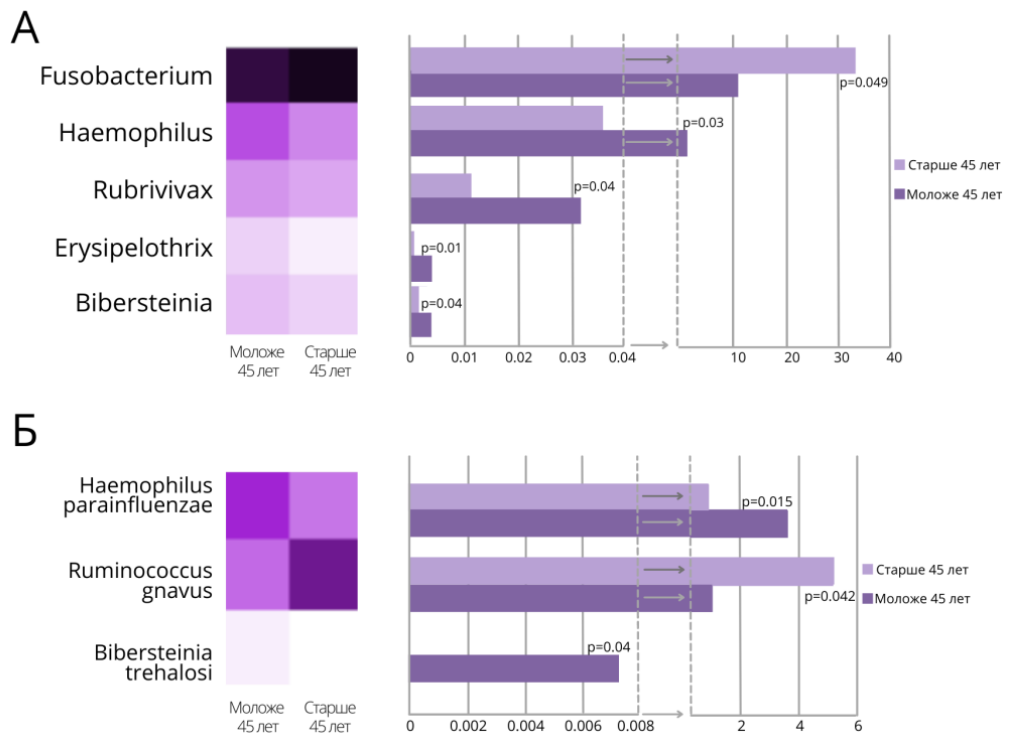


Рисунок 1. Результаты сравнительного анализа количества сиквенсов бактерий на уровне рода (А) и на уровне вида (Б)

Идентификация комплекса патогенов во время вспышки инфекционного заболевания свиней

Красников Никита Юрьевич¹, Южаков Антон Геннадиевич¹

¹ ФГБНУ ФНЦ Всероссийский научно-исследовательский институт экспериментальной ветеринарии имени К. И. Скрябина и Я. Р. Коваленко РАН, Москва

Введение. Инфекционные заболевания животных в большинстве своем носят полиэтиологичный характер. В связи с этим даже современные методы диагностики могут давать неполное представление о причине заболевания из-за ограниченного количества обнаруживаемых патогенов. Практическим решением данной проблемы может стать метод нанопорового секвенирования. Целью исследования являлось изучение спектра возбудителей у клинически больных животных методом нанопорового секвенирования.

Материалы и методы. Исследование проводилось во время вспышки инфекционного заболевания на свиноводческом предприятии в Сибири. Симптомы, наблюдаемые на этапе дорацивания: вялость, чихание, повышение температуры тела, нервные расстройства. У павших животных отмечали полисерозиты, дегенеративные изменения тканей органов. Исследовали смывы из носовой полости от живых и мазки с органов от павших животных.

Пробоподготовка осуществлялась согласно методике, предложенной компанией PathoSense BV (Мерельбеке, Бельгия). Подготовка библиотеки для секвенирования осуществлялась с помощью набора Rapid Barcoding Kit (SQK-RBK004). Секвенирование проводилось с использованием секвенатора MinION (Оксфорд, Великобритания). Бейсколлинг и демультиплексирование осуществлялись на платформе MinKNOW. Дальнейший биоинформатический анализ проводился на платформе Ubuntu 18.04 с использованием пакета программ канала bioconda. Прочтения в формате fastq были отобраны по качеству с использованием программы NanoFilt (Q-score ≥ 7). Прочтения, характерные для генома хозяина, были удалены путем картирования на референсный геном свиньи и дальнейшей сортировки с использованием программ minimap2 (2.24) и samtools (1.6). Для проведения таксономической классификации применялась программа kraken2 (2.1.2) с использованием подготовленных баз данных. Для визуализации данных использовались программы Krona (2.8.1) и Pavian.

Результаты. Среди вирусных последовательностей были найдены фрагменты геномов, принадлежащие следующим патогенам свиней: вирус репродуктивно-респираторного синдрома свиней (PPCC), вирусов рода Astrovirus. В малых количествах отмечались фрагменты геномов вируса гриппа А, вирусов родов *Sapelovirus*, *Picobirnavirus*, *Parainfluenzavirus*, *Vocaparvovirus*, *Pestivirus*. Среди бактериальных фрагментов преобладали прочтения, характерные для *Mycoplasma hyorhinitis*. В меньшем количестве фрагменты, характерные для родов *Haemophilus*, *Campylobacter*, *Escherichia*, *Pasteurella*, *Chlamydia*.

Заключение. Методом нанопорового секвенирования было исследовано 4 образца от живых и павших поросят. Полученные результаты в совокупности с клинической картиной показывают комплексную этиологию заболевания с доминирующим участием вируса PPCC, бактерий *Mycoplasma hyorhinitis* и *Haemophilus parasuis*. Подобные комплексы патогенов уже отмечались в работах ряда авторов [1], [2]. Метагеномный подход с применением метода нанопорового секвенирования может стать новым решением в эффективной диагностике заболеваний животных.

[1] A. Palzer, K. Haedke, K. Heinritzi, S. Zoels, A. Ladinig, and M. Ritzmann, "Associations among *Haemophilus parasuis*, *Mycoplasma hyorhinitis*, and porcine reproductive and respiratory syndrome virus infections in pigs with polyserositis," *Can Vet J*, vol. 56, no. 3, pp. 285–287, Mar. 2015.

[2] J.-A. Lee et al., "Mycoplasma hyorhinitis is a potential pathogen of porcine respiratory disease complex that aggravates pneumonia caused by porcine reproductive and respiratory syndrome virus," *Vet Immunol Immunopathol*, vol. 177, pp. 48–51, Sep. 2016, doi: 10.1016/j.vetimm.2016.06.008

Работа выполнена в рамках гранта Минобрнауки «Использование передовых технологий для скрининга патогенов, окружающей среды и свиней для повышения качества санитарно-эпидемиологического контроля в стадах свиней». Соглашение № 075-15-2021-948 от 04.10.2021г, части международного европейского проекта Горизонт 2020 Era-Net ICRAD «Международная координация исследований в области инфекционных заболеваний животных».

Изучение субстратной специфичности и физико-химических свойств новых N-ацетилтрансфераз из гипертермофильных организмов

Кудряшов Тимофей Андреевич¹, Трунилина Мария Викторовна^{1,2}, Болдаевский Игорь Сергеевич^{1,3}, Соколов Андрей Сергеевич¹, Локтюшов Евгений Владимирович¹, Шевелева Марина Петровна¹, Лаптева Юлия Сергеевна¹

¹ Институт биологического приборостроения с опытным производством РАН, ФИЦ ПНЦБИ РАН, Пущино

² Факультет микробиологии и биотехнологии, Пущинский Государственный Естественно-научный Институт, Пущино

³ Факультет БиоМедФарм Технологический, Пущинский Государственный Естественно-научный Институт, Пущино

Ацетилтрансферазы GNAT-суперсемейства катализируют перенос ацетильной группы от ацетил-коэнзима А на различные субстраты, такие как полиамины, витамины, аминокликозидные антибиотики, микроцины, лантибиотики, катехоламины, аминокислоты, пептиды и белки [1, 2]. Ферменты семейства N-концевых ацетилтрансфераз (NAT) осуществляют N-концевое ацетилирование белков, пептидов и ряда антибиотиков [3-5], что существенно влияет на стабильность их структур и биологические функции [6]. NAT используют для направленного ацетилирования биотехнологически важных рекомбинантных белков и пептидов [7, 8].

Целью данной работы является изучение субстратной специфичности и физико-химических свойств новых N-концевых ацетилтрансфераз из экстремальных термофилов *Thermus thermophilus* и *Pyrococcus furiosus*. С использованием методов биоинформатики мы провели анализ геномов *T. thermophilus* и *P. furiosus*, разработали алгоритм для идентификации предполагаемых NAT и отобрали 6 NAT из *T. thermophilus* и 2 NAT из *P. furiosus*. Методами клонирования генов NAT, их гетерологичной экспрессии в клетках *E. coli* и последующей аффинной хроматографией на Ni-NTA агарозе были получены рекомбинантные ферменты, несущие на C-конце 6 остатков гистидина.

С использованием методов физической химии нами проведено изучение свойств ряда ферментов. Получены данные о термостабильности, содержании элементов вторичных структур, четвертичной структуры ферментов. Проводятся работы по исследованию их субстратной специфичности.

[1] J. Ren, Y. Sang, J. Lu, and Y. F. Yao, "Protein Acetylation and Its Role in Bacterial Virulence," *Trends Microbiol*, vol. 25, pp. 768-779, Sep 2017.

[2] K. L. Hentchel and J. C. Escalante-Semerena, "Acylation of Biomolecules in Prokaryotes: a Widespread Strategy for the Control of Biological Function and Metabolic Stress," *Microbiol Mol Biol Rev*, vol. 79, pp. 321-46, Sep 2015.

[3] S. Deng and R. Marmorstein, "Protein N-Terminal Acetylation: Structural Basis, Mechanism, Versatility, and Regulation," *Trends Biochem Sci*, vol. 46, pp. 15-27, Jan 2021.

[4] E. Huang and A. E. Yousef, "Biosynthesis of paenibacillin, a lantibiotic with N-terminal acetylation, by *Paenibacillus polymyxa*," *Microbiol Res*, vol. 181, pp. 15-21, Dec 2015.

[5] T. Kazakov, K. Kuznedelov, E. Semenova, D. Mukhamedyarov, K. A. Datsenko, A. Metlitskaya, G. H. Vondenhoff, A. Tikhonov, V. Agarwal, S. Nair, A. Van Aerschot, and K. Severinov, "The RimL transacetylase provides resistance to translation inhibitor microcin C," *J Bacteriology*, vol. 196, pp. 3377-85, 2014.

[6] A. Drazic, L. M. Myklebus, R. Ree, and T. Arnesen, "The world of protein acetylation," *Biochimica et Biophysica Acta*, vol. 1864, pp. 1372-1401, 2016.

[7] J. Chen, H. Li, T. Wang, S. Sun, and J. Liu, "Production of N(alpha)-acetyl Talpha1-HSA through in vitro acetylation by RimJ," *Oncotarget*, vol. 8, pp. 95247-95255, Nov 10 2017.

[8] R. S. Esipov, D. A. Makarov, V. N. Stepanenko, and A. I. Miroshnikov, "Development of the intein-mediated method for production of recombinant thymosin beta4 from the acetylated in vivo fusion protein," *J Biotechnol*, vol. 228, pp. 73-81, Jun 20 2016

Роль С-конца в активности белков Аргонавтов бактерий разных групп

Кусакина Ксения Алексеевна^{1,2}, Есюнина Дарья Михайловна², Кульбачинский Андрей Владимирович², Агапов Алексей Александрович²

¹ Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, биологический факультет, кафедра биохимии, Москва

² НИЦ «Курчатовский институт» - ИМГ, Москва

Белки Аргонавты являются ключевыми компонентами системы РНК-интерференции, представленной практически у всех эукариот. Комплексы Аргонавтов с загруженными короткими РНК гидами способны распознавать комплементарную РНК-мишень, разрезать ее, либо привлекать другие белки. Гены белков-Аргонавтов найдены у 10% прокариот. Большинство активных эндонуклеаз среди Аргонавтов прокариот используют ДНК гид для расщепления ДНК мишени.

Недавно была охарактеризована новая группа прокариотических Аргонавтов, представители которой используют ДНК гид для расщепления РНК мишени. Белки данной группы можно разделить на 2 подгруппы – с классическим карманом связывания 5'-конца гида и с уникальным. Анализ структуры одного из представителей второй подгруппы новых Аргонавтов, PliAgo *Pseudoceanicola lipolyticus*, в комплексе с гидовой ДНК выявил ряд особенностей связывания гида, ранее не описанных ни для эукариотических, ни для прокариотических Аргонавтов. В отличие от всех других Аргонавтов С-конец PliAgo не принимает участия в связывании 5'-конца гидовой ДНК, также для связывания гида не нужен ион Mg²⁺, и структура кармана для связывания 5'-конца гида в целом сильно отличается от ранее охарактеризованных. Еще несколько представителей этой уникальной группы Аргонавтов бактерий также были охарактеризованы биохимически, однако для них не удалось получить структурных данных.

