

*На правах рукописи*

**Климина Ксения Михайловна**

**ГЕНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ СИСТЕМ ТОКСИН-АНТИТОКСИН  
СУПЕРСЕМЕЙСТВА *RelVE* У ЛАКТОБАЦИЛЛ**

Специальность 03.02.07 - генетика

**АВТОРЕФЕРАТ**  
диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Москва 2015

Работа выполнена в лаборатории генетики микроорганизмов Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова Российской академии наук.

**Научный руководитель:** доктор биологических наук, профессор  
**ДАНИЛЕНКО Валерий Николаевич**,  
Заведующий лабораторией генетики  
микроорганизмов ИОГен РАН

**Официальные оппоненты:** доктор биологических наук, профессор  
**ЛИВШИЦ Виталий Аркадьевич**  
Ведущий научный сотрудник  
НИИ Аджиномото-генетика (ЗАО «АГРИ»),  
г. Москва

доктор медицинских наук, профессор  
**СУВОРОВ Александр Николаевич**  
Заведующий отделом молекулярной  
микробиологии Федерального  
государственного бюджетного научного  
учреждения «Институт экспериментальной  
медицины», г. Санкт-Петербург

**Ведущая организация:** Федеральное государственное бюджетное  
учреждение науки Институт молекулярной  
биологии им. В.А. Энгельгардта Российской  
академии наук, г. Москва

Защита состоится «22» октября 2015 г. в 11 часов на заседании диссертационного совета Д.002.214.01 в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова Российской академии наук по адресу: 119991, Москва, ул. Губкина, 3.

С диссертацией и авторефератом можно ознакомиться в библиотеке и на сайте Института [www.vigg.ru](http://www.vigg.ru), тел. 8-499-135-14-31.

Автореферат разослан « \_\_\_ » \_\_\_\_\_ 2015 года.

Ученый секретарь диссертационного совета  
кандидат биологических наук

Т.А. Синельщикова

## **ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ**

### **Актуальность проблемы**

Микробиота кишечника трактуется в настоящее время как сателлитный орган, играющий ключевую роль в становлении и поддержании иммунитета и общего гомеостаза человека. Видовое и штаммовое разнообразие бактерий в микробиоте носит индивидуальный (возраст, образ жизни, состояние здоровья), этно-социальный (традиции питания) и региональный (популяции) характер. Важнейшей проблемой при изучении микробиоты человека является отсутствие эффективных генов-биомаркеров видовой и штаммовой идентификации бактериальных компонентов. Разработка таких маркеров и технологий для диагностики состава микробиоты человека является актуальным вопросом как научных, так и прикладных исследований общей и персонализированной медицины.

### **Цель работы**

Структурно-функциональная характеристика генов токсин-антитоксин (ТА) систем II типа суперсемейства RelBE у штаммов *Lactobacillus* для их дальнейшего использования в качестве биомаркеров для видовой и штаммовой идентификации лактобацилл.

### **Задачи исследования**

1. Создание и характеристика коллекции лактобацилл, выделенных из микробиоты здоровых людей центральных областей России.
2. Анализ *in silico* ТА систем суперсемейства RelBE в секвенированных геномах лактобацилл и изучение полиморфизма и функционирования в клетках *E. coli* ТА систем из штаммов лабораторной коллекции.
3. Изучение регуляции экспрессии ТА системы Yef-YoeB<sub>Lrh</sub> у штаммов *L.rhamnosus*.
4. Поиск и характеристика новых ТА систем у *L. helveticus*.
5. Использование ТА систем в качестве биомаркеров для изучения штаммового разнообразия лактобацилл.

### **Научная новизна работы**

Впервые исследовано наличие, разнообразие и полиморфизм ТА систем суперсемейства RelBE у лактобацилл, в частности у штаммов *L. rhamnosus*, *L.casei*, *L. helveticus*. Показана активность ряда ТА систем лактобацилл в клетках *E.coli*. Впервые показана сложная организация оперона ТА системы Yef-YoeB<sub>Lrh</sub> у *L. rhamnosus*, включающая 4 сайта инициации транскрипции. Впервые найдены и исследованы новые ТА системы в штаммах *L. helveticus*. Впервые показано, что ТА системы могут быть использованы в качестве биологических маркеров для характеристики штаммового разнообразия микробиоты человека.

### **Практическая значимость**

Создание метода универсальной, дешевой и быстрой молекулярно-генетической идентификации видов и штаммов лактобацилл, основанного на применении нового генетического маркера – генов TA систем II типа. Предложенный нами метод может быть использован как для характеристики отдельных штаммов, так и для характеристики сообщества микроорганизмов, например в микробиоте человека.

### **Личный вклад автора**

Автор принимала личное участие на всех этапах выполнения работы: в планировании и осуществлении экспериментов, оценке и интерпретации их результатов. В процессе исследования непосредственно автором осуществлялось выделение ДНК и РНК; конструирование праймеров, проведение ПЦР и электрофореза в агарозном геле; анализ нуклеотидных последовательностей (НП); клонирование генов TA систем и промоторных областей в экспрессионные векторы; проведение обратной транскрипции и количественной ПЦР-РВ. Работа по поиску промоторов и изучению их активности была выполнена в университете Фридриха-Шиллера в г. Йена, Германия, под руководством Сабины Брантл. Автор лично проводила статистическую обработку полученных результатов, оформляла результаты для представления в виде тезисов и докладов на научных конференциях, а также принимала участие в написании статей по результатам работы.

### **Апробация результатов работы**

Результаты проведенных исследований были представлены на международных и российских конференциях, в том числе: на 38-м конгрессе Федерации Европейских Биохимических Обществ (The 38th FEBS Congress, St. Petersburg, Russia 2013г.); на 5-ом конгрессе Европейских Микробиологов (The 5th Congress of European Microbiologists (FEMS) Leipzig, Germany 2013г.); на 5-ом международном конгрессе по микробиому человека (The 5th IHMC, Luxembourg, 2015г.); на V Международной конференции ФизтехБио по фармацевтике, биотехнологии и медицинскому приборостроению (г.Долгопрудный, 2015г.). Диссертация апробирована на межлабораторном семинаре отдела генетических основ биотехнологий ИОГен РАН 14 мая 2015г.

### **Публикации**

Автором опубликованы 14 печатных работ, в том числе 6 статей по теме диссертационной работы в журналах, входящих в перечень рецензируемых научных журналов и изданий, рекомендованных ВАК Минобрнауки; в материалах международных конференций опубликовано 7 тезисов; получен один патент на изобретение.

## **Структура и объем диссертации**

Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, результатов и обсуждения, а также заключения, выводов, списка цитируемой литературы и приложений. Работа изложена на **190** страницах машинописного текста, включает **27** таблиц, **36** рисунков, **5** приложений. Список цитируемых литературных источников включает **177** наименований.

## **СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ**

В разделе «Обзор литературы» изложены литературные данные о бактериях рода *Lactobacillus*; общей характеристике и классификации ТА систем; разнообразии ТА систем II типа; механизме действия и биомишенях токсинов ТА систем; функциях ТА систем; стратегии использования ТА систем.

## **МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ**

### **Штаммы и условия культивирования**

Штаммы бактерий рода *Lactobacillus* были выделены из фекалий, слюны и содержимого влагалища людей – жителей центральной области РФ – в медицинской академии г.Тверь. Штаммы *Esherichia coli*, используемые в данной работе: TG1, DH5 $\alpha$ , BL21. Штамм *Bacillus subtilis* DB104 использовался для получения в хромосоме конструкций с геном-репортером  $\beta$ -галактозидазы и клонированными промоторами. В экспериментах по клонированию фрагментов ДНК и экспрессии генов использовали векторы pET-32a, pACYCDuet-1 с IPTG-индуцируемым промотором. Для клонирования промоторов использовали плазмиду pMG16. Для культивирования лактобацилл использовалась среда MRS, *E. coli* и *B. subtilis* - среда Лурия – Бертани (LB).

### **Работа с ДНК**

Хромосомную ДНК выделяли из клеток лактобацилл с помощью набора DNeasy blood and tissue kit (Qiagen). Плазмидную ДНК из клеток *E. coli* выделяли с помощью набора GeneJET™. Plasmid Miniprep Kit (Thermo Scientific, США). Электрофорез ДНК проводили в геле 1-1,5% агарозы в трис-боратном буфере. Фрагменты ДНК элюировали из агарозы с помощью набора GeneJET™ (Thermo Scientific, США). Определение нуклеотидной последовательности фрагментов ДНК проводили в НИИ ФХМ (г. Москва).

