

На правах рукописи

КОШЕНКО Татьяна Анатольевна

**Генетическая и биохимическая характеристика
F₀F₁-АТФ-синтазы *Streptomyces fradiae* ATCC 19609**

Специальность 03.02.07 – генетика

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва 2018

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

Научный руководитель: кандидат биологических наук,
АЛЕКСЕЕВА Мария Георгиевна, старший научный сотрудник лаборатории генетики микроорганизмов ФГБУН Института общей генетики им. Н.И. Вавилова Российской академии наук, г. Москва.

Официальные оппоненты: доктор биологических наук,
ТРЕНИН Алексей Сергеевич, заведующий лабораторией разработки методов поиска биологически активных соединений ФГБУ НИИ по изысканию новых антибиотиков им. Г. Ф. Гаузе

кандидат биологических наук,
ВОЕЙКОВА Татьяна Александровна, главный научный сотрудник лаборатории белковой инженерии ФГБУ ГосНИИ генетики и селекции промышленных микроорганизмов -НИЦ «Курчатовский институт»

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт молекулярной генетики Российской академии наук (ИМГ РАН)

Защита состоится «31» мая 2018 г. в ____ часов на заседании диссертационного совета Д.002.214.01 в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институте 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, тел. 8-499-135-14-31.

Автореферат разослан « ____ » _____ 2018 года.

Ученый секретарь диссертационного совета, д.б.н. Горячева И.И

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования.

Важнейшие метаболические процессы в про- и эукариотических клетках требуют энергии распада АТФ. Энергозависимо практически любое биологическое событие, снижение уровня АТФ в клетке приводит к нарушению ее функционирования или гибели. Ключевым ферментом клеточного энергетического обмена является F_0F_1 -АТФ-синтаза (ЕС 3.6.1.34), этот комплекс присутствует на внутренней мембране митохондрий, мембране тилакоидов хлоропластов, цитоплазматической мембране растений.

F_0F_1 -АТФ-синтаза представляет собой мультисубъединичный фермент, состоящий из растворимой F_1 -части, катализирующей синтез АТФ из АДФ и неорганического фосфата и связанной с ней F_0 -части, погруженной в мембрану клетки. F_1 -часть F_0F_1 -АТФ-синтазы бактерий включает пять субъединиц: α , β , γ , δ и ϵ . F_0 -часть синтазы содержит три субъединицы: a, b и c. Структура большинства субъединиц F_0F_1 -АТФ-синтазы весьма консервативна. Универсальная природа F_0F_1 -АТФ-синтазы у живых организмов, включая бактерий и человека, ее роль биологического наномотора требует детальных исследований функционирования этого комплекса.

F_0F_1 -АТФ-синтаза является ферментом с бифункциональным каталитическим механизмом синтеза и гидролиза АТФ. Функционирование F_0F_1 -АТФ-синтазы регулируется сигнал-передающей системой, одним из элементов которой являются серин-треониновые протеинкиназы (СТПК). В последние годы F_0F_1 -АТФ-синтазы становятся объектом внимания как биомишень для создания лекарств, а также ключевым объектом исследований фундаментальных основ биоэнергетики. Активность АТФ-синтазы связана с различными заболеваниями человека: ее дисфункция наблюдается при опухолях, нейропатии, атаксии, некрозе, болезни Паркинсона, Альцгеймера, и других заболеваниях.

В литературе имеются единичные указания на фосфорилирование δ - и c-субъединиц в митохондриях. Фосфорилирование β -субъединицы выявлено в

условиях теплового стресса в хлоропластах риса, в изолированных миоцитах кролика при лечении аденозином. Показано, что каталитическая β -субъединица АТФ-синтазы фосфорилируется *in vivo* в митохондриях скелетной мышцы человека, это коррелирует с уровнем глюкозы и может способствовать патогенезу диабета типа 2.

Поэтому актуальной задачей является изучение фосфорилирования белков F_0F_1 -АТФ-синтазного комплекса, что позволит выявить новые аспекты функционирования F_0F_1 -АТФ-синтазного комплекса на стадии сборки, а также синтеза или гидролиза АТФ.