В данной работе с помощью исследования биохимических свойств *in vitro* мутантных белков изучена роль С-конца белка в связывании гида двух представителей новой группы Аргонавтов с классическим карманом связывания 5'-конца гида, расщепляющих РНК мишени, будучи загруженными ДНК гидами. Были клонированы и выделены белки-Аргонавты PnyAgo бактерии *Pedobacter nyackensis* и MpoAgo бактерии *Mucilaginibacter polytrichastri* с делециями С-конца и химерные белки с добавленным к С-концу доменом белка GFP. Были измерены константы связывания гидовой ДНК в различных условиях и скорость разрезания РНК мишени. Оказалось, что мутантные белки PnyAgo и MpoAgo с модифицированным С-концом несколько отличаются по свойствам от соответствующих мутантов PliAgo. Было показано, что С-концевые модификации не ухудшают ни связывание гидовой ДНК, ни расщепление РНК-мишени для аргонавтов MpoAgo и PnyAgo.

Таким образом, в данной работе была исследована роль С-конца белков Аргонавтов PnyAgo и MpoAgo в эффективности связывания гида и разрезания мишени. Результаты работы могут служить фундаментом для создания новых химерных белков Аргонавтов для применения в качестве инструментов молекулярной биологии.

Работа поддержана грантом МГУ 0417-223-2022.

[1] Ryazansky S, Kulbachinskiy A, Aravin AA. «The Expanded Universe of Prokaryotic Argonaute Proteins» *mBio*. 2018 Dec 18;9(6): e01935-18.

[2] Kuzmenko A, Oguienko A, Esyunina D, Yudin D, Petrova M, Kudinova A, Maslova O, Ninova M, Ryazansky S, Leach D, Aravin AA, Kulbachinskiy A. «DNA targeting and interference by a bacterial Argonaute nuclease». *Nature*. 2020 Nov; 587(7835):632-637.

[3] Lisitskaya L, Aravin AA, Kulbachinskiy A. «DNA interference and beyond: structure and functions of prokaryotic Argonaute proteins». *Nat Commun*. 2018 Dec 4;9(1):5165

Сравнительная геномика штаммов новых видов рода *Vibrio*, выделенных из мукуса ловчей сети морской полихеты *Chaetopterus variopedatus*

Личманюк Дарина Олеговна¹, Отставных Надежда Юрьевна², Балдаев Сергей Николаевич²,
Куриленко Валерия Валерьевна², Исаева Марина Петровна²

¹ Дальневосточный федеральный университет, Владивосток

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

Бактерии семейства *Vibrionaceae* хорошо известны не только как возбудители заболеваний человека и животных, но также, как полезные бактерии-симбионты, заселяющие световые органы головоногих моллюсков и морских рыб. Вибрионы играют важную роль в геобиохимических циклах океана [1] и являются продуцентами редких метаболитов [2].

Целью данного исследования было получение и сравнительный анализ геномов представителей новых видов рода *Vibrio* (на основе данных MLSA [3]), выделенных из мукуса ловчей сети морской полихеты *Chaetopterus variopedatus*.

Геномы штаммов *Vibrio* spp. CB1-5 и CB2-7 были получены путем секвенирования на платформе MiSeq (Illumina, США). Согласно аннотации геномов, выполненной на сервере RAST, геном CB1-5 представлен 79 контигами с N50 116528 п.н. (размер генома – 4823934 п.н., ГЦ-состав – 46.00 мол%). Вторым геном CB2-7 был собран в 262 контига с N50 58665 п.н. (размер генома – 5212256 п.н., ГЦ-состав – 44.50 мол%). Также для сравнения использовался геном другого штамма *Vibrio* sp. CB1-14.

Поиск генов биосинтеза вторичных метаболитов, выполненный на сервере antiSMASH, показал присутствие во всех исследуемых геномах генетических кластеров биосинтеза RiPP и бета-лактона. В геноме CB1-14 обнаружен кластер биосинтеза нуклеозидов, а в геноме CB2-7 дополнительно еще четыре кластера: биосинтеза сидерофора, арилполиена, эктоина и полиненасыщенных жирных кислот. Идентификация генов ферментов углеводного обмена была проведена на сервере dbCAN2 v.11. Предсказано 37 семейств гликозил-гидролаз (GH), среди которых наиболее представленными были GH13, GH23, GH1, GH103, GH3 и GH18. Из 17 семейств гликозил-трансфераз (GT) наиболее часто встречались GT2, GT4 и GT51. Идентифицировано по шесть семейств полисахаридлиаз (PL), ферментов дополнительной активности (AA), эстераз (CE) и 17 семейств углевод-связывающих модулей (CBM). Наиболее представленными были PL17, PL7, CBM50, CBM5 и CBM48.

Микробиомный анализ проб ловчей сети и кишечника *Ch. variopedatus*, а также морского грунта был проведен путем секвенирования ампликонов гена 16S рДНК (участок V3-V4) на платформе MiSeq (Illumina, США). Анализ полученных данных был проведен с помощью CLC Genomic Workbench 22.0 (Qiagen, Германия). Показано, что CB1-5 представлен, главным образом, в морском грунте, а CB1-14 и CB2-7 в кишечнике.

Таким образом, сравнительная геномика вибрионов позволяет получить представление о гидролитическом и биосинтетическом потенциале представителей новых видов рода *Vibrio*.

Исследование поддержано Грантом Министерства науки и высшего образования Российской Федерации 15.BRK.21.0004 (соглашение № 075–15-2021-1052).

[1] FL Thompson, T Iida, and J Swings, “Biodiversity of vibrios.,” *Microbiol Mol Biol Rev.*, vol. 68, no. 3, pp. 403-31, Sep 2004, doi: 10.1128/MMBR.68.3.403-431.2004.

[2] T Makarieva, L Shubina, V Kurilenko, M Isaeva, N Chernysheva, R Popov, E Bystritskaya, P Dmitrenok, and V Stonik., “Marine Bacterium *Vibrio* sp. CB1-14 Produces Guanidine Alkaloid 6-*epi*-Monanchorin, Previously Isolated from Marine Polychaete and Sponges.,” *Marine drugs.*, vol. 17, no. 4, pp. 213, 2019, doi: 10.3390/md17040213.

[3] Д. О. Личманюк, Н. Ю. Отставных, В. В. Куриленко, М. П.Исаева, “Мультилокусный анализ морских бактерий рода *Vibrio*, выделенных из мукуса ловчей сети морской полихеты *Chaetopterus variopedatus*.,” Сборник тезисов Всероссийской научной молодежной конференции “Геномика и биотехнология микроорганизмов”, 19-23 сентября 2022, Владивосток.

Изучение эволюции систем рестрикции-модификации с эндонуклеазой рестрикции семейства AlwI

Макарикова Ольга Леонидовна^{1,2}, Алексеевский Андрей Владимирович^{2,3}

¹ Факультет биоинженерии и биоинформатики, МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва

² НИИ ФХБ им. Белозерского, Москва

³ НИИСИ РАН, Москва

Введение: Система рестрикции-модификации (Р-М) представляет собой систему защиты прокариот от чужеродной ДНК. Она обладает двумя ферментами: эндонуклеазой рестрикции (ЭР) и метилтрансферазой (МТаз). ЭР систем типа II, принадлежащие семейству AlwI и представленные в Pfam доменом RE_AlwI, перспективны для использования в молекулярной биологии в качестве ников [1]. Целью данной работы является изучение эволюции систем Р-М, содержащих белки этого семейства. Для изучения эволюции классов систем Р-М за основу классификации берется набор каталитических доменов ферментов этих систем.

Материалы и методы: НММ-профиль RE_AlwI из базы данных Pfam был размечен в соответствии со структурными доменами ников N.BspD6I [1] (pdb 2EWF) путем сопоставления ее последовательности с профилем. НММ-профиль cat_AlwI, описывающий каталитический домен ЭР, был создан с использованием программы HMMER3 на основе проверенной и избыточной выборки 87 последовательностей каталитического домена ЭР семейства AlwI из REBASE. НММ-профили RE_AlwI и cat_AlwI были сравнены путем поиска всех белков из 1089 полных протеомов прокариот из базы данных Uniprot, содержащих хотя бы один белок с доменом RE_AlwI. Для наиболее представленного класса с одной ЭР и двумя МТазы семейства MethyltransfD12 из Pfam получены координаты генов белков ЭР, обнаруженных по профилю cat_AlwI в указанных выше 1089 протеомах, и МТаз, обнаруженных в тех же 1089 протеомах по профилю MethyltransfD12. Последовательности, расположенные в одном локусе и наиболее вероятно связанные с одной и той же системой Р-М отобраны для построения филогенетических деревьев.

Результаты: Профиль домена RE_AlwI покрывает лишь небольшую часть каталитического домена ЭР. Поэтому мы построили новый профиль cat_AlwI. Оказалось, что 84 последовательности из 1089 полных протеомов прокариот, содержащих домен RE_AlwI, но не домен cat_AlwI, обнаруживаются по профилю RE_AlwI за счет сходства ДНК-связывающего и линкерного доменов, а не каталитического. Значит, профиль cat_AlwI лучше представляет семейство AlwI в рамках нашей задачи, и он был использован для дальнейших исследований. Системы Р-М, имеющие ЭР с доменом cat_AlwI, составляют 10 классов, а соответствующие МТазы принадлежат к 3 различным семействам. Наиболее представленным оказался класс с одной ЭР и двумя МТазы семейства MethyltransfD12. Для этого класса систем Р-М оказалось, что филогенетическое дерево из 158 МТаз делится на две кледы одинакового размера, так что одна МТаз принадлежит к одной клее, а вторая из той же системы к другой. Эти удивительные различия в последовательностях МТаз могут быть связаны с непалиндромными сайтами узнавания, что требует дальнейшего изучения.

Выводы: Было показано, что новый профиль, основанный на каталитическом домене ников N.BspD6I, лучше представляет семейство ЭР AlwI. Результаты, полученные в рамках филогенетического анализа, позволяют предположить, что две МТазы, принадлежащие к одной системе Р-М, претерпевают дивергентную эволюцию. Различия, наблюдаемые в последовательностях МТаз, могли возникнуть в ответ на появление непалиндромных сайтов узнавания. На основе сходства последовательностей были найдены потенциально новые ники.

Это исследование поддержано грантом РФФ 21-14-00135.

[1] L. A. Zheleznaya, G. S. Kachalova, R. I. Artyukh, A. K. Yunusova, T. A. Perevyazova and N. I. Matvienko, "Nicking endonucleases.," *Biochemistry (Moscow)*, vol. 74, no. 13, pp. 1457-1466, 2009, doi:10.1134/S0006297909130033

Первая сборка генома психротолерантного фитопатогенного гриба *Microdochium nivale*

Маренина Екатерина Андреевна¹, Церс Иван Дмитриевич¹, Ткаченко Александр Анатольевич², Потапенко Евгений Викторович^{3,4}, Мураева Ольга Анатольевна⁵, Гоголева Наталья Евгеньевна¹, Гоголев Юрий Викторович¹, Горшков Владимир Юрьевич¹

¹ Федеральный Исследовательский Центр Казанский Научный Центр Российской Академии Наук, Казань, Россия

² Лаборатория «Компьютерные технологии», Университет ИТМО, Санкт-Петербург, Россия

³ Институт Эволюции, Университет Хайфы, Хайфа, Израиль

⁴ Кафедра эволюционной и экологической биологии, Университет Хайфы, Хайфа, Израиль

⁵ Институт Биоинформатики, Санкт-Петербург, Россия

Цель работы: сборка и аннотация генома высоковирулентного штамма психротолерантного фитопатогенного аскомицета *Microdochium nivale*. Этот гриб вызывает вредоносное заболевание розовая снежная плесень озимых зерновых культур. В многоснежные годы это заболевание может приводить к потере до 70% урожая. В нашем исследовании мы применили гибридную сборку на основе прочтений Oxford Nanopore и Illumina для расшифровки и аннотации первой последовательности генома *M. nivale*. Аннотированные гены этого гриба были классифицированы в метаболические пути для выяснения генетического потенциала *M. nivale* к синтезу факторов вирулентности и опасных для человека микотоксинов.

Методы: Подготовка библиотек для секвенирования проводилась по стандартным протоколам. Полученные прочтения Nanopore и Illumina были отфильтрованы по минимальной длине и качеству с помощью Nanofilt и FastQC, MultiQC, fastp, соответственно. Геном *M. nivale* был собран с помощью ассемблера Canu v.1.8. Смежность и полнота сборки оценивались с помощью QUAST и BUSCO, соответственно. Границы транскриптов мРНК определяли с помощью картирования прочтений Illumina RNA-Seq. Функции белков *M. nivale* были предсказаны с помощью программы Mantis с использованием наборов скрытых марковских моделей эталонных белков *Ascomycota* из баз данных PFAM, TCDB, NCBI и KEGG. Информация из баз данных GO, KEGG, KOG и CAZy была объединена с аннотацией генов *M. nivale* и использована для автоматической классификации генов по функциональным категориям с помощью языка программирования R. Объединенная классификация на основе вышеупомянутых баз данных была создана, проверена и отредактирована вручную.

Результат: С помощью гибридной сборки на основе прочтений Oxford Nanopore и Illumina расшифрована нуклеотидная последовательность генома *M. nivale*. Размер генома составил 37 029 846 п.н., которые были распределены по 16 скаффолдам, 12 из которых были длинее 1 Мб. С помощью картирования ридов, соответствующих транскриптам генов *M. nivale*, а также с помощью предсказания генов, кодирующих тРНК и рРНК, в сборке генома выявлено 11 963 гена (в том числе 11 788 генов, кодирующих белки). Чтобы лучше понять генетический потенциал *M. nivale* и получить удобную референсную последовательность для транскриптомных исследований этого вида, идентифицированные гены были аннотированы и разделены на иерархические трехуровневые функциональные категории. С использованием PHI-base в геноме *M. nivale* были идентифицированы продукты генов, которые лучше всего соответствуют критериям факторов вирулентности. В эту категорию вошли секретируемые белки и микотоксины, такие как фумонизин, охратоксин В, афлатоксин и глиотоксин.