### **Конструирование праймеров и проведение ПЦР**

Праймеры для обнаружения ТА систем сконструированы с помощью программы NCBI/Primer-BLAST и НП аннотированных штаммов *L. rhamnosus*, *L. helveticus* и *L. casei*. При необходимости к 5'-концам праймеров добавляли сайты узнавания эндонуклеаз рестрикции. ПЦР проводили со смесью

высокоточных ДНК-полимераз из набора Tersus PCR kit (Eurogen, Россия). При скрининге гибридных колоний использовали Taq-полимеразу и набор «PCR core kit» фирмы «Диалат ЛТД», Россия.

### **Клонирование ГА генов**

Рестриктицию и лигирование проводили с учетом рекомендаций фирм-изготовителей ферментов (Thermo Scientific, США; Promega). Полученной лигазной смесью кальциевым методом трансформировали штамм *E. coli* DH5 $\alpha$ .

### **Создание lacZ-транскрипционных конструкций (fusions) и определение функционирования промоторов по активности $\beta$ -галактозидазы в клетках *B. subtilis***

Предполагаемые промоторные области синтезировали в реакции ПЦР на матрице хромосомной ДНК штамма *L. rhamnosus* 24дст и клонировали в клетках *E. coli* TG1 последовательно на плаزمиды рЕТ32а и рMG16. Плазмиды с нужной вставкой линеализовали и переносили трансформацией в клетки *B. subtilis* DB104. Отбирали Amy<sup>S</sup>Sp<sup>R</sup> клоны со встроенными в хромосому плазмиды и определяли у них активность  $\beta$ -галактозидазы по формуле Миллера.

### **Определение активности ГА систем в клетках *E. coli***

Активность белков токсинов в клетках *E. coli* BL21 (DE3) определяли по характеру роста культур на твердой и в жидкой средах в присутствии индуктора IPTG (0,5 mM) и без него. В первом случае культуры клеток *E. coli*, содержащие гибридные плазмиды с клонированными генами токсинов, высевали или раскапывали в разведениях на чашки LB-агара с IPTG или без; рост культур фиксировали через 18 часов при 37°C. Во втором случае дневные культуры, выращенные до OD<sub>600</sub>=0,2, были разделены на две части. Одна часть продолжала расти при тех же условиях, а ко второй части добавляли IPTG. За ростом культур следили, измеряя OD<sub>600</sub>. Для определения активности антитоксинов совмещали в клетках *E. coli* BL21 (DE3) ген токсина, клонированный на плазмиде рACYCDuet-1, и соответствующий ему ген антитоксина на плазмиде рЕТ32а, далее определяли характер роста штамма в присутствии IPTG и без него.

### **Выделение РНК**

РНК получали из стационарных культур (18 часов) и культур логарифмической стадии роста (8 часов) набором RNeasy Mini Kit («Qiagen») в соответствии с протоколом фирмы-производителя. Концентрацию и качество РНК определяли на биоанализаторе Bioanalyzer 2100 («Agilent»). Для получения кДНК по матрице мРНК проводили реакцию обратной транскрипции с ферментом SuperScript<sub>III</sub> (Invitrogen, Life technologies, США).

### **Количественная ПЦР в режиме реального времени**

Для ПЦР-РВ использовали ДНК-полимеразу TaqF (Amplisens, Москва) и прибор Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System (Life Technologies, США). Полученные данные анализировали с использованием контрольных генов и относительного количественного  $\Delta\Delta C_t$ -метода. С учетом вариабельности контрольных генов значимыми считали изменения экспрессии в 2.0 и более раз.

### **Удлинение праймера (Primer extention)**

Матрицей служила ДНК штаммов *L. rhamnosus* 24дст, B51 и 50зв. Используя флюоресцентно меченный (IRD800) праймер, проводили синтез РНК; затем – синтез кДНК и гидролиз РНК 1М NaOH с последующей нейтрализацией 1М NEPEs. Референсный ПЦР-фрагмент был секвенирован по Сенгеру с помощью того же немеченного праймера.

### **Определение точки начала транскрипции при помощи специфической амплификации концевых фрагментов кДНК**

Опыт проводили по протоколу к набору FirstChoice® RLM-RACE Kit (Ambion, Life Technologies, США).

### **Биоинформатический анализ**

Поиск и сравнение систем ТА суперсемейства RelBE в секвенированных геномах лактобацилл (имеющих статус «complete») производили с помощью нуклеотидных/аминокислотных последовательностей генов/белков, доступных в GenBank, NCBI. Выравнивание и анализ данных производили при помощи: BLASTn, BLASTp и ClustalX версия 2.0. Алгоритм поиска систем ТА в геномах:  
1 вариант: поиск в секвенированных геномах систем ТА, гомологичных уже известным → проверка найденных генов/белков с помощью программы InterPro;  
2 вариант: предсказание открытых рамок считывания в исследуемых геномах (программа Genemarks) → предсказание генов, принадлежащих системам ТА → проверка найденных генов с помощью InterPro.

Если гомологичные последовательности и предсказанные гены перекрывались более чем на 80%, то данный ген считали возможным кандидатом на роль токсина/антитоксина.

Поиск новых систем ТА в геномах *L. helveticus* проводился при помощи разработанного алгоритма: он ищет в геноме два гена, расположенные на заданном расстоянии друг от друга (не более 70 нуклеотидов между генами, перекрывание – не более 30 нуклеотидов); размер первого гена меньше второго; весь оперон - не более 800 пар нуклеотидов.

На основе выровненных последовательностей генов ТА систем между собой было построено филогенетическое дерево с помощью программы MEGA 5.2, используя алгоритм «ближайших соседей».

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ

### Видовая идентификация штаммов лактобацилл

Первым этапом работы было формирование и характеристика коллекции штаммов лактобацилл. Совместно с Д.Х. Кясовой была проведена идентификация штаммов молекулярно-генетическим методом по НП гена 16S рибосомальной РНК.

Однозначно удалось идентифицировать родовую принадлежность всех штаммов, а также видовую принадлежность штаммов видов *L. rhamnosus*, *L. brevis*, *L. salivarius* и *L. mucosa*. Штаммы групп *L. helveticus* – *L. acidophilus*; *L. plantarum* – *L. paraplantarum* – *L. pentosus*; *L. casei* – *L. paracasei*, *L. johnsonii* – *L. gasseri* не могли быть однозначно разделены: НП исследуемого фрагмента 16S РНК у данных групп штаммов имели 99-100% идентичности.

Для разделения штаммов внутри группы *L. helveticus* – *L. acidophilus* мы использовали метод видовой идентификации лактобацилл, разработанный в лаборатории, по определению НП межгенного района, предшествующего оперону F0F1 АТФ-синтаз. Для разделения штаммов группы *L. plantarum* – *L. paraplantarum* – *L. pentosus* мы использовали ПЦР с праймерами, специфичными к *recA* гену. В двух случаях – для близкородственных штаммов групп *L. casei* – *L. paracasei* и *L. johnsonii* – *L. gasseri* точная видовая принадлежность штаммов не была установлена. Определенная нами видовая принадлежность штаммов не всегда соответствовала установленной ранее. Это имеет особенно важное значение для производственных штаммов (таблица 1).

**Таблица 1.** Производственные штаммы лактобацилл, для которых была изменена видовая принадлежность.

№ п/п	Штамм	Родовая и видовая принадлежность	
		(по паспортным данным)	(по данным молекулярно-генетического анализа)
1.	90-ТС-4	<i>L. fermentum</i>	<i>L. plantarum</i>
2.	гКНМ 101	<i>L. delbrueckii</i>	<i>L. plantarum</i>
3.	Er315/402	<i>L. acidophilus</i>	<i>L. helveticus</i>
4.	100 аш	<i>L. acidophilus</i>	<i>L. helveticus</i>
5.	НК-1	<i>L. acidophilus</i>	<i>L. helveticus</i>
6.	NNIE	<i>L. acidophilus</i>	<i>L. helveticus</i>
7.	гКНМ 23 л1	<i>L. brevis</i>	<i>L. casei/paracasei</i>
8.	гКНМ 577	<i>L. casei</i>	<i>L. casei/paracasei</i>
9.	К <sub>3</sub> Ш <sub>24</sub>	<i>L. acidophilus</i>	<i>L. casei</i>
10.	421-2	<i>L. plantarum</i>	<i>L. rhamnosus</i>
11.	гКНМ 526	<i>L. delbrueckii</i>	<i>L. fermentum</i>



В коллекции из 62 штаммов лактобацилл было идентифицировано 9 видов лактобацилл: *L. plantarum* (16 штаммов), *L. rhamnosus* (16 штаммов), *L. fermentum* (10 штаммов), *L. casei/paracasei* (8 штаммов), *L. helveticus* (4 штамма), *L. brevis* (3 штамма), *L. salivarius* (3 штамма), *L. mucosa* (1 штамм), *L. johnsonii/gasseri* (1 штамм).