Способность некоторых субъединиц F_0F_1 -АТФ-синтазного комплекса к фосфорилированию может быть важна для дизайна ингибиторов этих ферментов. На основе ингибиторов F_0F_1 -АТФ-синтаз патогенных бактерий могут быть созданы новые биомишень-направленные лекарства. Известно, что F_0F_1 -АТФ-синтазы митохондрий человека, дрожжей, грибов более чувствительны к ингибиторам синтеза АТФ, а более устойчивыми являются бактерии, за исключением некоторых грамположительных бактерий, в первую очередь представители рода *Streptomyces*.

Степень разработанности темы исследования. Ранее было показано, что штаммы *Streptomyces*, различаются по уровню чувствительности к олигомицину А. Штамм *S. avermitilis* МА-4680 (продуцент олигомицина) устойчив к олигомицину А в концентрации >100 нмоль/мл или 1000 нмоль/диск, штамм *S. lividans* ТК24 является олигомицин-чувствительной моделью и устойчив в концентрации $>0,1$ нмоль/мл или 0.5 нмоль/диск. Ранее в лаборатории генетики микроорганизмов ИОГен РАН был охарактеризован штамм *S. fradiae* АТСС 19609 (продуцент тилозина), гиперчувствительный к олигомицину А (<0.001 нмоль/мл или 0.0005 нмоль/диск).

Изучение АТФ-азной активности в препаратах мембранных везикул штамма *S. fradiae* АТСС 19609 в присутствии олигомицина А и ингибиторов СТПК показало, что мембраносвязанные СТПК вовлечены в активацию АТФазной

функции F_0F_1 -АТФ-синтазы и защиту от антибиотика. Также было показано, что во фракции мембранных везикул актинобактерии *S. fradiae* ATCC 19609 содержатся, по крайней мере, две активные СТПК, которые могут фосфорилировать субъединиц F_0F_1 -АТФ-синтазы штамма *S. fradiae* ATCC 19609.

Антибиотики семейства олигомицинов являются классическими ингибиторами F_0F_1 -АТФ-синтазы человека и бактерий, и рассматриваются как потенциальные лекарственные препараты, однако их продвижение в качестве фармацевтических препаратов ограничивается высокой токсичностью. Впервые в НИИ по изысканию новых антибиотиков имени Г.Ф.Гаузе, был разработан ряд эффективных методов химической модификации и синтезировано более 30 полусинтетических производных олигомицина А.

Цель работы: Изучение кластера генов, кодирующего субъединицы F_0F_1 -АТФ-синтазы штамма *S. fradiae* ATCC 19609; анализ активности и функционирования данного комплекса.

Задачи исследования:

1. Характеристика субъединиц F_0F_1 АТФ-синтазы штамма *S. fradiae* ATCC 19609, сравнительный анализ аминокислотных последовательностей субъединиц с ортологами из белковой базы данных;
2. Получение рекомбинантных белков субъединиц F_0F_1 -АТФ-синтазы, изучение способности их к фосфорилированию суммарным препаратом СТПК *S. fradiae* ATCC 19609;
3. Протеомный анализ фосфорилированных белков субъединиц F_0F_1 -АТФ-синтазы во фракции мембранных везикул *S. fradiae* ATCC 19609;
4. Определение ингибирующего действия олигомицина А и его производных на активность F_0F_1 -АТФ-синтазы *S. fradiae* ATCC 19609

Научная новизна. В диссертационной работе определены нуклеотидные последовательности генов всех 8 субъединиц штамма *S. fradiae* ATCC 19609, осуществлено клонирование генов субъединиц в *E. coli* и получены рекомбинантные белки.

Впервые показано, что рекомбинантные белки γ -, β - α - и ϵ - субъединиц F_0F_1 -АТФ-синтазы *S. fradiae* ATCC 19609 фосфорилируются комплексом СТПК в составе клеточного экстракта. Впервые установлено, что во фракции мембранных везикул осуществляется фосфорилирование β - и ϵ -субъединиц F_0F_1 -АТФ-синтазного комплекса. В обоих типах экспериментов наблюдается фосфорилирование β -субъединицы.