Выводы: Проведена сборка и аннотация последовательности генома *M. nivale*. Выявлены гены, продукты которых, по всей вероятности, определяют вирулентность исследуемого фитопатогена. Обнаружены метаболические пути *M. nivale*, отвечающие за синтез опасных для человека микотоксинов.

Работа выполнена при поддержке государственного задания ФИЦ КазНЦ РАН.

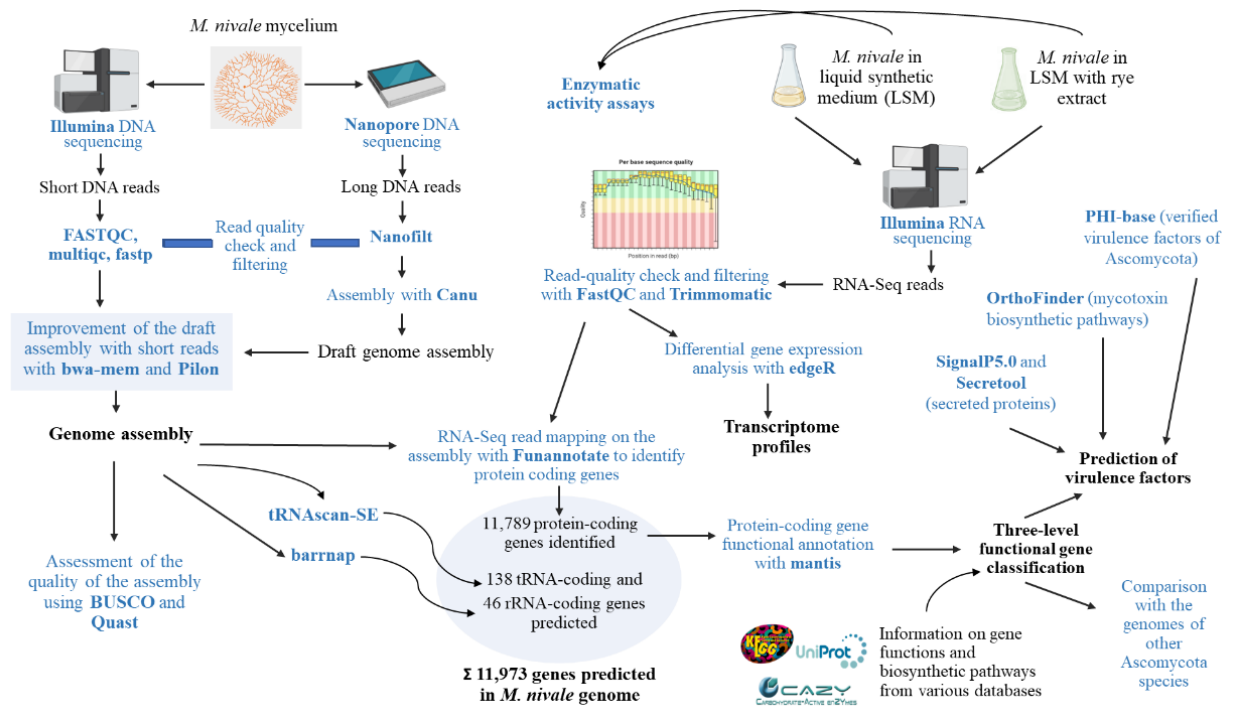


Рисунок 1. Этапы рабочего процесса сборки

Посттрансляционная модификация лактазолицина – нового азотсодержащего пептида из *Lactobacillus crispatus* UMB0824

Павлов Константин Денисович^{1,2}, Травин Дмитрий Юрьевич^{1,2}, Северинов Константин Викторович³

¹ Сколковский институт науки и технологий, Москва

² Институт биологии гена РАН, Москва

³ Ратгерский университет, Нью-Браунсуик

Рибосомно синтезированные и посттрансляционно модифицированные пептиды (РПП) представляют собой обширную группу биологически активных веществ, продуцируемых бактериями и некоторыми эукариотами. Зрелый РПП является результатом модификации пептида-предшественника, синтезированного на рибосоме, специализированными ферментами [1]. РПП классифицируются на более чем 40 групп в соответствии с типом вносимых модификаций. Один из таких классов представлен линейными пептидами, содержащими азол(ин)овые гетероциклы, образующиеся в результате модификации остатков серина, треонина и цистеина. Циклизацию катализируют белки семейства YcaO [2]. У прокариот, гены, кодирующие пептид-предшественник и необходимые для модификаций ферменты, организованы в биосинтетические кластеры для эффективной регуляции их экспрессии, что облегчает обнаружение новых кластеров биосинтеза РПП методами биоинформатики.

В ходе биоинформатического поиска новых кластеров, содержащих гены YcaO-белков, в геномах грамм-положительных бактерий филума Bacillota была обнаружена группа кластеров, конечные продукты которых были названы лактазолицинами [3]. Найденные кластеры обладали набором свойств, отличавших их от других известных YcaO-кодирующих кластеров. Для них характерно наличие 8-12 повторов Sxxx в структуре пептида-предшественника (*ltzA*), наличие двух генов YcaO-белков (*ltzD1* и *ltzD2*) и двух генов белков-партнёров YcaO (*ltzC1* и *ltzC2*), а также гена неизвестной функции *ltzX* (Рис. 1А).

Для дальнейших исследований был выбран кластер из генома *Lactobacillus crispatus* UMB0824. При культивировании колонии этого штамма поверх газона с *Lactobacillus acidophilus* наблюдалась заметная зона ингибирования роста последнего. При гетерологической экспрессии в клетках *Escherichia coli* Rosetta (DE3) pLysS генов, входящих в *ltz*-кластер, последующей очистки пептида-предшественника из клеточных лизатов методом аффинной хроматографии и масс-спектрометрического анализа компонентов элюатов была обнаружена потеря 240 единиц массы после прохождения посттрансляционных модификаций (Рис. 1В). Более того, на спектре были зафиксированы 12 последовательных пиков через каждые 20 Да, что свидетельствует о том, что каждый из 12-ти цистеиновых остатков пептида участвует в формировании тиазолового цикла (Рис. 1В). Результаты дальнейших экспериментов по гетерологической экспрессии неполных наборов генов кластера показали, что все гены *ltz* необходимы для образования модифицированного продукта за исключением одного из YcaO (*ltzD1*) и одного из партнёров (*ltzC2*) (Рис. 1С и Д).

Поиск гомологов белка LtzX, необходимого для осуществления модификаций, не дал результатов. Кроме того, LtzX не имеет домена связывания пептида-предшественника, характерного для очень многих белков, кодируемых в подобных кластерах [4]. Тем не менее, в экспериментах по изучению взаимодействий пептида-предшественника LtzA и LtzX, было продемонстрировано, что LtzX способен связываться с LtzA. При проведении аналогичных экспериментов с укороченным предшественником, содержащим только лидерную часть, количество совыделяемого LtzX резко уменьшалось, что говорит о важности коровой части предшественника во взаимодействиях с LtzX. Мы предполагаем, что LtzX является белком, который, взаимодействуя с коровой частью пептида-предшественника, защищает реакционноспособные остатки цистеинов от преждевременных взаимодействий и побочных химических реакций, и потому необходим для правильного протекания процесса модификации. Дальнейшие структурные исследования необходимы для выяснения механизмов действия LtzX, а также роли белков LtzD2 и LtzC2 в созревании лактазолицина.

Работа над проектом проводилась при поддержке гранта РФФИ № 20-34-90098.

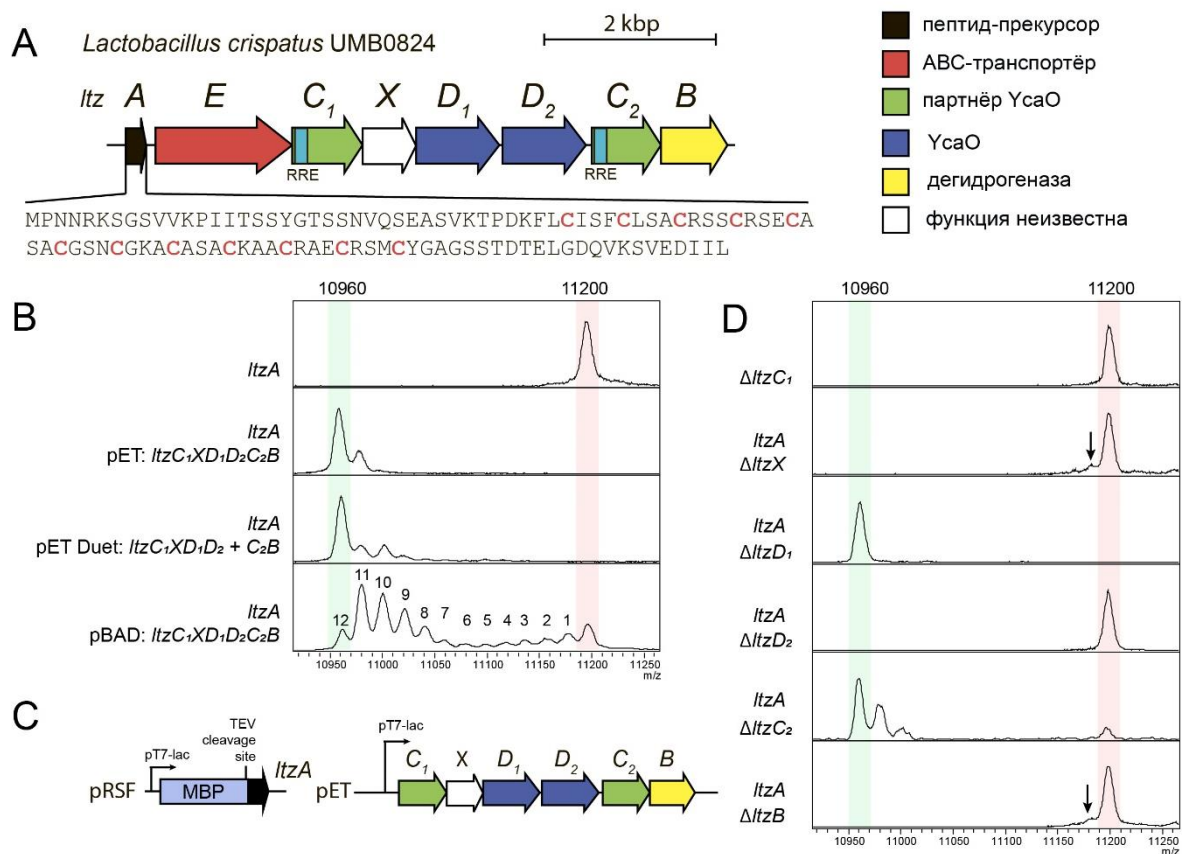


Рисунок 1. А. Устройство биосинтетического кластера лактазолицина из генома *Lactobacillus crispatus* UMB0824. Показана аминокислотная последовательность пептида-предшественника, остатки цистеина выделены красным цветом. Функции белков, закодированных генами кластера, показаны справа. В. Масс-спектры, показывающие модификацию пептида-предшественника при коэкспрессии гена *ltzA* и полного набора других генов кластера. С. Схемы плазмид, используемых для изучения модификации *LtzA* в гетерологической системе *E. coli*. D. Масс-спектры, демонстрирующие необходимость активности белков *LtzC1*, *LtzX*, *Ltz D2* и *LtzB* для внесения азоловых циклов в структуру *LtzA*.

[1] P. G. Arnison *et al.*, 'Ribosomally synthesized and post-translationally modified peptide natural products: overview and recommendations for a universal nomenclature', *Nat. Prod. Rep.*, vol. 30, no. 1, pp. 108–160, 2013.

[2] B. J. Burkhardt, C. J. Schwalen, G. Mann, J. H. Naismith, and D. A. Mitchell, 'YcaO-Dependent Posttranslational Amide Activation: Biosynthesis, Structure, and Function', *Chem. Rev.*, vol. 117, no. 8, pp. 5389–5456, 2017.

[3] D. Y. Travin, D. Bikmetov, and K. Severinov, 'Translation-Targeting RiPPs and Where to Find Them', *Front. Genet.*, vol. 11, p. 226, 2020, doi: 10.3389/fgene.2020.00226.

[4] B. J. Burkhardt, G. A. Hudson, K. L. Dunbar, and D. A. Mitchell, 'A prevalent peptide-binding domain guides ribosomal natural product biosynthesis', *Nat Chem Biol*, vol. 11, no. 8, pp. 564–570, Aug. 2015.

Изменение числа копий генов азотфиксации и фосфат-солюбилизации в ризосфере пшеницы под влиянием консорциумов почвенных бактерий

Парамоник А. П.^{1,2}, Седых С. Е.^{1,2}, Смирнова Н. В.³, Воронина Е. Н.^{1,2}

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

² Новосибирский государственный университет, г. Новосибирск

³ Институт почвоведения и агрохимии СО РАН, г. Новосибирск

Консорциумы почвенных бактерий, способствующих росту растений, считаются перспективной формой для создания биоудобрений. Благодаря тесному взаимодействию с ризосферой культурных растений, консорциумы бактерий могут обеспечивать сразу несколько полезных для растений биологических процессов: фиксацию атмосферного азота, солюбилизацию неорганических и органических фосфатов, синтез сидерофоров, гетероауксина и других органических соединений. Сочетание нескольких активностей в одном микробном консорциуме продуктивно влияет на рост и развитие растений.