### **Биоинформатический поиск и структура модулей ТА систем**

Вторым этапом работы был поиск ТА систем в геномах тех видов бактерий, которые наиболее часто встречаются в микробиоте здоровых людей центральной области России: *L. casei*, *L. fermentum*, *L. plantarum*, *L. rhamnosus* и *L. helveticus*.

В ходе биоинформатического анализа было идентифицировано три различные ТА системы в штаммах *L. rhamnosus* (RelBE3<sub>Lrh</sub>, YefM-YoeB<sub>Lrh</sub> и один токсин relE1<sub>Lrh</sub> соло); одна ТА система в штамме *L. casei* (RelBE1<sub>Lcs</sub>) и пять ТА систем в штаммах *L. helveticus* (RelBE1<sub>Lhv</sub>, RelE2<sub>Lhv</sub> – соло, RelBE3<sub>Lhv</sub>, RelBB4<sub>Lhv</sub>, RelBE5<sub>Lhv</sub>). В штаммах *L. fermentum* и *L. plantarum* ТА систем RelBE типа обнаружено не было. Во всех описанных ТА системах антитоксин принадлежал RelB суперсемейству, а токсин - к суперсемейству RelE (за исключением системы RelBE5<sub>Lhv</sub>, где оба гена аннотируются как антитоксины, и RelBE5<sub>Lhv</sub>).

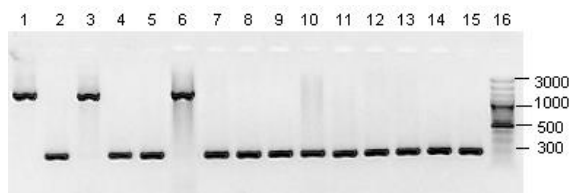
### **Изучение полиморфизма генов суперсемейства RelBE**

С помощью ПЦР и последующего секвенирования мы определили наличие и полиморфизм идентифицированных ТА систем в 16 штаммах *L. rhamnosus*, в 8 штаммах *L. casei* и в 4 штаммах *L. helveticus* из охарактеризованной коллекции. Был также исследован полиморфизм ТА генов у полностью секвенированных на 2011 год штаммов, представленных в GenBank. Критерием геномного полиморфизма являлось наличие или отсутствие генов в конкретных геномах, критерием генного полиморфизма – изменения в нуклеотидной последовательности генов.

Все девять идентифицированных ТА систем были обнаружены в геномах российских штаммов.

Ген токсина *relE1<sub>Lrh</sub>* имеется у всех штаммов *L. rhamnosus* – как из GenBank, так и из коллекции. Он представлен соло, т.е. без гена антитоксина. Для трех штаммов из коллекции при разделении продуктов ПЦР в электрофорезе были получены фрагменты, превышавшие по молекулярной массе искомые фрагменты ДНК с ТА локусами (рисунок 1). При анализе таких фрагментов ДНК было обнаружено, что они содержали внутри гена *relE1<sub>Lrh</sub>* IS-элемент группы IS3. 18 штаммов, не содержащих IS-элемента, имеют одинаковые по величине гены и белки и отличаются друг от друга заменами нуклеотидов в гене, 3 штамма отличаются от других заменами аминокислот в белке.

Система **YefM-YoeB<sub>Lrh</sub>** обнаружена у части штаммов из GenBank и лабораторной коллекции, всего в 12 штаммах. Система отличается высоким консерватизмом – из 12 штаммов у 11 гены токсина и антитоксина идентичны; у одного штамма есть одна нуклеотидная замена в гене токсина, приводящая к аминокислотной замене.



**Рисунок 1** – Разделение в электрофорезе продуктов ПЦР с праймерами для гена *relE1<sub>Lrh</sub>* и ДНК штаммов *L. rhamnosus* в качестве матрицы:

1 - 421-2; 2 – 7дст; 3 – 24дст; 4 – К32; 5 – 38к; 6 – 50зв; 7 – 72зв; 8 - 40ст; 9 – 80ст; 10 – 2гн; 11 – 22гн; 12 – 51гн; 13 – 45д; 14 – 26ск; 15 – 61ск; 16 – маркер мол.веса.

Наличие полноценной системы **RelB3-RelE3<sub>Lrh</sub>** можно предположить только у двух из 8-ми секвенированных штаммов *L. rhamnosus* из GenBank (R0011 и ATCC21052) и 9 лабораторных штаммов, всего у 11 штаммов. У остальных штаммов данная ТА система также есть, однако в обоих генах есть множественные отличия в НП по сравнению со штаммами R0011 и ATCC210520 (замены нуклеотидов, сдвиги рамки считывания, делеции). Распределение ТА систем в штаммах *L. rhamnosus* представлено в таблице 2.

**Таблица 2.** Распределение генов ТА систем в штаммах *L. rhamnosus*.

№ группы	Штаммы <i>L.rhamnosus</i>	Гены токсинов	Гены антитоксинов
1	<b>GG</b> , 421-1; 26ск; 61ск	<i>relE1</i>	<i>relB3</i>
2	<b>LMS2-1</b> , 24дст	<i>relE1</i> <i>relE3</i> <i>yoeB</i>	<i>relB3</i> <i>yefM</i>
3	<b>ATCC 21052; R0011</b> ; 72зв; 22гн; К32; 38к; 45д	<i>relE1</i> <i>relE3</i>	<i>relB3</i>
4	<b>LC705, ATCC8530, CASL</b> ; 40ст; 80ст; 2гн; 51гн	<i>relE1</i> <i>relE3</i> <i>yoeB</i>	<i>relB3</i> <i>yefM</i>
5	<b>HN001</b> ; 7дст; 50зв	<i>relE1</i>  <i>yoeB</i>	<i>relB3</i>  <i>yefM</i>

Жирным шрифтом выделены штаммы из GenBank

ТА система **RelBE1<sub>Lcs</sub>** имеется у всех штаммов *L. casei* как из GenBank (4 штамма) так и из лабораторной коллекции (8 штаммов). У 8 штаммов из 12 гены токсина и антитоксина идентичны, у трех штаммов в гене токсина имеются замены нуклеотидов, приводящие к аминокислотным заменам в белке. У штамма К<sub>3</sub>Ш<sub>24</sub> есть нуклеотидные замены, приводящие к АК заменам в обоих генах ТА системы.

У *L. helveticus* все идентифицированные ТА системы присутствовали во всех 4-х исследованных штаммах из лабораторной коллекции и 4-х из GenBank. Гены/белки каждой из ТА систем у разных штаммов отличались на 1-3 нуклеотида/аминокислоты; гены антитоксина были более консервативны, чем гены токсинов. Число аллелей ТА систем составляло от 2 до 6. Распределение ТА систем в штаммах *L. helveticus* представлено в таблице 3.

**Таблица 3.** Распределение генов ТА систем в штаммах *L. helveticus*.

№ группы	Штамм	Гены токсинов	Гены антитоксинов
1	<b>DPC 4571</b>	<i>relE1</i> <i>relE2</i>  <i>relE5</i>	<i>relB1</i>  <i>relB3</i> <i>relB4-1</i> <i>relB5</i>
2	<b>H10, MTCC5463, 100ash, NK1, NNIE, Er315/402</b>	<i>relE1</i> <i>relE2</i> <i>relE3</i>  <i>relE5</i>	<i>relB1</i>  <i>relB3</i> <i>relB4-1, relB4-2</i> <i>relB5</i>
3	<b>R0052</b>	<i>relE1</i> <i>relE2</i> <i>relE3</i>  <i>relE5</i>	<i>relB1</i>  <i>relB3</i> <i>relB4-2</i> <i>relB5</i>

Жирным шрифтом выделены штаммы из GenBank.