В ИХБФМ СО РАН были выделены и охарактеризованы несколько десятков штаммов почвенных бактерий, обладающих полезными для растений свойствами. Отобраны двадцать комбинаций штаммов, которые не проявляли друг к другу антагонистической активности. В состав каждого консорциума вошли бактерии, которые проявляют азотфиксирующую и фосфат-солюбилизирующую активность, а также продуценты сидерофоров.

В рамках научно-технологической проектной смены “Большие Вызовы” в ОЦ “Сириус” в июле 2022 проведен анализ влияния данных консорциумов на рост пшеницы яровой (*Triticum aestivum* L.). Проведен сравнительный анализ содержания числа копий генов NIF (нитрогеназа), ALPL (щелочная фосфатаза) и BPP (бета-пропеллерная фитаза) в образцах ризосферы пшеницы, семена которой были инокулированы консорциумами перед посадкой. В качестве контрольного образца выбран участок почвы, в который не вносили консорциумы.

Лучшие результаты показал консорциум, в состав которого входили бактерии родов *Bacillus*, *Enterobacter* и *Pseudomonas*. Средняя масса одного стебля пшеницы на 30–40 день была на 17,4 % выше, чем в контрольной группе. По данным ПЦР в реальном времени, в ризосфере пшеницы, семена которой были обработаны данным консорциумом перед посадкой, число копий гена NIF выросло в 424 раза по сравнению с контрольной группой, гена ALPL в 74 раза, а содержание гена BPP осталось примерно на таком же уровне. Выявлена корреляция средней массы одного стебля пшеницы и числа копий гена NIF в ризосфере. В качестве референсного гена использовали RECA.

Таким образом, показано, что бактериальные консорциумы, содержащие штаммы, стимулирующие рост растений, успешно прижились в ризосфере пшеницы. Об этом свидетельствует увеличение числа копий генов, отвечающих за азотфиксацию и фосфат-солюбилизацию. Изученные консорциумы оказывают положительное влияние на рост пшеницы яровой. Используемые в данной работе консорциумы являются перспективными для создания биологических удобрений. Дальнейшие исследования будут направлены на метагеномный анализ почвенных образцов, так как в настоящее время нет данных о влиянии полученных консорциумов на другие почвенные бактерии.

Работа выполнена в рамках проекта «Всероссийский атлас почвенных микроорганизмов» (075-15-2021-1085).

Разнообразие гомологов Cas1 в домене архей

Петрусенко Юнна Сергеевна¹, Васильева Александра Андреевна^{2,3}

¹ Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, Россия

² Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого, 195251 Санкт-Петербург, Россия

³ Институт молекулярной генетики РАН, 123182 Москва, Россия

Сравнительный анализ множества белков Cas, закодированных в геномах различных архей и бактерий, внёс большой вклад в формирование наших представлений об эволюции CRISPR-Cas-опосредованного иммунитета. Растущее год от года количество данных метагеномного секвенирования микроорганизмов, в особенности некультивируемых, позволяет лучше систематизировать знания о нетрадиционных функциях Cas белков, пусть и предсказанных биоинформатически на основе соответствующего геномного контекста [1]. На примере архей из группы Асгард, было показано, насколько сильно могут различаться гомологи Cas1 по своему окружению и функциям, раскрывая очередной пласт неизведанного в биологии архей [2]. На сегодняшний день становится ясно, что гены *cas1* могут быть обнаружены в составе каспазона [3] или CRISPR-Cas системы, или находиться в геноме без видимого вовлечения в другие функциональные группы генов, являясь так называемым «Cas1-solo» [3], что предполагает участие Cas1 в широком спектре биологических процессов, в том числе еще неисследованных и специфичных для представителей домена архей.

В данной работе мы решили рассмотреть гомологи Cas1 белков во всех группах архей, ориентируясь на базу данных геномов архей NCBI, содержащую информацию как о полных геномах, так и контигах из различных метагеномов. Используя в качестве затравки множественное выравнивание muscle известных Cas1 белков и соответствующий HMM-профиль, мы производили поиск tblastn с варьируемым пороговым значением *e*, для обнаружения сходства последовательностей также применялся HMMER, аналогичным образом предсказывались другие Cas белки. В области 20 тыс. нуклеотидов от участка, идентифицированного как искомым Cas1-подобный белок, вытаскивались все открытые рамки считывания для дальнейшего анализа окружения. Предсказания CRISPR-кассет осуществлялись с помощью CRISPRCasFinder, транспозонов – RepeatMasker.

Отобранные последовательности ДНК архей по результатам поиска Cas1 были систематизированы по принадлежности к различным таксонам и поделены на функциональные группы внутри каждого класса в зависимости от наличия в окружении локусов CRISPR, характерных для транспозонов терминальных повторов и различных генов. В итоге, был проведен анализ наиболее полного на данный момент набора доступных геномов и участков геномов архей на предмет присутствия в них гомологов Cas1 белка. Полученные результаты количественно отражают превалирование тех или иных функциональных классов Cas1 в определенных систематических группах архей и могут быть использованы в качестве отправной точки для дальнейшего углубленного изучения эволюции Cas1 и CRISPR-Cas систем в определенных группах архей. В частности, это поможет разобраться с филогенетикой Cas1-Solo и его потенциальными функциями.

[1] E. V. Koonin, K. S. Makarova, and Y. I. Wolf, 'Evolution of microbial genomics: conceptual shifts over a quarter century', *Trends Microbiol.*, vol. 29, no. 7, pp. 582–592, Jul. 2021, doi: 10.1016/j.tim.2021.01.005.

[2] K. S. Makarova, Y. I. Wolf, S. A. Shmakov, Y. Liu, M. Li, and E. V. Koonin, 'Unprecedented Diversity of Unique CRISPR-Cas-Related Systems and Cas1 Homologs in Asgard Archaea', *CRISPR J.*, vol. 3, no. 3, pp. 156–163, Jun. 2020, doi: 10.1089/crispr.2020.0012.

[3] M. Krupovic, K. S. Makarova, P. Forterre, D. Prangishvili, and E. V. Koonin, 'Casposons: a new superfamily of self-synthesizing DNA transposons at the origin of prokaryotic CRISPR-Cas immunity', *BMC Biol.*, vol. 12, p. 36, May 2014, doi: 10.1186/1741-7007-12-36.

Изучение распространенности и эволюции систем рестрикции-модификации семейств RE_AlwI / N6_N4_Mtase x2 (R-2M) и RE_AlwI / N6_N4_Mtase (R-M)

Попова Анастасия Ивановна^{1,2}

¹ НИИ физико-химической биологии имени А. Н. Белозёрского МГУ

² Московский политехнический университет

Системы рестрикции-модификации (Р-М) включают два фермента, эндонуклеазу рестрикции (ЭР) и ДНК метилтрансферазу (МТазу). Они играют важную роль в молекулярной генетике и геномной инженерии. Благодаря широкому применению ферментов рестрикции-модификации было сделано множество открытий и создано множество генетически-модифицированных организмов [1]. Вместе с тем, эти ферменты и гены, кодирующие их, являются самостоятельными объектами научных исследований.

В данной работе изучалась распространенность и эволюция систем Р-М семейств RE_AlwI / N6_N4_Mtase x2 (R-2M) и RE_AlwI / N6_N4_Mtase с одним и тем же каталитическим доменом RE_AlwI и двумя или одной МТазой с каталитическим доменом N6_N4_Mtase согласно базе данных Pfam.

Материалом исследования были системы Р-М взятые нами из базы данных REBASE семейства RE_AlwI / N6_N4_Mtase x2 (27 систем Р-М) и RE_AlwI / N6_N4_Mtase (6 систем Р-М). Мы определяли семейство системы Р-М по каталитическому домену ЭР и МТазы. Изучаемые системы Р-М принадлежат следующим родам бактерий: *Bacillus*, *Anaerobacillus*, *Pasteurella*, *Caldicellulosiruptor*, *Kosmotoga*, *Thermoanaerobacter*, Unidentified, *Chryseobacterium*, *Methanohalobium*, *Polaribacter*, *Rhodoluna*, всего 35-ти видам микроорганизмов. Интересующие нас белковые последовательности метилаз и эндонуклеаз рестрикции, взятые из базы данных, были составлены файлы в формате fasta таким образом, что каждый тип фермента записывался в отдельный файл. Последовательности выровнены в программе Jalview, в ней же сделана разметка доменов. Далее, для описания эволюции систем Р-М нами были построены филогенетические деревья всех тридцати трёх эндонуклеаз рестрикции и шестидесяти метилтрансфераз (Рис. 1) в программе MEGA11. В результате исследования обнаружено, что на дереве МТаз метилазы из семейства RE_AlwI / N6_N4_Mtase образуют отдельную кладу. МТазы из семейства RE_AlwI / N6_N4_Mtase x2 образуют на дереве две клады, А и В. Метилазы распределялись таким образом, что в каждой системе Р-М одна метилаза принадлежит А кладе, другая - В кладе. При этом сравнение клад А и В с помощью танглемграммы показывает, что они, почти совпадают. Из этого следует, что в системах с двумя МТазами они эволюционируют независимо, не перемешиваются. Различие исходит из систем рестрикции-модификации общего предка.

Из этого следует, что все известные сайты узнавания в Р-М системах с двумя МТазами не являются палиндромами. Поэтому функции двух МТазы из системы не идентичны, что объясняет полученные результаты.

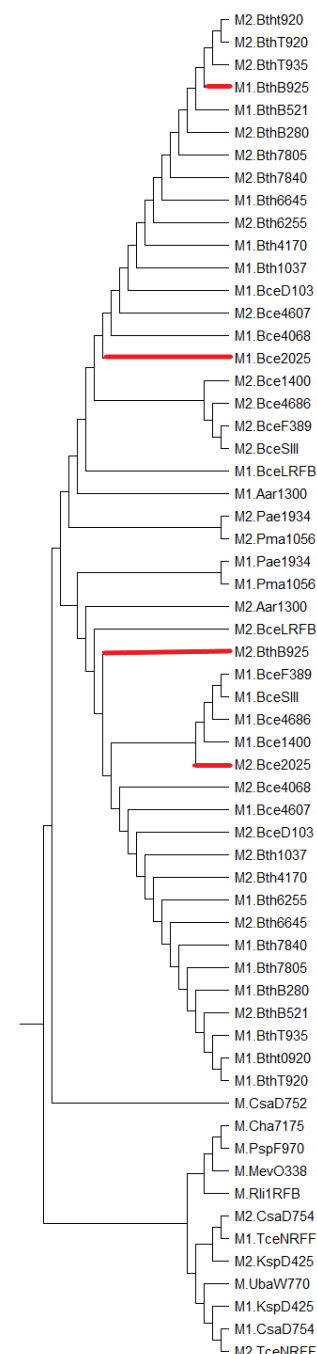


Рисунок 1. – Дерево МТаз

[1] Bruce Alberts, "Molecular biology of the cell.," pp. 939–941, Nov. 2013.

Особенности системы защиты CRISPR-Cas типа III во время инфекции бактериофагом P23-45 резистентного штамма *Thermus thermophilus* HB8

Самольго Алексей^{1,2}, Голдобина Екатерина¹, Колесник Матвей¹, Карнеева Карина¹, Северинов Константин²

¹ Сколковский институт науки и технологий, Москва, Россия

² Институт молекулярной генетики НИЦ «Курчатовский институт», Москва, Россия

Адаптивные защитные CRISPR-Cas системы прокариот особенно распространены в археях. Типичная система состоит из CRISPR кассеты, состоящей из чередующихся повторов и уникальных участков – спейсеров, – и Cas белков эффекторного комплекса, включая белки блока адаптации. Механизм действия CRISPR-Cas систем включает адаптацию и интерференцию. CRISPR-Cas системы классифицируются в два класса и несколько типов. Самыми изученными на данный момент являются тип 1 и тип 2. Тип 2 характеризуется белком Cas9, нашедшим множественные применения в разных областях молекулярной биологии и биотехнологий.

Типы CRISPR-Cas систем отличаются по характерному сигнатурному белку эффекторного комплекса и различаются по биохимическим активностям [1]. Среди типов CRISPR-Cas систем особо выделяется тип 3, который обладает специфической РНКазной, оцДНКазной, а также неспецифическими РНКазной и никазной активностями, активирующимися *in trans* вторичными мессенджерами – циклическими олигоаденилатами – чья активность обеспечивается вспомогательными нуклеазами [2]. Комбинация активностей позволяет тонко настраивать защитный ответ CRISPR-Cas системы. Интересным примером является белок Csx1-Crn2 – обладающей РНКазной активностью, которая активируется циклическим олигоаденилатом ца4, взаимодействующим с CARF доменом, а также доменом кольцевых нуклеаз Crn2, которые быстро деградируют ца4, тем самым выключая РНКазную активность. Такое особое взаимодействие между активностями позволяет смотреть на ответ CRISPR-Cas системы типа 3 как на баланс биохимических активностей [3].