Ген токсина *relE2<sub>Lhv</sub>* представлен соло, т.е. без гена антитоксина. В геномах штаммов *L. rhamnosus* также были обнаружены единичные гены токсина *relE1<sub>Lrh</sub>*. Возможно, данные токсины имеют свои специфические антитоксины, однако они расположены в другом месте хромосомы. Возможно, что и одиночные гены токсинов могут участвовать, наряду с полноценными ТА системами, в регуляции клеточных процессов.

Обычно ТА системы состоят из гена токсина и антитоксина, которые расположены рядом и образуют оперон. Система **RelBB4<sub>Lhv</sub>**, необычна тем, что состоит из двух генов, взаимное расположение и величина которых соответствуют таковым ТА систем, однако оба белка аннотируются как антитоксины. Возможно, один из белков этой системы является токсином с новым, еще не описанным, механизмом действия. При поиске новых ТА систем в штаммах *L. helveticus* мы обнаружили похожую по составу генов систему, для которой была показана токсическая активность одного из белков в клетках *E. coli* (см. следующий раздел).

Система **RelBE5<sub>Lhv</sub>** необычна, так как она состоит из гена антитоксина, который относится к семейству RelB, и расположенного рядом предполагаемого гена токсина, величина которого больше обычной и составляет 882 пн.

Все идентифицированные нами ТА системы различны. Гены токсинов и антитоксинов одной ТА системы отличаются единичными заменами нуклеотидов и имеют более 99% идентичности (кроме RelBE3<sub>Lrh</sub>, где наблюдаются многочисленные делеции и система «разваливается»). Для разных ТА систем идентичность аминокислотных последовательностей белков составляет менее 43%.

Белки токсинов и антитоксинов исследованных нами лактобацилл сходны с таковыми других лактобацилл и грам-положительных бактерий и, в меньшей степени, с белками *E. coli* и других грам-отрицательных микроорганизмов. Однако некоторые белки (RelB3<sub>Lrh</sub>, RelE3<sub>Lrh</sub>, RelB1<sub>Lhv</sub>, RelB2<sub>Lhv</sub>) свойственны только определенному виду лактобацилл – *L. rhamnosus* или *L. helveticus*.

Штаммы лактобацилл демонстрируют полиморфизм ТА систем, как геномный, так и генный. Генный полиморфизм штаммов может приводить к аминокислотным заменам и, в отдельных случаях, к потере активности белков (как у гена токсина *yoeB*<sub>Lrh</sub> из штамма *L. rhamnosus* 40st – см. следующий раздел). Единичные нуклеотидные замены, возможно, могут приводить и к изменению регуляции активности генов и белков, влияя на эффективность транскрипции и трансляции. Геномный полиморфизм характеризуется тем, что штаммы имеют свой специфический набор генов токсинов и антитоксинов, что позволяет использовать данный полиморфизм ТА систем для характеристики отдельных штаммов. Нами была разработана система праймеров для видовой и штаммовой идентификации лактобацилл на основе ТА систем и получен патент на данное изобретение (патент № 2526576).

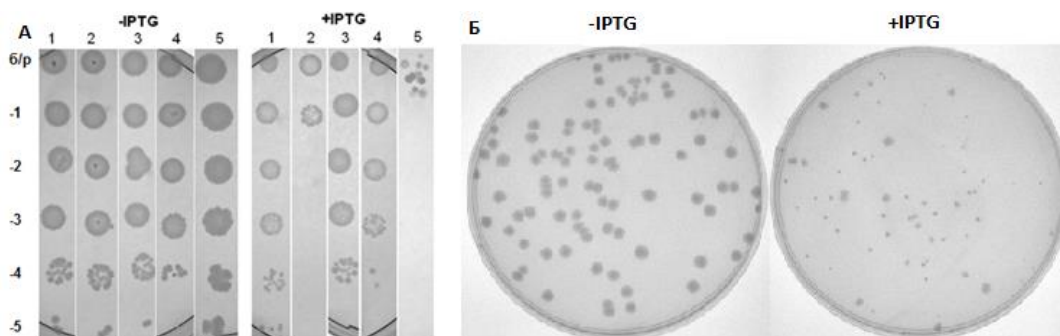
### **Изучение функционирования ТА систем лактобацилл в клетках *E. coli***

Чтобы выяснить, проявляют ли продукты идентифицированных генов токсинов из штаммов *L. rhamnosus*, *L. casei* и *L. helveticus* активность именно как токсины, мы определили влияние экспрессии данных генов на рост клеток на стандартной модели *E. coli*.

Для каждой из трех ТА систем *L. rhamnosus* был выбран наиболее часто встречающийся вариант гена токсина. Для штаммов *E. coli* BL21(DE3), содержащих плазмиды с клонированными генами токсинов *yoeB*<sub>Lrh</sub> и *relE3*<sub>Lrh</sub>, эффективность роста на чашках с IPTG была значительно ниже, чем на чашке без индуктора (рисунок 2А). Для штамма *E. coli* BL21(DE3) с клонированным геном *relE1*<sub>Lrh</sub> эффективность роста на чашках с IPTG была незначительно хуже, чем на чашках без индуктора (рисунок 2А), однако величина колоний на чашках с IPTG была значительно меньше (рисунок 2Б). Вероятно, действие токсина RelE1<sub>Lrh</sub> проявляется таким необычным образом.

Белок YoeB из штамма *L. rhamnosus* 40st, имеет одну АК замену, экспрессия данного белка не влияла на рост клеток *E. coli* по сравнению с

аналогичными белками из других штаммов *L. rhamnosus* (рисунок 2А). Вероятно, белок  $YoeB_{Lrh24}$  является активным токсином, а мутация подавляет активность белка.

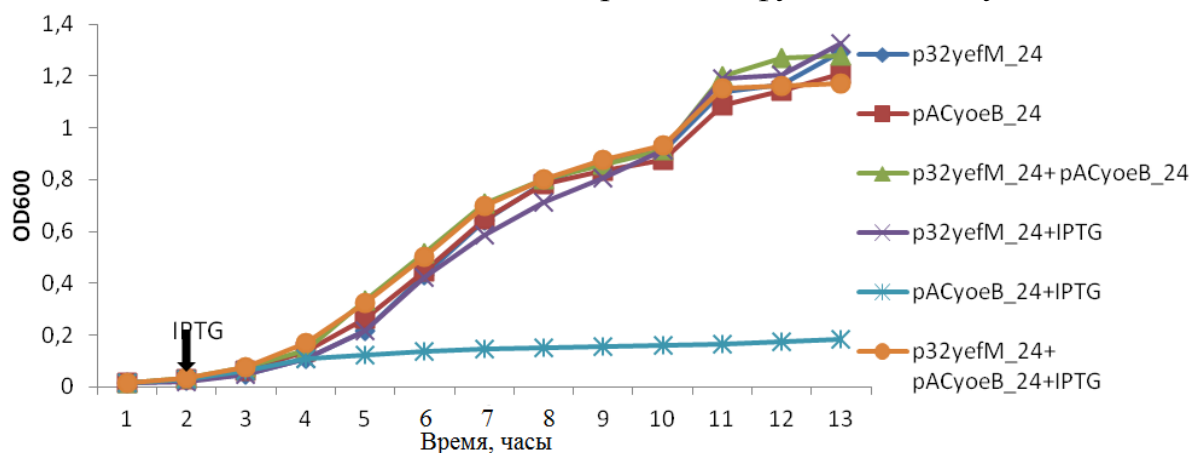


**Рисунок 2** – Влияние экспрессии клонированных генов токсинов *L. rhamnosus* на рост штамма *E. coli* BL21(DE3) на твердой среде, содержащей плазмиды:

А: 1 – контроль p32а; 2 - p32yoeB<sub>Lrh\_24</sub>; 3 - p32yoeB<sub>Lrh\_40</sub>; 4 - p32relE1<sub>Lrh\_2</sub>; 5 - p32relE3<sub>Lrh\_45</sub>.

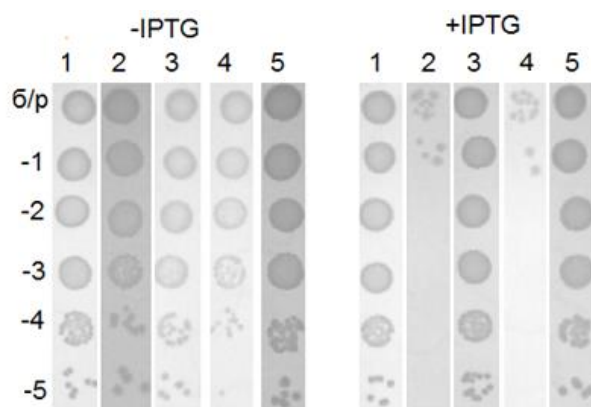
Б: Рассев на твердой среде культуры, содержащей плазмиду p32relE1<sub>Lrh\_2</sub>. Разведение 10<sup>-3</sup>.

Введение в клетки *E. coli*, несущие плазмиду с клонированным геном токсина  $yoeB_{Lrh_24}$ , плазмиды p32yefM<sub>Lrh\_24</sub> с геном антитоксина  $yefM_{Lrh}$  делало характер роста штамма неизменным в присутствии IPTG и без него (рисунок 3). Следовательно, антитоксин  $YefM_{Lrh24}$  подавляет активность токсина  $YoeB_{Lrh24}$  в клетках *E. coli*, т.е., также как и токсин, проявляет функциональную активность.



**Рисунок 3** – Характер роста штаммов *E. coli* BL21(DE3), содержащих плазмиды с клонированными генами токсина  $yoeB_{Lrh24}$  и антитоксина  $yefM_{Lrh24}$ , в жидкой среде LB. К части культур в указанный на рисунке момент времени был добавлен IPTG.

В штаммах *L. helveticus* были клонированы два варианта гена  $relE1_{Lhv}$  (pACrelE1<sub>Lhv</sub>\_NN, pACrelE1<sub>Lhv</sub>\_NK), отличающиеся тремя нуклеотидными заменами; два варианта гена  $relE2_{Lhv}$  (pACrelE2<sub>Lhv</sub>\_NN, pACrelE2<sub>Lhv</sub>\_NK), отличающиеся двумя нуклеотидными заменами; ген  $relE3_{Lhv}$  (pACrelE3<sub>Lhv</sub>\_NN); ген  $relE5_{Lhv}$  (pACrelE5<sub>Lhv</sub>\_NN). На рисунке 4 показано влияние экспрессии одного варианта клонированных генов для каждой ТА системы на рост клеток *E. coli* на твердой среде. Нуклеотидные и аминокислотные замены в генах  $relE1_{Lhv}$ ,  $relE2_{Lhv}$  и  $relE3_{Lhv}$  и соответствующих им белках не приводили к изменению экспрессии гена токсина.



**Рисунок 4** – Влияние экспрессии клонированных генов токсинов *L. helveticus* на рост на твердой среде штамма *E. coli* BL21(D3), содержащего плазмиды:  
 1 – контроль, вектор pACYCDuet-1; 2 – pACrelE1<sub>Lhv</sub>\_NN;  
 3 – pACrelE2<sub>Lhv</sub>\_NN; 4 – pACrelE3<sub>Lhv</sub>\_NN; 5 – pACrelE5<sub>Lhv</sub>\_NN.

Токсины RelE2<sub>Lhv</sub> и RelE5<sub>Lhv</sub> не влияют на рост клеток *E. coli*, как в присутствии IPTG, так и без индуктора. В то же время токсины RelE3<sub>Lhv</sub> и RelE1<sub>Lhv</sub> при добавлении индуктора дают значительное уменьшение скорости роста культуры, что свидетельствует об активности соответствующих белков как токсинов.

Далее, мы выяснили, являются ли активными белки антитоксинов у ТА систем с функционально активными генами токсинов *relE1<sub>Lhv</sub>* и *relE3<sub>Lhv</sub>*. Введение в клетки *E. coli*, несущие плазмиду с клонированным геном токсина *relE3<sub>Lhv</sub>*, плазмиды с геном антитоксина *relB3<sub>Lhv</sub>* делало характер роста штамма неизменным в присутствии IPTG и без него. Аналогичные результаты были получены для системы RelB1<sub>Lhv</sub>. Следовательно, антитоксины RelB1<sub>Lhv</sub> и RelB3<sub>Lhv</sub> подавляют активность соответствующих токсинов в клетках *E. coli*, т.е., также как и токсины, проявляют функциональную активность. Для штамма *E. coli* BL21(DE3), содержащего плазмиду с геном токсина *L. casei* (p32*relE1<sub>Lcs</sub>*), эффективность роста на чашках с IPTG и без индуктора была одинаковой.

Таким образом, было показано, что белки 5-ти токсинов при экспрессии подавляют рост клеток *E. coli*, т.е. проявляют в них функциональную активность. Совмещение в клетках *E. coli* генов 4-х из этих токсинов с генами соответствующих антитоксинов устраняло токсический эффект. Следовательно, для данных ТА систем лактобацилл показана функциональная активность обоих белков.

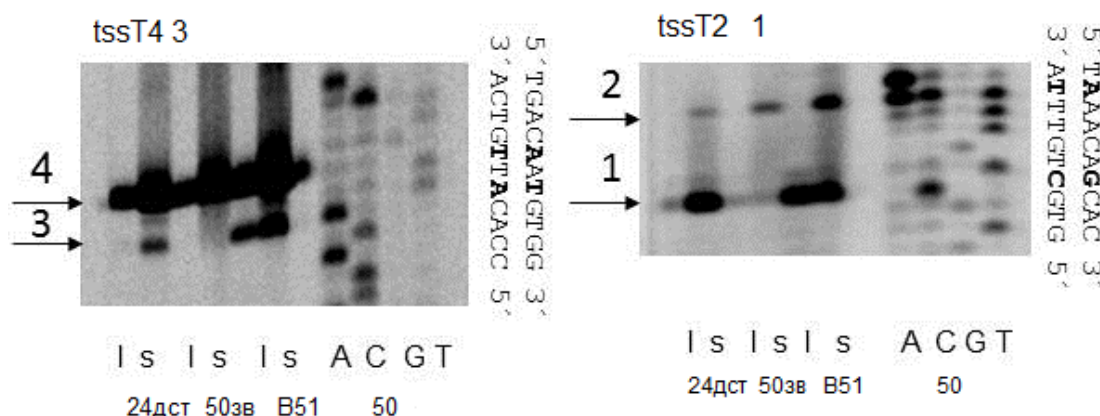
Для штаммов *E. coli* BL21(DE3), содержащих плазмиды с токсинами *relE2<sub>Lhv</sub>*, *relE5<sub>Lhv</sub>*, и *relE1<sub>Lcs</sub>* эффективность роста на чашках с IPTG и на чашках без индуктора не отличалась, однако это не значит, что данные белки не являются токсинами. Возможно, один из собственных антитоксинов, синтезируемых клетками *E. coli* BL21(D3), способен подавлять активность токсинов лактобацилл.

### Изучение регуляции экспрессии ГА системы YefM-YoeB<sub>Lrh</sub>

Для более детальных исследований нами была выбрана ГА система YefM-YoeB<sub>Lrh</sub>. Задачей данного раздела работы было изучение структурной организации оперона YefM-YoeB<sub>Lrh</sub> и его транскрипции.

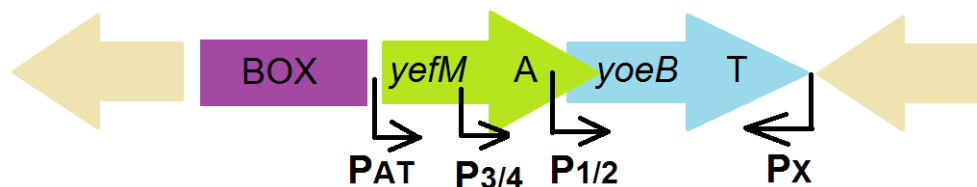
У всех штаммов, содержащих ГА систему YefM-YoeB<sub>Lrh</sub>, как из лабораторной коллекции, так и из GenBank, НП проксимального (410 нп) и дистального (213 нп) районов оперона были идентичны. Мы подробно исследовали область, предшествующую оперону, и обнаружили, что она содержит так называемый ВОХ-элемент – последовательность длиной около 300 нп с GC-составом 54% (GC-состав геномов *L. rhamnosus* в пределах 43,3-43,6%). Данный участок присутствует в некодирующих районах всех секвенированных геномов *L. rhamnosus* и представлен 12-13 неидентичными копиями на геном. В дистальной области оперона мы идентифицировали новую ORF, ORF27, расположенную за стоп-кодоном гена токсина на другой, чем ГА оперон, цепи ДНК и имеющую размер 85 нп.