CRISPR-Cas система типа III термофильной бактерии *Thermus thermophilus* HB27c таргетирует, как предполагается, транскрипты матричных РНК и позволяет клеткам, зараженным бактериофагом, пережить инфекцию, тем самым исключая механизм альтруистического суицида [4]. Неизвестно, работают ли все CRISPR-Cas системы типа 3 похожим образом, учитывая, что комбинации разных активностей могут приводить к достаточно разным ответа, по крайней мере, гипотетически. Другой штамм бактерии *Thermus thermophilus* HB8, трансформированный плазмидой, содержащей небольшую искусственную CRISPR кассету, чей спейсер направлен против транскриптов определенных генов бактериофага P23-45, обладает устойчивостью к вирусу – количество бляшек на газоне из резистентных клеток на несколько порядков меньше, чем у контрольного штамма. Механизм действия такой устойчивости неизвестен. Результаты показывают, что зараженные клетки в большей части умирают, хотя в живых остается больше резистентных клеток нежели контрольных. Зараженные клетки также подвергаются лизису. Данные РНК секвенирования не показывают ожидаемой направленной деградации фаговых транскриптов – только некоторую дерегуляцию поздних фаговых генов, что, по-видимому, и приводит к лизису клеток. Важным результатом, определяющим резистентность клеток и успешность работы CRISPR-Cas системы, является нарушение продукции фаговых частиц – их количество снижено в приблизительно сотню раз - со ста фаговых частиц до одной. Какое-то количество фаговых частиц образуется в течение инфекции – это показывает равное количество фаговых частиц в культуре до окончания первого цикла инфекции в контрольной культуре.

[1] K. S. Makarova *et al.*, “Evolutionary classification of CRISPR–Cas systems: a burst of class 2 and derived variants,” *Nat. Rev. Microbiol.*, vol. 18, no. 2, pp. 67–83, 2020, doi:10.1038/s41579-019-0299-x.

[2] M. Kazlauskienė, G. Kostiuik, Č. Venclovas, G. Tamulaitis, and V. Siksnys, “A cyclic oligonucleotide signaling pathway in type III CRISPR-Cas systems,” *Science* (80-.), vol.357, no. 6351, pp. 605–609, Aug. 2017, doi: 10.1126/science.aao0100.

[3] A. Samolygo, J. S. Athukoralage, S. Graham, and M. F. White, “Fuse to defuse: A self-limiting ribonuclease-ring nuclease fusion for type III CRISPR defence,” *Nucleic Acids Res.*, vol. 48, no. 11, pp. 6149–6156, 2020, doi: 10.1093/NAR/GKAA298.

[4] D. Artamonova *et al.*, “Spacer acquisition by Type III CRISPR–Cas system during bacteriophage infection of *Thermus thermophilus*,” *Nucleic Acids Res.*, vol. 48, no. 17, pp. 9787–9803, 2020, doi: 10.1093/nar/gkaa685.

Классификация прокариотических ДНК-метилтрансфераз на основании сходства последовательностей

Самохина Мария Евгеньевна^{1,2}, Русинов Иван Сергеевич¹, Карягина Анна Станислововна^{1,3,4}, Спиринов Сергей Александрович¹, Алексеевский Андрей Владимирович¹

¹ НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Москва

² Факультет биоинженерии и биоинформатики, Московский Государственный Университет им. М.В. Ломоносова, Москва

³ Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи Минздрава России, Москва

⁴ Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии, Москва

Прокариотические ДНК-метилтрансферазы (МТазы), входящие в состав систем рестрикции-модификации (РМ) ДНК, классифицируются по типу метилирования (m5C, m6N, m4C) [1]. В базе данных REBASE (<http://rebase.neb.com>) МТазы классифицируются по типам системы РМ (типы I, II, III и их подтипы). В работе [2] МТазы из систем РМ были классифицированы по расположению консервативных мотивов и ДНК-узнающих доменов в аминокислотных последовательностях. Однако классификация, основанная на сходстве последовательностей МТаз, до сих пор отсутствует. Такая классификация может быть полезна для обнаружения и аннотации генов МТаз в недавно секвенированных геномах и метагеномах. Целью данной работы является классификация всех известных прокариотических ДНК-МТаз по сходству последовательностей их каталитических доменов. Последовательности прокариотических ДНК-МТаз были отобраны из REBASE. Из баз данных SUPFAM (<https://supfam.org/SUPERFAMILY/>) и Pfam (http://ftp.ebi.ac.uk/pub/databases/Pfam/current_release/) были отобраны HMM-профили, находки которых покрывают каталитические и SAM-связывающие субдомены каталитических доменов МТаз. В этих профилях были размечены участки, соответствующие каталитическому и SAM-связывающему субдомену, а также консервативным мотивам МТаз. В результате все отобранные МТазы были разделены на 10 классов на основании сходства и расположения субдоменов каталитического домена. Первые четыре класса описываются профилями как из SUPFAM, так и из Pfam. Для SAM-связывающего и каталитического субдоменов каждого из классов введены обозначения a, b, c, d, в результате каталитические домены соответствующих МТаз описываются как SaCa, CbSb, ScCc, SdCd (см. рисунок 1A). Следующие три класса выделены на основании профилей Pfam, которые не покрываются профилями из SUPFAM, их каталитические домены обозначены аналогично: CbSg, SeCe, SfCf (см. рисунок 1B). Также было выделено три класса МТаз, в которых SAM-связывающий субдомен описывается частью одного из отобранных профилей из SUPFAM, а каталитический субдомен — частью другого профиля из SUPFAM. Каталитические домены этих классов получили обозначения SbCb, SdCb, SaCb (на рисунке не представлены). Выделенные классы покрывают 98% МТаз из REBASE.

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда, грант № 21-14-00135.

[1] G. G. Wilson, and N. E. Murray, “Restriction and modification systems,.” *Annu. Rev. Genet.*, vol. 25, pp. 585–627, 1991, doi: 10.1146/annurev.ge.25.120191.003101.

[2] J. M. Bujnicki, “Sequence permutations in the molecular evolution of DNA methyltransferases,.” *BMC Evol. Biol.*, vol. 2, p. 3, Mar. 2002, doi: 10.1186/1471-2148-2-3

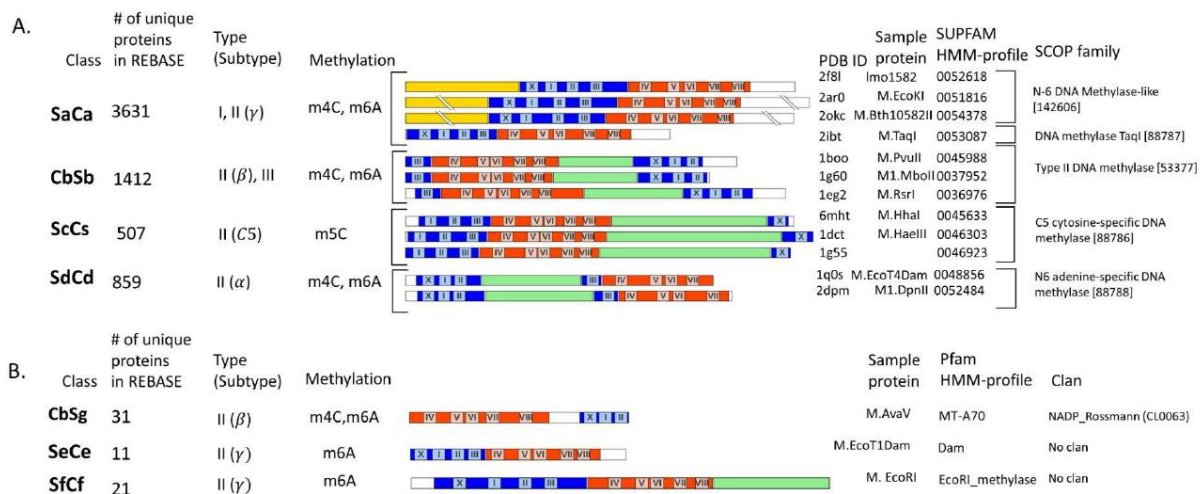


Рисунок 1. Характеристика профилей для классификации МТаз. **А.** Четыре класса МТаз, построенные по HMM-профилям из SUPFAM. **В.** Три класса МТаз, построенные по HMM-профилям из Pfam. Профилям соответствуют прямоугольники с серыми границами. Синим обозначены SAM-связывающие субдомены, красным — каталитические субдомены, зеленым — ДНК-узнающие субдомены. Римскими цифрами обозначены консервативные мотивы МТаз [2]. Class — обозначение классов МТаз согласно нашей классификации, Type (Subtype) — тип (подтип) системы РМ согласно REBASE, Methylation — тип метилирования, PDB ID — идентификатор структуры, по которой построен профиль SUPFAM, Sample protein — название по REBASE одного из белков с находкой профиля, SUPFAM или Pfam HMM-profile — идентификатор профиля, SCOP family — идентификатор семейства по SCOP, Clan — клан профиля по Pfam.

Исследование ассоциации углеводородокисляющих бактерий, выделенных из нефтепродуктов, хранящихся на Беломорской биологической станции имени Н.А. Перцова, методами молекулярной биологии

Сафьянникова Ульяна Ильинична¹, Алескерова Лейла Эльшадовна¹

¹ Биологический факультет, Московский Государственный Университет им. М.В. Ломоносова, Москва

Во время добычи, хранения и транспортировки нефти происходят аварийные ситуации с разливами нефти и нефтепродуктов, только в России несколько миллионов тонн нефти попадают в окружающую среду ежегодно [1]. Разработка новых методов борьбы с последствиями нефтяных разливов стоит довольно остро и перспективным направлением является создание препаратов с использованием углеводородокисляющих микроорганизмов.

В 2018 году из нефтепродуктов, хранящихся на Беломорской биологической станции была выделена ассоциация углеводородокисляющих бактерий. При культивировании на среде Эванса были получены три чистые культуры, изученные микробиологическими и молекулярно биологическими методами [2]. Проведена молекулярная идентификация по гену 16S рРНК, в результате которой установлена филогенетическая принадлежность культивируемых изолятов: *Herminiimonas* sp., *Pseudomonas* sp. и *Microbacterium* sp. Исследован полный состав природной ассоциации углеводородокисляющих бактерий методом метабаркодинга на основании гипервариабельного V4 участка гена 16S рРНК, по результатам которого идентифицированы некультивируемые штаммы: *Variovorax* sp., *Flavobacterium* sp., *Brevundimonas* sp. [3]. Все штаммы, входящие в состав ассоциации описаны в литературных источниках как углеводородокисляющие, для *Herminiimonas* sp. это первый случай выделения из топлива [4].

Исследуемая ассоциация была иммобилизована на носителе из нетканого полимерного материала (сополимер акрилонитрила и метилметакрилата с 25% содержанием свекольного жома) для моделирования создания биопрепарата для ремедиации нефтяных загрязнений. Методом Real-Time ПЦР исследован уровень экспрессии гена *AlkB* (кодирующего алканмонооксигеназу *AlkB*, ответственную за окисление углеводородов с определенной длиной цепи) в свободно культивируемых клетках и иммобилизованных на носителе в течение недели [5]. Показано, что уровень экспрессии *AlkB* значительно выше в иммобилизованных клетках.

[1] S. E. Chang, J. Stone, K. Demes, и M. Piscitelli, «Consequences of oil spills: a review and framework for informing planning», *Ecol. Soc.*, т. 19, вып. 2, с. art26, 2014, doi: 10.5751/ES-06406-190226.

[2] D. W. Tempest, «Chapter XII The Continuous Cultivation of Micro-organisms», в *Methods in Microbiology*, т. 2, Elsevier, 1970, сс. 259–276. doi: 10.1016/S0580-9517(08)70226-5

[3] O. Zemb *u др.*, «Absolute quantitation of microbes using 16S rRNA gene metabarcoding: A rapid normalization of relative abundances by quantitative PCR targeting a 16S rRNA gene spike-in standard», *MicrobiologyOpen*, т. 9, вып. 3, мар. 2020, doi: 10.1002/mbo3.977.

[4] X. Xu *u др.*, «Petroleum Hydrocarbon-Degrading Bacteria for the Remediation of Oil Pollution Under Aerobic Conditions: A Perspective Analysis», *Front. Microbiol.*, т. 9, с. 2885, дек. 2018, doi: 10.3389/fmicb.2018.02885.

[5] A. Pérez-de-Mora, S. Schulz, и M. Schloter, «MPN- and Real-Time-Based PCR Methods for the Quantification of Alkane Monooxygenase Homologous Genes (*alkB*) in Environmental Samples», в *Bioremediation*, т. 599, S. P. Cummings, Ред. Totowa, NJ: Humana Press, 2010, сс. 59–68. doi: 10.1007/978-1-60761-439-5

Анти-рестрикционный белок DarA бактериофага P1 ингибирует защиту BREX *in trans*.

Скутель Михаил¹, Северинов Константин², Исаев Артём¹

¹ Сколковский институт науки и технологий, Москва

² Институт микробиологии Ваксмана, Нью Джерси

P1 является умеренным бактериофагом, обладающим специфичностью к большому спектру бактериальных хозяев. Важным прикладным значением этого объекта является его широкое применение в качестве инструмента для генерализованной трансдукции. Это возможно ввиду того, что любая ДНК может быть упакована в капсид P1 и считается защищенной от деградации системами рестрикции-модификации (P-M) типа I, благодаря активности анти-рестрикционной системы Dar (defence against restriction) [1]. Считается, что система Dar действует только *in cis* и не способна защитить ко-инфицирующие фаги. Мы обнаружили, что P1 также способен заражать бактерий, несущих защитную систему BREX, и показали, что именно система Dar способствует ингибированию BREX *in trans*, то есть в условиях экспрессии компонентов с плазмиды. Ранее предполагалось, что Dar представляет собой многокомпонентную систему [2], однако экспрессия одного белка DarA оказалась достаточной для ингибирования BREX. Белок DarA не имеет предсказанных каталитических мотивов, но имеет центральный coiled coil домен, разделяющий два домена с неизвестной функцией, один из которых не нужен для анти-BREX активности. Система BREX напоминает системы P-M в том смысле, что она использует метилирование для различения собственной и чужеродной ДНК [3], мы показываем, что экспрессия DarA не препятствует метилированию BREX. Чтобы определить мишень ингибирования DarA, мы провели *in vivo pull-down* эксперименты со Strep-меченым DarA и обнаружили, что он очищается совместно с одним из белков системы BREX — VrxC. VrxC имеет предсказанный АТФ-азный домен и является одним из основных компонентов, необходимых как для защиты BREX, так и для метилирования, хотя точная роль этого белка не определена. Мы предполагаем, что анти-BREX-активность фага P1 связана со способностью DarA ингибировать VrxC, и дальнейшее изучение этого взаимодействия должно выяснить роль VrxC в ингибировании защиты BREX.