Предпринятые несколько раз попытки клонировать оперон *yefM-yoeB<sub>Lrh</sub>* целиком были безуспешными. Мы предположили, что внутри данной системы имеется регуляторный элемент – возможно промотор, который стоит перед геном токсина, и попытались экспериментально подтвердить наше предположение. Для этого провели стандартный эксперимент по поиску промоторов по методу удлинения праймера у штаммов *L. rhamnosus* 24дст, B51 и 50зв. Мы обнаружили два участка инициации транскрипции перед геном токсина и в пределах последовательности гена антитоксина, каждый участок содержит 2 сайта инициации транскрипции (рисунок 5). Таким методом нам удалось найти два предполагаемых промотора (P<sub>1/2</sub> и P<sub>3/4</sub>), которые находятся внутри ГА системы.



**Рисунок 5** – Определение точек инициации транскрипции методом удлинения праймера для штаммов *L. rhamnosus* 24дст, B51 и 50зв. s – стационарная фаза роста культур; Жирным шрифтом выделены нуклеотиды, с которых начинается транскрипция.

При анализе района, предшествующего оперону *yefM-yoeB<sub>Lrh</sub>*, нам удалось обнаружить, исходя из литературных данных о строении ТА системы и используя поиск промоторов на сайте BPROM, кроме ВОХ-элемента, область, которая соответствует промотору. Наличие такого промотора не удалось показать методом удлинения праймера. Поэтому для поиска основного промотора (P<sub>AT</sub>) перед опероном, мы использовали метод определения дефицитных мРНК. Нам удалось идентифицировать промотор оперона; кроме того, НП праймера, которая использовалась для выявления основного промотора (P<sub>AT</sub>), оказалась еще и комплементарной к 3-концу гена *yoeB<sub>Lrh</sub>*. Таким способом нам удалось найти еще один предполагаемый промотор P<sub>X</sub>, который находится в дистальной части оперона и инициирует транскрипцию в противоположном, по сравнению с 3-мя другими промоторами, направлении. Схематическое изображение исследуемой системы представлено на рисунке 6.



**Рисунок 6** – Схема строения оперона *yefM-yoeB<sub>Lrh</sub>*.

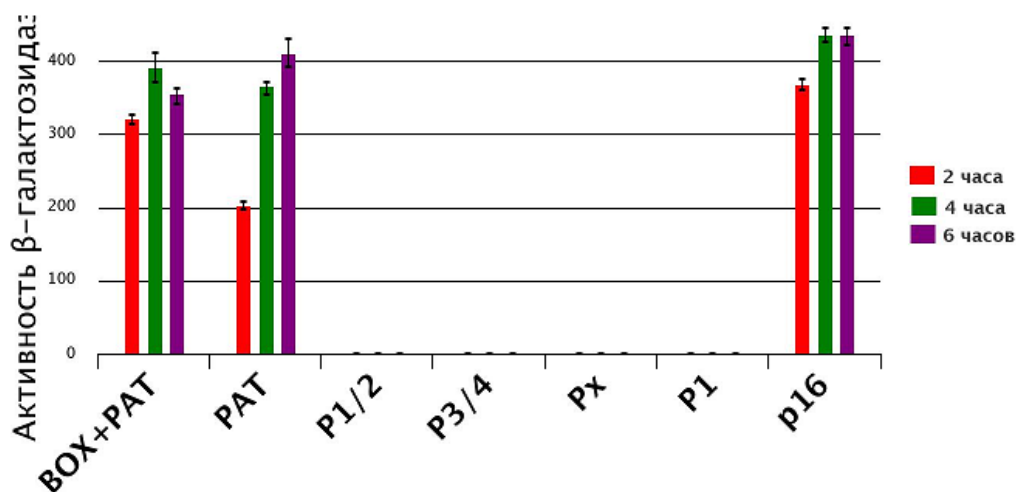
Для определения активности предполагаемых промоторов и района ВОХ встраивали плазмиды с клонированным районом предполагаемого промотора и геном-репортером β-галактозидазы в хромосому грам-положительной бактерии *B. subtilis* DB104. Определение экспрессии с промоторов показало, что активен только основной промотор, P<sub>AT</sub> (рисунок 7). При этом ВОХ-элемент никак не влиял на активность данного промотора.

В локусе *yefM-yoeB<sub>Lrh</sub>* *L. rhamnosus* мы идентифицировали четыре сайта инициации транскрипции (tss); в трех из них транскрипция начиналась с двух близлежащих нуклеотидов. Один из сайтов располагался перед геном антитоксина, два других – внутри гена антитоксина, в середине его (tss 1/2) и конце (tss 4/3). РНК, синтезируемые с этих tss, соответствовали С-концевой части гена антитоксина и гену токсина. У ТА систем II типа белок антитоксина обычно имеет два активных домена: С-концевой взаимодействует с белком токсина и нейтрализует его активность, а N-концевой представлен ДНК-связывающим районом, он взаимодействует с промотором оперона и регулирует его транскрипцию [Smith J.A. et al., 2004]. Возможно, гипотетический пептид ΔYoeB, для которого РНК транскрибируется с tss 4/3, имеет только одну функцию - подавлять активность токсина, но не регулировать транскрипцию оперона.

Сайты связывания для σ<sub>70</sub> субъединицей РНК полимеразы и для рибосомы мы смогли идентифицировать только для tss, расположенного перед геном

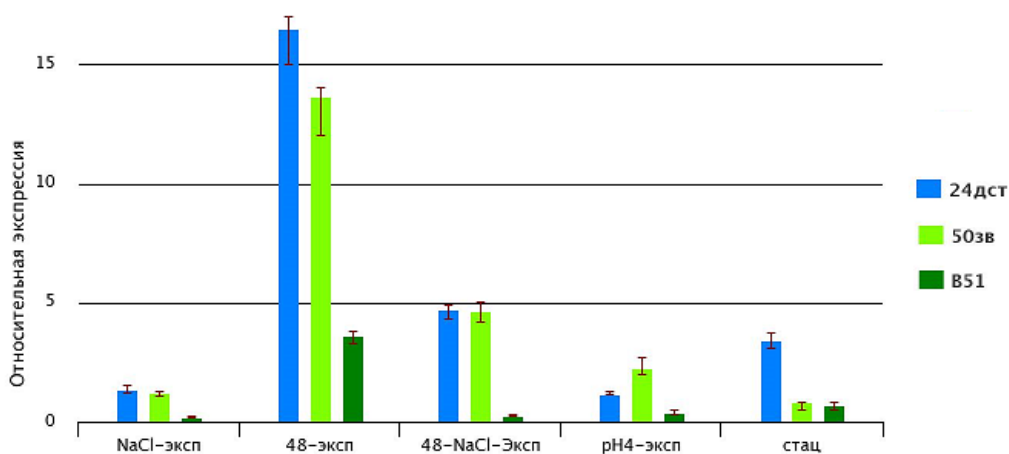


антитоксина. Именно соответствующий участок ДНК показал активность как промотор при клонировании с геном-репортером. Для двух других участков, *tss* 1/2 и *tss* 4/3, а также для *tssX*, показать промоторную активность не удалось. Возможно, эти сайты узнаются сигма-факторами, специфичными для лактобацилл или активными в определенных стрессовых условиях. Перед этими сайтами мы обнаружили последовательность TGG.....TGG, сходную с промотором, узнаваемым субъединицей  $\sigma_{54}$  РНК полимеразы [Stevens M.J. et al., 2010]. Гипотетические РНК, которые образуются с этих промоторов, могут транслироваться по так называемому *leaderless* механизму; они могут быть и регуляторными нетранслируемыми РНК. Гипотетический транскрипт, получаемый с *tssX*, сходен по расположению с антитоксином I типа, характерным для *B. subtilis* (ТА системы TxpA/RatA, BsrG/SR4, YonT/AS-YonT). Эти РНК антитоксины взаимодействуют с 3' концом мРНК токсина и образуют двухцепочечную РНК, которая разрушается нуклеазами (Brantl S. et al., 2012).