Исследование поддержано грантом РФФИ (Ko_A_21-54-10001), грантом РНФ (22-14-00004) и Министерством науки и высшего образования Российской Федерации (075-10-2021-114).

[1] S. Iida, M. B. Streiff, T. A. Bickle, and W. Arber, “Two DNA antirestriction systems of bacteriophage P1, darA, and darB: characterization of darA- phages,” *Virology*, vol. 157, no. 1, pp. 156–166, Mar. 1987, doi: 10.1016/0042-6822(87)90324-2.

[2] D. Piya, L. Vara, W. K. Russell, R. Young, and J. J. Gill, “The multicomponent antirestriction system of phage P1 is linked to capsid morphogenesis,” *Mol. Microbiol.*, vol. 105, no. 3, pp. 399–412, Aug. 2017, doi: 10.1111/mmi.13705.

[3] J. Gordeeva *et al.*, “BREX system of *Escherichia coli* distinguishes self from non-self by methylation of a specific DNA site,” *Nucleic Acids Res.*, vol. 47, no. 1, pp. 253–265, Jan. 2019, doi: 10.1093/nar/gky1125.

Влияние белка MutS из системы репарации «мисматчей» *Neisseria gonorrhoeae* на антигенную вариацию *pilE*

Стрекаловских Вадим Владимирович¹, Савицкая Виктория Юрьевна², Кубарева Елена Александровна³

¹ Факультет биоинженерии и биоинформатики, МГУ им. М. В. Ломоносова, Москва

² Химический факультет, МГУ им. М. В. Ломоносова, Москва

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

Вид *Neisseria gonorrhoeae*, известный как микроорганизм-возбудитель гонореи, использует различные способы для того, чтобы избежать иммунный ответ человека. Один из них – антигенная вариация пилина (PilE) – основного компонента пилей IV-го типа, которые являются важнейшим фактором вирулентности патогена. Антигенная вариация реализуется с помощью белков гомологичной рекомбинации, однако этот процесс связан с работой системы репарации «мисматчей» (MMR). У *N. gonorrhoeae* эта система включает в себя два основных белка, которые кодируются генами *mutS* и *mutL*. Показано, что нокауты этих генов оказывают положительное влияние на антигенную вариацию пилина [1]. Считается, что инактивация системы репарации «мисматчей» приводит к накоплению спонтанных мутаций и, таким образом, повышает видовую изменчивость бактерии. Кроме этого, для объяснения влияния MMR на вариабельность пилина предлагаются альтернативные механизмы: 1) связывание MutS с G-квадруплексом перед промотором PilE, который необходим для инициации гомологичной рекомбинации; 2) инактивация белками MMR рекомбиназы RecA [2]. В настоящий момент отсутствуют исследования, подтверждающие способность *N. gonorrhoeae* целенаправленно подавлять MMR для усиления эффекта антигенной вариации PilE. Тем не менее, сообщается об изоляте *N. meningitidis* – родственного для *N. gonorrhoeae*, который обладал высокой резистентностью к ряду антибиотиков и демонстрировал повышенную вариацию пилей IV-го типа, при этом белки MutS и MutL имели значительное количество мутаций по сравнению со штаммом дикого типа [3].

Наша работа предполагает выявление зависимости между целостностью гена белка MutS и изменчивостью *pilE* в клетках *N. gonorrhoeae* с помощью методов биоинформатики. Для анализа мы использовали более чем 15 тысяч изолятов из базы данных PubMLST. Анализ однонуклеотидных полиморфизмов *pilE* показывает, что этот ген более консервативен у штаммов с полноценным MutS, а повреждение или отсутствие этого белка приводит к выраженной вариабельности *pilE*. Более того, это явление мы наблюдали и у *N. meningitidis*. Таким образом, повреждение гена белка MutS в природных изолятах как *N. gonorrhoeae*, так и *N. meningitidis*, приводит к повышенной антигенной вариации пилина. Можно предположить, что мутации белков системы репарации «мисматчей» в клетках этих патогенов происходят не случайно, а для повышения изменчивости *pilE*. Вопрос о том, каким именно образом белки MMR регулируют антигенную вариацию PilE, остается открытым. Однако понимание механизма этой регуляции важно для разработки новых лекарственных препаратов и подходов к борьбе с инфекционными заболеваниями.

[1] Criss, A. K. et al., “Mismatch Correction Modulates Mutation Frequency and Pilus Phase and Antigenic Variation in *Neisseria gonorrhoeae*”, *J. Bacteriol.*, 192, 316–325, 2010, doi: 10.1128/jb.01228-09.

[2] В.Ю. Савицкая и др., “Бактерия *Neisseria gonorrhoeae*: системы репарации ДНК и их роль в патогенезе (обзор)”, *Биохимия*, Т. 87, № 9, стр. 1182-1202, 2022, doi: 10.31857/s0320972522090020.

[3] Richardson, A. R. et al., “Mismatch repair and the regulation of phase variation in *Neisseria meningitidis*”, *J. Mol. Microbiol.*, vol. 40, no. 3, pp. 645-55, May 2001, doi: 10.1046/j.1365-2958.2001.02408.x.

Триплетный состав генов 16S РНК бактерий связан с их таксономическим положением: кластеризация без выравнивания

Тетерлева А.А.¹, Абрамов В.Г.², Моргун А.В.³, Ларионова И.А.³, Садовский М.Г.^{2,3,4}

¹ ФГАОУ ВО «Сибирский федеральный университет», Сибирский федеральный университет, ИФБиТ

² ФГБУ Федеральный Сибирский научно-клинический центр ФМБА России, Красноярск

³ ФГБОУ ВО КрасГМУ им. проф. В.Ф.Войно-Ясенецкого Минздрава России

⁴ Институт вычислительного моделирования СО РАН, Красноярск

Изучалась связь между триплетным составом генов 16S РНК бактерий и таксономическим положением их носителей. Цель работы — обоснование эффективности метода выявления связи таксономии бактерий и структуры из генов 16S РНК на основе классификации без учителя по триплетным словарям. База генов 16S РНК формировалась по открытой базе данных SILVA; затем каждый ген был преобразован в частотный словарь триплетов, после чего изучалось распределение (кластеризация) этих словарей в пространстве частот методом упругих карт и исследовался состав выявленных кластеров.

В работе рассматривались следующие порядки бактерий: *Acidobacteriales*, *Acidimicrobiales*, *Bacteroidia*, *Chlamydiales*, *Bacillales*. Их выбор не отражает всего таксономического разнообразия секвенированных к настоящему времени последовательностей и является предварительным. Для повышения эффективности классификации и кластеризации в каждом из взятых в исследование порядков были исключены гены сверхпредставленных семейств, а также гены малопредставленных семейств.

Распределение генов изучалось методом упругих карт. Показано, что гены таксонов *Acidobacteriales*, *Acidomicrobiales*, *Alicyclobacillales*, *Bacilliales*, *Brevibacillales*, *Chlamydiales*, *Exiguobacterales*, *Lactobacillales*, *Mycoplasmatales*, *Paenibacillales*, *Solibacterales*, кроме семейств *Bacteroidales* и *Staphylococcaceae* образуют весьма устойчивые и чётко отделимые кластеры в пространстве частот триплетов. Такая кластеризация выявляет сильную связь структуры (частот триплетов в генах 16S РНК бактерий) с таксономическим положением их носителей. Полученные результаты кластеризации имеют эффект масштабирования: то есть метод выявляет кластерную структуру не только на уровне порядков, но и ниже — на уровне отдельных семейств.

Также представлен новый метод без выравнивания (метод Шайдурова или метод свёрток) для сравнения нуклеотидных последовательностей. Его эффективность показана при сравнении генов 16 S РНК из базы RDP и отсекаемых последовательностей того же гена из микробиоты кишечника человека.

Данный подход может быть использован для выявления связи структуры микробиома здоровых людей и пациентов, страдающих от рассеянного склероза, с целью построения системы ранних предикторов возникновения данной патологии.

Малая некодирующая 6S-1 РНК – регулятор биосинтеза биосурфактанта сурфактина в клетках *Bacillus subtilis*

Трефилов В.С.¹, Елкина Д.А.², Буренина О.Ю.³, Хартманн Р.К.⁴, Кубарева Е.А.², Зверева М.Э.²

¹ Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, химический факультет, Москва, Россия

² Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, НИИ ФХБ имени А.Н. Белозерского, Москва, Россия

³ Сколковский институт науки и технологий (Сколтех), Москва, Россия

⁴ Institut für Pharmazeutische Chemie, Philipps-Universität Marburg, Марбург, Германия

6S РНК – малая некодирующая РНК, присутствие которой предсказано в более чем 1600 различных бактериях. 6S РНК играет роль глобального регулятора транскрипции за счет своей консервативной вторичной структуры, напоминающей ДНК в открытом комплексе с РНК-полимеразой. Конкурируя с ДНК за связывание с ферментом, 6S РНК выступает в роли глобального регулятора транскрипции. В клетках *Bacillus subtilis* содержатся две 6S РНК: 6S-1 и 6S-2.

Целью нашей работы было исследование влияния нокаута гена 6S-1 РНК на биосинтез сурфактина клетками *B. subtilis*. Сурфактин – это липопептид, состоящий из гептапептидного циклического участка и остатка жирной кислоты (C₁₄-C₁₅). Благодаря очень высокому значению поверхностной активности, сурфактин может быть использован в косметической и пищевой промышленности, нефтепереработке, дизайне новых поколений антибиотиков и противораковых препаратов. Из-за сложности структуры химический синтез сурфактина практически невозможен. Разработка штаммов-суперпродуцентов сурфактина позволит повысить доступность сурфактина для различных сфер его применения.

В работе использовали клетки *B. subtilis* двух штаммов: NCIB 3610 и PY79. Штамм NCIB 3610 является полностью природным, был выделен из почвы. Штамм PY79 – лабораторный, был получен трансдукцией из штамма 168. Показано, что для штамма PY79 в отсутствие 6S-1 РНК наблюдается повышение уровня мРНК всех генов оперона *surfA*, кодирующего сурфактин-синтетазу, в поздней стационарной фазе роста. Для нокаутного по 6S-1 РНК штамма NCIB 3610 наблюдается повышение активности промотора оперона *surfA* в переходной фазе роста. Для оценки эффективности выделения клетками сурфактина методом кровяного агара (blood agar method) были определены зоны гемолитического эффекта клеточных колоний тех же штаммов *B. subtilis*. Показано, что клетки штамма NCIB 3610 с нокаутом гена 6S-1 РНК производят на 34% меньше сурфактина, чем клетки дикого типа. Для штамма PY79 различие имеет ту же тенденцию и составляет 17%, однако было получено, что в клетках этого штамма сурфактина синтезируется примерно в 10 раз меньше. Секвенирование генома обоих штаммов и биоинформатический анализ полученных данных выявил наличие в геноме штамма PY79 мутацию гена *sfp*, строго необходимого для биосинтеза сурфактина. Наличие мутации может являться причиной наблюдаемого нами эффекта заметного снижения эффективности производства сурфактина штаммом PY79 по сравнению со штаммом NCIB 3610, ген *sfp* в геноме которого интактен.

Таким образом, что несмотря на то, что делеция гена 6S-1 РНК в бактериях *B. subtilis* PY79 способствует повышению эффективности транскрипции оперона *surfA*, непосредственное производство сурфактина в бактериях *B. subtilis* PY79 и NCIB 3610 в отсутствие 6S-1 РНК понижается.

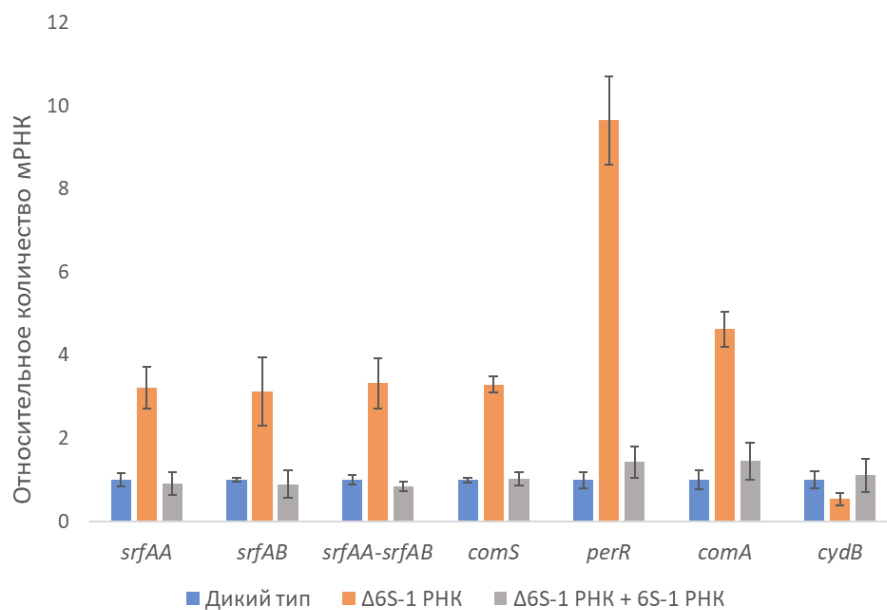


Рисунок 1. Влияние 6S-1 РНК на уровень транскрипции генов оперона *srfA* (первые 4 гена) и его активаторов (*perR* и *comA*) в стационарной фазе роста для клеток *Bacillus subtilis* штамма РУ79. Данные получены методом количественной ПЦР с обратной транскрипцией. Ген *cydB* не участвует в биосинтезе сурфактина и был использован как отрицательный контроль

Работа выполнена при поддержке гранта Министерства науки и высшего образования Российской Федерации № 075-15-2021-1396.

Эволюция систем рестрикции-модификации, содержащих одну эндонуклеазу рестрикции и две ДНК-метилтрансферазы

Фокина Анастасия Станиславовна¹, Карягина Анна Станиславовна^{2,3,4}, Спирин Сергей Александрович³, Алексеевский Андрей Владимирович³

¹ Факультет биоинженерии и биоинформатики, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Москва

² Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи Минздрава России, Москва

³ НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Москва

⁴ Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии, Москва

Системы рестрикции-модификации (Р-М) являются самыми распространенными системами бактериального иммунитета [1] и включают в себя эндонуклеазу рестрикции (ЭР), гидролизующую определенную неметилованную последовательность ДНК, и ДНК-метилтрансферазу (МТазу), метилирующую и предотвращающую гидролиз собственной ДНК.

Некоторые системы Р-М содержат две МТазы, что предположительно связано с непалиндромностью их сайтов метилирования [2]. Для изучения эволюции систем Р-М мы классифицируем их по семействам эволюционных доменов (согласно базе данных Pfam [3]), детектируемых в ЭР и МТазах. Наиболее широко представленным классом систем с двумя МТазами оказался класс HSDR_N/N6_Mtase x2, то есть с доменом семейства HSDR_N в составе ЭР и с доменами семейства N6_Mtase в составе обеих МТаз. Он включает 901 систему, описанную в БД REBASE [4]. Нами подробно рассмотрен класс систем Р-М, содержащих ЭР с доменом NOV_C и две МТазы с доменом DNA_Methylase, этот класс включает 43 системы. Филогенетическое дерево МТаз из систем этого класса состоит из двух клад одинакового размера с несколько различной топологией (**Рис. 1**), причём в каждую систему входят МТазы из разных клад. Это говорит о том, что последовательности двух МТаз этого класса после дубликации эволюционировали независимо. Горизонтальный перенос генов (ГПП) происходил внутри клад, а не между ними.

ГПП систем между видами, скорее всего, происходил неоднократно, судя по расположению ряда таксономических групп организмов в различных кладах на деревьях ЭР и МТаз. ГПП ферментов между системами предполагался, когда ферменты одной системы сближались на соответствующих филогенетических деревьях с ферментами разных систем. Предположительных случаев ГПП между системами было несколько, но все они, кроме переноса M1.Kne8426ORFDP, были сочтены ошибками реконструкции.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда, грант №21-14-00135.

[1] E. V. Koonin, K. S. Makarova, Y. I. Wolf, “Evolutionary Genomics of Defense Systems in Archaea and Bacteria.”, *Annu Rev Microbiol.*, vol. 71, pp. 233–261, Sep. 2017, doi:10.1146/annurev-micro-090816-093830.

[2] U. K. Madhusoodanan, D. N. Rao. “Diversity of DNA methyltransferases that recognize asymmetric target sequences.”, *Critical reviews in biochemistry and molecular biology*, vol. 45, 2, pp. 125–45, 2010, doi:10.3109/10409231003628007.

[3] Jaina Mistry, Sara Chuguransky, Lowri Williams, Matloob Qureshi, Gustavo A Salazar et al. “Pfam: The protein families database in 2021”, *Nucleic Acids Research*, Volume 49, Issue D1, pp. D412–D419, 8 January 2021, doi: 10.1093/nar/gkaa913.

[4] Roberts, R.J., Vincze, T., Posfai, J., Macelis, D. “REBASE - a database for DNA restriction and modification: enzymes, genes and genomes.” *Nucleic Acids Research*, Volume 43, pp D298-D299, 2015, doi: 10.1093/nar/gku1046.

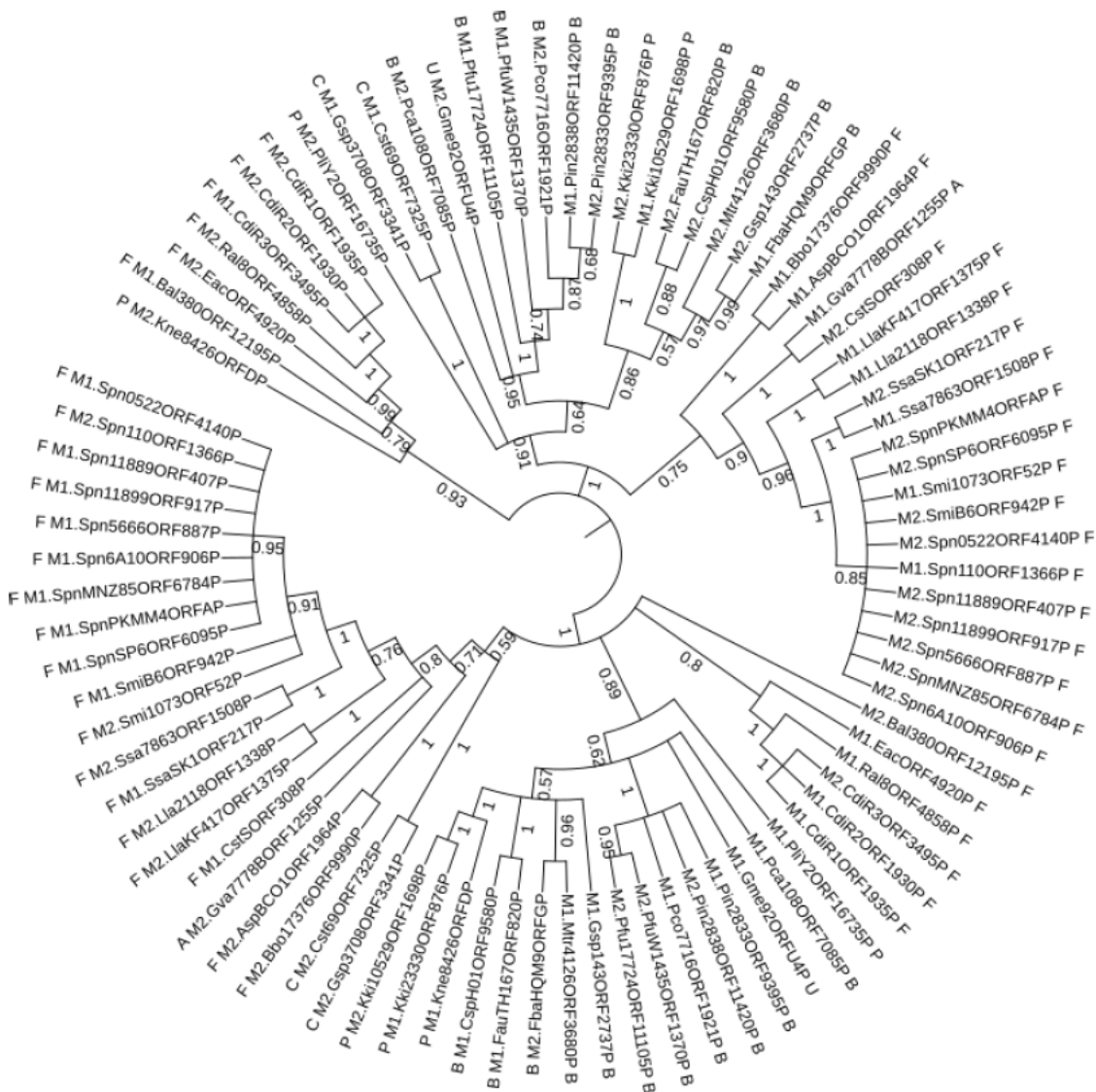


Рисунок 1. Филогенетическое дерево МТаз класса NOV_C/DNA_Methylase. Префиксы “M1” и “M2” соответствуют названиям МТаз в REBASE и не связаны с разделением на клады. Буквы после названий МТаз соответствуют отделам бактерий, которым принадлежат системы. Ветви, поддержанные менее чем половиной бутстреп-реплик, сжаты. Числа на ветвях обозначают доли бутстреп-реплик, поддерживающих данную ветвь.

Скрининг продуцентов тромболитических субстанций среди микромицетов-изолятов рода *Tolypocladium*, выделенных из грунтов Белого моря

Фокичев Николай Сергеевич¹, Попова Елизавета Андреевна¹, Кокаева Людмила Юрьевна¹,
Кураков Александр Васильевич¹, Осмоловский Александр Андреевич¹

¹ Биологический факультет, Московский Государственный Университет им. М.В. Ломоносова, Москва

Тромботерапия играет важную роль в купировании ассоциированных с тромбозами патологических состояний и лечении различных сердечно-сосудистых заболеваний, включающих нарушения кровотока, окклюзии сосудов, легочные эмболии, а также в преодолении осложнений COVID-19. Поиск новых и эффективных тромботерапевтических препаратов является важной и актуальной задачей современной медицины и биотехнологии. Одним из подходов в тромботерапии является использование экзопротеиназ микромицетов, эффективных против стабильных фибриновых сгустков. В настоящем исследовании проведен скрининг микромицетов-изолятов рода *Tolypocladium*, выделенных из грунтов Белого моря. Изоляты были идентифицированы по морфолого-культуральным признакам и по генетическим признакам с помощью ПЦР и дальнейшего секвенирования ITS-региона рДНК, фрагменты ДНК штаммов – изолятов, разделенные электрофорезом в 1,2% агарозном геле с добавлением бромистого этидия. Ампликоны, экстрагированные из геля с помощью набора CleanUp Mini компании «Евроген», были отсекуены, полученные последовательности нуклеотидов использовали для поиска соответствия в GenBank для видового определения с помощью программы BLASTn. В результате идентификации штаммов-изолятов до вида по последовательности 5,8S рРНК было установлено, что они соотносятся с некоторыми ранее описанными штаммами рода *Tolypocladium*, однако полного совпадения последовательностей ни в одном из случаев не было обнаружено. Шесть штаммов были отнесены к виду *Tolypocladium inflatum* – 13а, 30а, 49а, 62а, 126а, один штамм относился к виду *Tolypocladium cylindrosporum* – 150а. Помимо видовой идентификации штаммов было проведено выравнивание полученных последовательностей модулем программ Blastn, а также построено филогенетическое древо взаимосвязи полученных штаммов, согласно которому их можно условно разделить на 4 подгруппы в зависимости от филогенетической близости – в первую группу входят *T. cylindrosporum* 150а, во вторую – штамм *T. inflatum* 62а, в третью – штаммы *T. inflatum* 49а и 126а, в четвертую – три близкородственных штамма – *T. inflatum* 13а, 14а. и 30а. Впоследствии производили глубинное культивирование штаммов идентифицированных микромицетов в среде, содержащей (%): глюкозу – 3.0, глицерин – 7.0, гидролизат рыбной муки – 0.5, NaNO₃ – 0.2, KН₂PO₄ – 0.05, MgSO₄ – 0.05 для наработки культуральной жидкости, содержащей экзопротеиназы микромицетов. Тромболитический потенциал выделенных штаммов выявляли в эксперименте по определению плазминоподобной (на прогретых фибриновых пластинах) и активаторной (на непрогретых фибриновых пластинах) к плазминогену активности по методу Астуса-Мюллерц-Лассена, нанося на фибриновые пластины по 30 мкл фильтрата культуральной жидкости. Инкубацию фибриновых пластин проводили в течение 6 ч при 37°С. Активность выражали в условных единицах в 1 мл культуральной жидкости. Штаммы *T. inflatum* 13а, 30а и 62а продемонстрировали выраженную активаторную (57; 81; 120 усл. ед/мг белка) к плазминогену и плазминоподобную активность (41; 68; 93 усл.ед/мг белка), что характеризовало данные микромицеты, как потенциальные продуценты тромболитических субстанций для возможного использования в составе тромболитических терапевтических средств или диагностических наборов на патологии системы гемостаза.

Анализ полувстроенных интермедиатов наивной адаптации свидетельствует о наличии двух механизмов образования преспейсеров в системе CRISPR-Cas I-E

Хвостиков Тимофей^{1,2}, Федоров Иван¹, Выговский Даниил^{3,4}, Ширяева Анна¹, Константин Северинов¹

¹ Сколковский институт науки и технологий, Москва, Россия

² Российский химико-технологический университет имени Д.И. Менделеева

³ Группа синтетической биологии, Институт Пастера, Париж, Франция

⁴ Университет Сорбонна, Collège Doctoral, Париж, Франция

В ходе CRISPR-адаптации в системе CRISPR-Cas I-E *Escherichia coli* новые спейсеры встраиваются в CRISPR-кассету за счет ферментативной активности белкового комплекса Cas1-Cas2. Спейсеры имеют длину 33 п.о. и обеспечивают защиту от мобильных генетических элементов. Процесс формирования комплекса между фрагментами чужеродной ДНК (преспейсерами) и Cas1-Cas2 в ходе CRISPR-адаптации малоизучен. После образования такого комплекса Cas1 катализирует процесс поэтапного встраивания 3'-концов преспейсеров сперва в верхнюю цепь CRISPR-касеты, а затем – в нижнюю цепь [1]. При этом образуются полувстроенные интермедиаты, в которых 3'-концы преспейсеров уже интегрированы в CRISPR-кассету, а 5'-концы остаются свободными. Чтобы изучить процесс формирования и встраивания преспейсеров, мы ранее разработали FragSeq - метод, позволяющий анализировать последовательности преспейсеров, связанных с комплексом Cas1-Cas2 [2]. В представленной работе мы разработали подход для более чувствительного по сравнению с FragSeq анализа 5'-концов преспейсеров с помощью высокопроизводительного секвенирования полувстроенных интермедиатов.