**Рисунок 7** – Измерение активности промоторов по уровню синтеза β-галактозидазы  
P<sub>1</sub> – отрицательный контроль; P<sub>16</sub> – положительный контроль  
2, 4, 6 часов – инкубация с ОНФГ

Мы определили также экспрессию оперона *yefM-yoeV<sub>Lrh</sub>* в различных стрессовых условиях. Для эксперимента были выбраны три штамма *L. rhamnosus* 24дст, 50зв и В51, имеющие идентичную НП оперона. Была выполнена серия опытов количественной ПЦР в реальном времени с использованием прямого праймера, расположенного в гене антитоксина *yefM<sub>Lrh</sub>*, и обратного праймера, расположенного в гене токсина *yoeV<sub>Lrh</sub>*. Для всех 4-х исследованных штаммов были получены РНК, что говорит о транскрипции обоих генов в составе одной РНК, т.е. подтверждает оперонное строение ТА системы. Были выбраны следующие стрессовые условия для экспоненциально растущей культуры: 48°C; 0,8М NaCl; 48°C + 0,8М NaCl; рН 4,0, а также определена экспрессия генов в экспоненциальной культуре относительно экспрессии в стационарной культуре. Результаты представлены на рисунке 8.



**Рисунок 8** – Экспрессия оперона *yefM-yoeB<sub>Lrh</sub>* в различных стрессовых условиях.

Определялась экспрессия оперона в экспоненциальной фазе роста относительно экспрессии в стационарной фазе роста и при разных стрессовых условиях. В качестве контроля использован ген *ileS*.

Увеличение экспрессии ТА системы происходило для всех 3-х штаммов при 48°C, хотя и в разной степени. При кислотном и солевом стрессе экспрессия ТА системы не менялась. При сочетании обоих факторов стресса (температура и NaCl), были получены промежуточные значения.

Использованные в работе штаммы *L. rhamnosus* имели идентичную НП как оперона, так и окружающих его участков ДНК. Однако изменение активности транскрипции у разных штаммов при одних и тех же условиях были различны. Вероятно, в регуляции активности ТА системы участвуют различные белки клетки.

### Поиск и характеристика новых ТА систем у *L. helveticus*

В последние 10 лет происходит интенсивное изучение структуры, функций и распространения хромосомных ТА систем бактерий. Обнаруживаются новые типы и семейства ТА систем. Поиск новых ТА систем у лактобацилл обусловлен тем, что, с одной стороны, это важные элементы регуляторной системы клетки, а с другой – тем, что они могут быть использованы для штаммовой идентификации, в том числе при метагеномном анализе. Мы предприняли поиск новых ТА систем у *L. helveticus*.

На основе литературных данных о строение ТА систем II типа с помощью написанного нами скрипта мы попытались найти новые ТА системы в геномах секвенированных и аннотированных штаммов *L. helveticus* из GenBank. Таким образом, для штамма *L. helveticus* DPC4571 было найдено двадцать семь, для штаммов *L. helveticus* H10 – тридцать пять и для *L. helveticus* R0052 – шестьдесят две предполагаемые пары генов, удовлетворяющие заданным параметрам. Далее были удалены гены-кандидаты, для которых функции соответствующих белков явно не соответствовали свойствам ТА систем (например, гены *30S* или *50S* рибосомальных субъединиц).

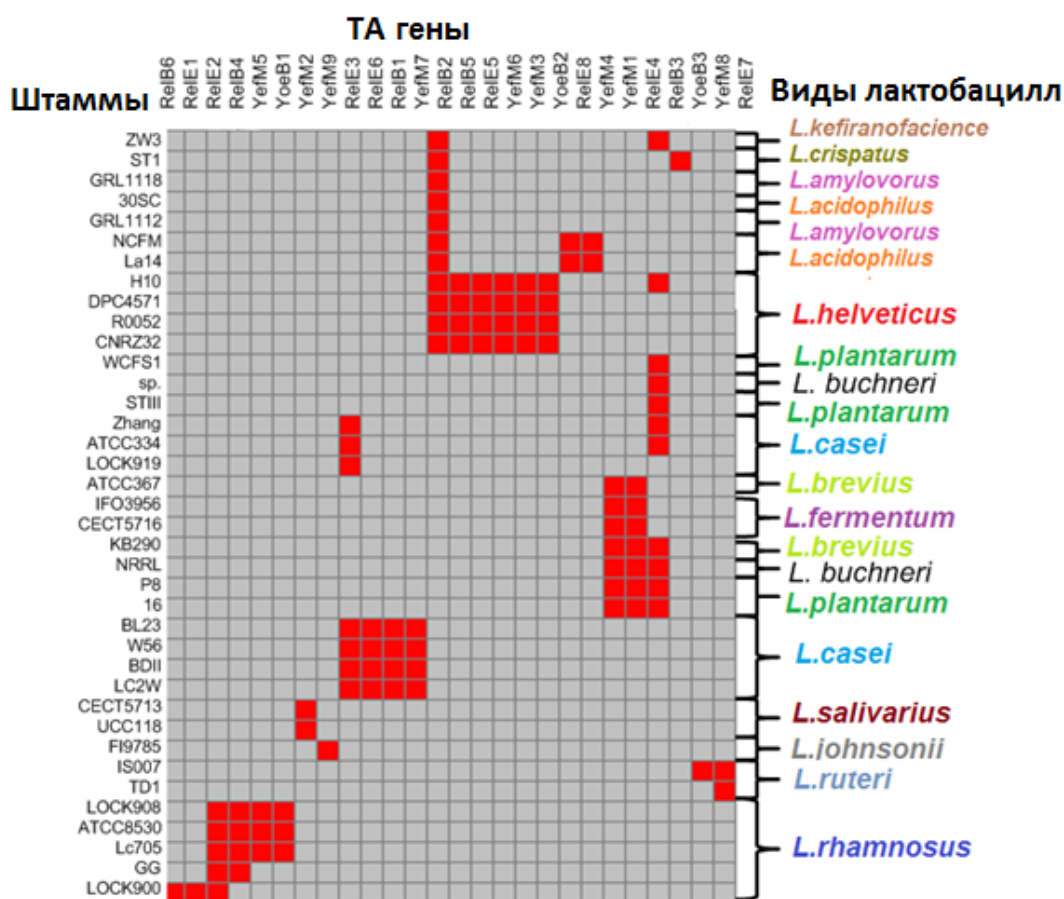
Таким образом, в 3-х аннотированных геномах *L. helveticus* из GenBank выявлено *in silico* 27 пары генов, предположительно относящихся к генам ТА систем. В четырех штаммах *L. helveticus* (100аш, NKI, NNIE, Er317) из лабораторной коллекции были идентифицированы только 18 из этих гипотетических ТА систем. Определены НП генов предполагаемых токсинов для этих ТА систем. Показано, что штаммы обладают геномным и практически не обладают генным полиморфизмом по данным локусам. Из 18 клонированных на плазмиде рЕТ32а генов предполагаемых токсинов, только три проявляют активность в клетках *E.coli* BL21 (DE3) как токсины, подавляя рост бактериальных клеток. По результатам аннотации программы BLASTp, все три гипотетических токсина не имеют рибонуклеазной активности, свойственной подавляющему большинству токсинов II типа, и являются новыми типами токсинов. Для одной из этих трех предполагаемых ТА систем - ТА12<sub>Lrh</sub> – оба белка, и токсин, и антитоксин, были аннотированы как транскрипционные регуляторы; подобная активность свойственна антитоксинам.

Полученные данные свидетельствуют о том, что число и разнообразие ТА систем крайне велики и только малая их часть описана.

### **Системы ТА как биомаркеры для идентификации штаммов лактобацилл**

Штаммы *L. rhamnosus*, *L. helveticus*, и *L. casei*, изучаемые в работе, обладают различным набором ТА систем RelBE типа. Мы предположили, что полиморфизм ТА систем как на генном, так и на геномном уровне, можно использовать для характеристики видов и штаммов лактобацилл. Для этого необходимо было выявить все варианты наборов систем суперсемейства RelBE, характерные для всех видов бактерий рода *Lactobacillus*, доступных в международной базе данных GenBank, NCBI. Системы ТА изучались в геномах, для которых была доступна полногеномная последовательность, что соответствует статусу “complete”. Поиск генов ТА систем осуществлялся по гомологии. За основу был взят набор систем ТА суперсемейства RelBE из охарактеризованных нами ранее штаммов *L. rhamnosus*, *L. helveticus*, *L. casei*. Для каждого гена была охарактеризована встречаемость как на видовом, так и на штаммовом уровне.

После расширенной аннотации по генам суперсемейства RelBE в бактериях рода *Lactobacillus* была построена диаграмма (рисунок 9), на которой видно, что распределение генов токсинов и антитоксинов видо- и штаммоспецифично. Наиболее отдаленные виды не имеют пересекающихся генов Т и А. Штаммы, относящиеся к одному виду бактерий, имеют сходный, но не всегда идентичный набор генов Т и А.