Мы сравнили последовательности интермедиатов CRISPR-адаптации в штаммах *E. coli* дикого типа и с делециями генов 5'-3' экзонуклеаз RecJ и ExoVI. Результаты анализа показывают, что формирование преспейсеров идет по двум различным механизмам. Первый механизм зависит от RecJ/ExoVII и приводит к образованию преспейсеров длиной около ~33 п.н. Второй механизм не зависит от RecJ/ExoVII и приводит к образованию укороченных с 5'-концов интермедиатов (~28 п.н.). Мы предполагаем, что различная природа преспейсеров приводит к различиям в их процессинге и формированию полувстроенных интермедиатов разной длины. Первый способ осуществляется посредством отжига комплементарных одноцепочечных фрагментов комплексом Cas1-Cas2 и укорочения выступающих 5'-концов экзонуклеазами RecJ/ExoVII. Второй способ заключается в связывании комплексом Cas1-Cas2 двуцепочечных фрагментов с уже готовыми 5'-концами, не требующими дополнительного процессинга.

Исследование поддержано грантом РФФИ №19-74-20130.

- [1] J. K. Nuñez, L. Bai, L. B. Harrington, T. L. Hinder, and J. A. Doudna, "CRISPR Immunological Memory Requires a Host Factor for Specificity," *Mol. Cell*, vol. 62, no. 6, pp. 824–833, Jun. 2016, doi: 10.1016/j.molcel.2016.04.027.
- [2] A. A. Shiriaeva *et al.*, "Detection of spacer precursors formed in vivo during primed CRISPR adaptation," *Nat. Commun.*, vol. 10, no. 1, Dec. 2019, doi: 10.1038/s41467-019-12417-w.

Исследование структуры плазмидома кишечника пациентов COVID-19 с применением Hi-C метагеномики

Чистяков Александр Сергеевич^{1,2}, Ревель-Муроз Анастасия Жановна², Суевой Юрий Андреевич³, Васильев Петр Андреевич², Ульянов Сергей Владимирович², Тяхт Александр Викторович²

¹ Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова

² Институт биологии гена РАН

³ Клиника “МЕДСИ”

Введение: Микробиом кишечника как защищает человека от различных заболеваний, так и может становиться фактором риска, в том числе являясь резервуаром генов устойчивости к антибиотикам. Повышая свою лекарственную устойчивость, патогенные бактерии становятся более опасными для человека. В контексте существенного снижения иммунитета, инфекции такими микроорганизмами являются одной из основных причин летальности в отделениях реанимации. Анализ плазмидома микробиоты кишечника как важного канала горизонтальной передачи генов устойчивости представляет собой интерес для выработки перспективных схем профилактики и лечения микробных инфекций.

Цель: изучить с помощью Hi-C метагеномики плазмидом и резистом микробиома кишечника пациентов с тяжелой формой COVID-19.

Материалы и методы: Для работы был использованы образцы микробиоты кишечника пациентов с COVID-19, проходившего интенсивную терапию. Образец стула, взятый после 14-го дня ИВЛ от каждого пациента, был проанализирован с помощью Hi-C метагеномики – метода, совмещающего классическое WGS (shotgun) секвенирование с методом определения конформации хромосом (Hi-C) [1]. Для поиска плазмидных контигов и их сборки был разработан конвейер, совмещающий различные подходы к их аннотации.

Поиск и аннотация генов устойчивости к антибиотикам (генов AP) была выполнена в RGI (Resistance Gene Identifier) на основе базы данных CARD. Граф, отражающий связи между восстановленными из метагенома геномами (МАГами) и плазмидными контигами, был построен на основании силы Hi-C сигнала между ними.

Результаты: Таксономический состав микробиома пациентов разительно отличался от характерного для здоровой популяции, с преобладанием родов-оппортунистов (*Enterococcus*, *Klebsiella*, *Escherichia*, *Enterocloster*). В пересчете на число МАГов больше всего генов AP приходилось на образцы с преобладанием одного вида (*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*). Большая часть плазмидных контигов была связана не более чем с 1 МАГом. Также большая часть генов устойчивости плазмидных контигов была связана Hi-C связями с геномами *Escherichia* и *Klebsiella* (**Рис. 1А**).

Больше всего генов AP, найденных в плазмидных контигах, приходилось на устойчивость к бета-лактамазе (OXA, CTX, TEM), Qnr (резистентность к хинолонам) и sul (сульфонамидам) (**Рис. 1В**). Бета-лактамазные гены, а также Qnr и sul были описаны ранее как типичные плазмидные гены AP, свойственные многим Enterobacteriaceae [2].

Заключение: Мы обнаружили связи, указывающие на возможную передачу генов AP посредством плазмид между видами, что может пролить свет на изучение развития вторичной инфекции у пациентов в реанимации.

[1] V. Ivanova et al., “Hi-C Metagenomics in the ICU: Exploring Clinically Relevant Features of Gut Microbiome in Chronically Critically Ill Patients,” *Front. Microbiol.*, vol. 12, p. 770323, 2021, doi: 10.3389/fmicb.2021.770323.

[2] T. S. Darphorn, K. Bel, B. B. Koenders-van Sint Anneland, S. Brul, and B. H. Ter Kuile, “Antibiotic resistance plasmid composition and architecture in *Escherichia coli* isolates from meat,” *Sci. Rep.*, vol. 11, no. 1, p. 2136, Jan. 2021, doi: 10.1038/s41598-021-81683-w

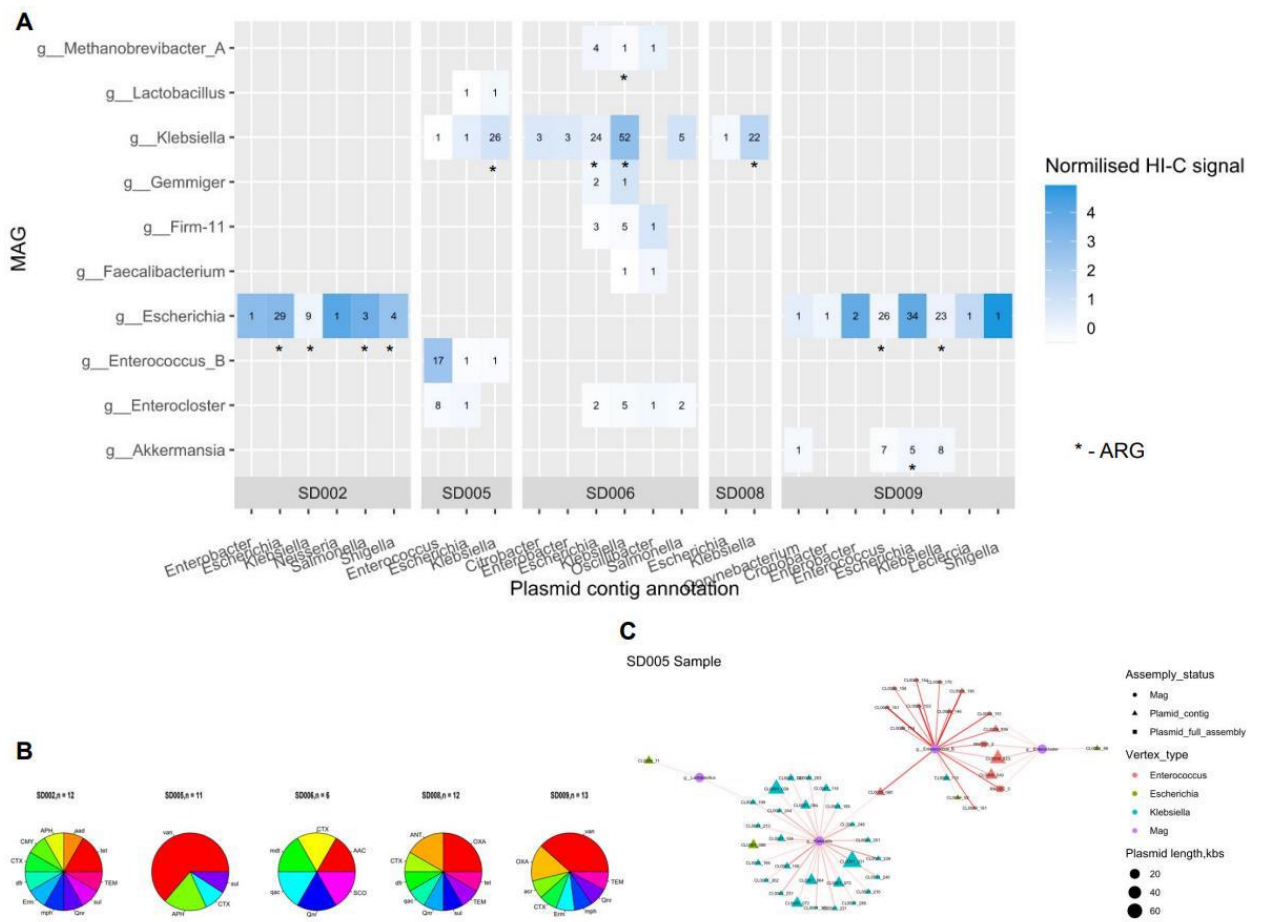


Рисунок 1. Плазмидные контиги, имеющие Hi-C контакты с МАГами, из них звездочками показаны рода, содержащие гены AP. Число Hi-C контактов приведено в логарифмической шкале (A). Резистом плазмид, взаимодействующих с МАГами (B). Граф плазмиды – МАГ образца SD005 (C).

Chi-сайт содержащие плазмиды активируют аллевиацию рестрикции EcoKI системы защиты

Яновская Д.Д.^{1,2}, Скутель М.А.², Исаев А.Б.²

¹ Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет)

² Сколковский институт науки и технологии

Мобильные элементы, такие как бактериофаги, плазмиды или транспозоны вносят огромный вклад в горизонтальный перенос генов и играют ключевую роль в эволюции прокариот. Однако, бактериальные системы рестрикции-модификации (Р-М) препятствуют проникновению чужеродной ДНК в клетку. Р-М ферментативные комплексы типа I состоят из двух субъединиц эндонуклеазы рестрикции (HsdR), необходимых для транслокации и расщепления ДНК, одной субъединицы узнавания сайтов (HsdS) и двух субъединиц метилтрансферазы (HsdM). В зависимости от статуса метилирования ДНК этот комплекс может функционировать либо как рестриктаза, либо как метилаза. Неметилированная ДНК является мишенью для рестрикции, полуметилированные молекулы являются мишенью для дальнейшего метилирования, а полностью метилированная ДНК невосприимчива к рестрикции. В редких случаях, неметилированная ДНК может возникать в бактериальной клетке, и чтобы избежать аутоиммунного ответа, т.е. атаки Р-М I комплексов на собственный геном, эти системы подвержены дополнительной регуляции – феномен известный как аллевиация рестрикции. В частности, HsdR субъединица EcoKI систем защиты является субстратом для ClpXP протеазы и возникновение в клетке комплексов транслоцирующих собственную ДНК приводит к расщеплению эндонуклеазы.

Чтобы обойти действие Р-М I систем защиты многие фаги и конъюгативные плазмиды приобрели анти-рестрикторные белки, такие как Ocr, ArdA, ArdB, способные напрямую ингибировать Р-М комплексы. Ранее также было показано, что некоторые неконоъюгативные транспозоны кодируют предполагаемый ген *ardD*, ответственный за ингибирование Р-М I защиты. Механизм действия *ardD* и сам факт наличия ArdD белка в клетке не был установлен, а сам ген был предсказан на антисмысловой цепи другого гена – *tniA*, хотя кроме мутаций, нарушающих предполагаемый *ardD* локус, другие мутации в транспозоне также приводили к снижению анти-рестрикторной активности.

Для проверки роли продукта гена *ardD* в антирестрикции были получены конструкции транспозона Tn5053 со внесенным внутрь гена *ardD* stop-кодоном и с делецией гена *ardD*. Показано, что ген *ardD* не вносит вклад в ингибирование систем рестрикции-модификации I типа. В попытке определить механизм анти-рестрикции транспозона Tn5053 и схожих с ним транспозонов мы обратили внимание на то что анти-рестрикция Tn5053 связана с феноменом ClpXP-зависимой аллевиации рестрикции. Мы предположили, что именно появление не-метилированных EcoKI сайтов в плазмиде запускает процесс расщепления HsdR субъединицы. Для проверки этой гипотезы мы удалили из Tn5053 EcoKI сайты, а также Chi сайты, отвечающие за RecBCD-зависимую рекомбинацию. В каждом из случаев, это привело к полной потере анти-рестрикции. Дополнительно, мы показали, что делеция RecA также полностью снимает анти-рестрикцию, а делеции RecBCD снижают данную активность.

По итогам работы мы можем предложить модель, согласно которой активная рекомбинация в плазмидах одновременно несущих Chi и EcoKI сайты приводит к появлению неметилированных EcoKI сайтов и запускает процесс аллевиации рестрикции, снижающий рестрикторную активность EcoKI систем. Именно этот механизм может объяснить антирестрикторные эффекты, ранее приписываемые *ardD* локусу неконоъюгативных транспозонов.

Работа поддержана грантом РФФИ (22-14-00004) а также грантом Министерства Науки и Образования Российской Федерации (075-10-2021-114).