**Рисунок 9** – Распределение генов ТА систем суперсемейства RelBE в штаммах *Lactobacillus*. Красным цветом показано наличие гена, серым – его отсутствие.

Мы полагаем, что данные гены можно использовать для идентификации видов и штаммов бактерий рода *Lactobacillus*. Предложенный метод видовой и штаммовой идентификации может быть использован как для характеристики отдельных штаммов, так и для характеристики сообщества микроорганизмов, например, в микробиоте человека.

### ВЫВОДЫ

1. В аннотированных геномах *L. rhamnosus*, *L. helveticus* и *L. casei* из GenBank *in silico* идентифицированы 6 ТА систем суперсемейства RelBE, два гена токсина *relE* соло и одна система RelBB, состоящая из 2-х генов антитоксинов.
2. Установлено, что штаммы лактобацилл обладают генным и геномным полиморфизмом по ТА системам суперсемейства RelBE. Распределение ТА систем у лактобацилл видо- и штаммоспецифично и может быть использовано для видовой и штаммовой характеристики.
3. Для ТА систем YefM-YoeB<sub>Lrh</sub>, RelBE3<sub>Lrh</sub>, RelE1<sub>Lhv</sub>, RelBE3<sub>Lhv</sub> показана активность как токсинов, так и антитоксинов в клетках *E. coli*.

4. Показана сложная структурная организация ТА системы YefM-YoeB<sub>Lrh</sub>: обнаружен участок ВОХ, предшествующий гену антитоксина и 4 предполагаемых промотора в опероне *yefM-yoeB<sub>Lrh</sub>*.
5. Экспрессия ТА системы YefM-YoeB<sub>Lrh</sub> в штаммах *L.rhamnosus* зависит от стадии роста культуры и температуры. Эта зависимость проявляется по-разному в разных штаммов лактобацилл.
6. В 3-х геномах *L.helveticus* из GenBank *in silico* выявлено 27 пар генов, относящихся к генам новых гипотетических ТА систем II типа. 18 из них были обнаружены в штаммах *L. helveticus* из лабораторной коллекции. Три гена предполагаемых токсинов проявили активность в клетках *E. coli*.

## СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

### Статьи в рецензируемых научных журналах списка ВАК:

1. Ботина С.Г., Червинец Ю.В., **Климина К.М.**, Коробан Н.В., Червинец В.М., Гаврилова О.А., Лебедев Д.В., Миронов А.Ю. Генетическая идентификация антагонистически активных штаммов лактобацилл, выделенных из полости рта здоровых людей // Клиническая лабораторная диагностика. – 2010. - №11. – с.43-46.
2. Ботина С.Г., **Климина К.М.**, Коробан Н.В., Зинченко В.В., Даниленко В.Н. Реклассификация отечественных пробиотических культур бактерий рода *Lactobacillus* // Генетика. - 2010. - Т. 46. - № 11. - С.1306-1313.
3. Ботина С.Г., Коробан Н.В., **Климина К.М.**, Глазова А.А., Захаревич Н.В., Зинченко В.В., Даниленко В.Н. Генетическое разнообразие бактерий рода *Lactobacillus* из гастроинтестинальной микробиомы людей // Генетика.–2010.- Т.46.- №12. - С.1589–1597.
4. **Klimina K.M.**, Kjasova D.Ch., Poluektova E.U., Leuschner Y., Krügel H., Saluz H.P., Danilenko V.N. Identification and characterization of Toxin-Antitoxin systems in strains of *Lactobacillus rhamnosus*, isolated from humans // *Anaerobe*.- 2013.- № p.1-8.
5. Krügel H., **Klimina K.**, Mrotzek G., Tretyakov A., Schöfl G., Saluz H.-P., Poluektova E.U., Danilenko V.N. Structure and regulation of gene expression of a toxin-antitoxin gene cluster *yefM<sub>Lrh</sub> yoeB<sub>Lrh</sub>* under various physiological conditions in human *Lactobacillus rhamnosus* isolates / *J. Basic Microbiol.* – 2015.– №54.–p1–10.
6. Yunes RA, **Klimina KM**, Emelyanov KV, Zakharevich NV, Poluektova EU, Danilenko VN. 2015. Draft genome sequences of *Lactobacillus plantarum* strain 90sk and *Lactobacillus brevis* strain 15f: focusing on neurotransmitter genes // *Genome Announcement.* – 2015 – 3(2):e00261-15.

## Публикации в сборниках конференций

1. Danilenko V.N., Averina O.V., Alekseeva M.G., **Klimina K.M.**, Poluektova E.U. The Toxin-Antitoxin System Gene Polymorphism As A Marker for Species and Strain Identification of the Probiotic Component of Human Microbiome // Abstracts of International Human Microbiome Congress, Paris – 2012 – p.19-21.

2. **Климина К.М.**, Кясова Д.Х., Полуэктова Е.У., Даниленко В.Н. Генетические системы токсин-антитоксин как маркеры полиморфизма штаммов лактобацилл из микробиоты человека // Международная конференция «Проблемы популяционной и общей генетики», 2012.

3. V.N. Danilenko, E.U. Poluektova, **K.M. Klimina**, D.H. Kjasova, J.V. Chervinetz, D.B. Malko, V.J. Makeev, F. Gusev, T.V. Tyajelova, D.A. Reshetov and E.I. Rogaev. Sequence and annotation of the chromosome of probiotic strain *Lactobacillus rhamnosus* 24 // Abstracts of International conference of postgenomic technology for biomedicine, Novosibirsk. - 2012. – p.31.

4. **Klimina K.M.**, Kjasova D.H. , Poluektova E.U. , Danilenko V.N. Genetic systems of toxin-antitoxin as modules responsible for stress // The 38th FEBS Congress: St Petersburg, Russia. – 2013. – p. 228-229.

5. H. Kruegel, **K. Klimina**, D. Kjasova, E. Poluektova, G. Schöfl, A. Tretyakov, H.-P. Saluz, V. Danilenko. Identification of TA systems in *Lactobacilli*: structure and regulation of gene expression of a toxin-antitoxin gene cluster under various physiological conditions in *Lactobacillus rhamnosus* // Abstracts The 5th Congress of European Microbiologists. – 2013

6. **Ksenia Klimina**, Siarhei Hladyshau, Natalia Zakharevich, Artem Kasianov, Elena Poluektova, Vsevolod Makeev, Valery Danilenko. Type II toxin-antitoxin systems as a functional marker for identification of Bifidobacterium and Lactobacillus strains suitable for metagenomic studies // Abstracts, 5th International Human Microbiome Congress – 2015. – p.7.

7. **Ksenia Klimina**, Kirill Emelyanov, Natalia Zakharevich, Artem Kasianov, Elena Poluektova, Vsevolod Makeev, Valery Danilenko. The comparative genomic analysis of *Lactobacillus rhamnosus* strains, isolated from human gut, saliva and vagina. Abstracts, 5th International Human Microbiome Congress– 2015. – p.69.

## Патенты.

**Алексеева М.Г., Климина К.М., Даниленко В.Н.** Способ идентификации лактобацилл // Патент РФ № **2526576**. Приоритет изобретения 23.12.11

## **БЛАГОДАРНОСТИ**

**д.б.н. Ботиной Светлане Геннадиевне**

**Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт  
общей генетики им. Н.И. Вавилова Российской академии наук**

*Лаборатория генетики микроорганизмов*

**д.б.н. Даниленко Валерий Николаевич**

**д.б.н. Полуэктова Елена Ульриховна**

**Захаревич Наталья Владимировна**

*Студенты лаборатории генетики микроорганизмов*

**Гладышев Сергей Александрович (МФТИ, кафедра биоинформатики)**

**Емельянов Кирилл Викторович (МФТИ, кафедра биоинформатики)**

**Алиев Владислав Олегович (МГУ, кафедра генетики)**

*Лаборатория системной биологии и вычислительной генетики*

**д.б.н. Макеев Всеволод Юрьевич**

**к.б.н. Касьянов Артем Сергеевич**

**Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт  
молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук**

*Лаборатория постгеномных исследований*

**к.б.н. Кудрявцева Анна Викторовна**

**к.б.н. Снежкина Анастасия Владимировна**

**Leibniz Institute for Natural Product Research and Infection Biology, Hans-  
Knöll-Institute, Beutenbergstr, Jena, Germany**

**Hans Krügel**

**Friedrich-Schiller-University Jena, Germany**

**Sabine Brantl**

**Natalie Jahn**