Впервые тестированы 6 новых производных олигомицина А, модифицированных по макролактонному кольцу и по С33 положению, и выявлены производные, ингибирующее действие которых превышает действие олигомицина А на активность F_0F_1 -АТФ-синтазы *S. fradiae* ATCC 19609.

Теоретическая и практическая значимость работы. Объектом исследования диссертационной работы являлась F_0F_1 -АТФ-синтаза штамма *S. fradiae* ATCC 19609, гиперчувствительного к олигомицину А.

Штаммы *E. coli* BL21(DE3), содержащие плазмиды с клонированными генами субъединиц F_0F_1 -АТФ-синтазы, выделенные рекомбинантные белки и разработанные методы выделения белков могут быть использованы в научно-исследовательских работах с последующим потенциальным применением в области практической медицины.

Метод изучения ингибирующего влияния олигомицина А и его производных на синтез АТФ F_0F_1 -АТФ-синтазой инвертированных мембранных везикул *S. fradiae* ATCC 19609 может быть использован для предварительного отбора соединений – потенциальных лекарственных препаратов.

Апробация работы. Доклады по теме диссертации проводились на ежегодных отчетах аспирантов ИОГен РАН в 2009-2012 г. Стендовые доклады были представлены на итоговых конференциях за 2009-2010 г. в рамках приоритетного направления «Живые системы» ФЦП «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2007-2012 годы». Промежуточные результаты диссертационной работы были представлены на лабораторном семинаре 06 марта 2018 г.

Апробация диссертационной работы проведена 13 марта 2018 г. на межлабораторном семинаре ИОГен РАН.

Положения, выносимые на защиту:

1. Структура кластера и генетическое окружение F_0F_1 -АТФ-синтазного комплекса консервативны для актинобактерий рода *Streptomyces*.
2. Белки субъединиц F_0F_1 -АТФ-синтазы *S. fradiae* ATCC 19609 фосфорилируются серин-треониновыми протеинкиназами.
3. Структурные модификации олигомицина А по макролактонному кольцу и по С33-положению в различной степени влияют на ингибирование синтеза АТФ в везикулах *S. fradiae* ATCC 19609 по сравнению с уровнем ингибирования олигомицина А.

Личный вклад автора. Автор принимал личное участие на всех этапах выполнения работы: в планировании и осуществлении экспериментов, оценке и интерпретации результатов. Анализ фосфорилирования рекомбинантных субъединиц АТФ-синтазы проводили совместно с к.б.н. Елизаровым С.М. (Институт биохимии им. А.Н.Баха). Получение препаратов мембранных везикул и анализ их фосфорилирования, исследование *in vitro* АТФ-синтазной активности в препарате инвертированных мембранных везикул, ингибирование олигомицином А и его производными проводили совместно с к.б.н. Мавлетовой Д.А. Автор также являлся основным участником при написании статей по результатам работы.

Структура и объем диссертации. Диссертационная работа изложена на 145 страницах машинописного текста и включает введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты, обсуждение и выводы. Диссертация содержит 22 рисунка и 9 таблиц. Библиографический указатель содержит 197 источников.

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 2 статьи в журналах, соответствующих Перечню ВАК, 1 тезисы доклада на конференции.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Обзор литературы

В диссертационной работе глава «Обзор литературы» состоит из трех разделов.

Первый раздел посвящен общей характеристике F_0F_1 -АТФ-синтазного комплекса белков – классификации, эволюции, структуре, механизму действия, оперону бактерий, консервативности и вариабельности субъединиц, функциям и особенностям у *Streptomyces*.

Во втором разделе описаны механизмы и функции фосфорилирования белков эукариот и прокариот, а также фосфорилирование субъединиц F_0F_1 -АТФ-синтазы, играющие важную роль в регуляции функций фермента.

Третий раздел посвящен F_0F_1 -АТФ-синтазе бактерий как биомишени действия ингибитора – макролидного антибиотика олигомицина А. В данной главе описаны химические модификации олигомицина А, чувствительность грамположительных бактерий к олигомицину А и механизм действия олигомицина А на F_0F_1 -АТФ-синтазу бактерий.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Штаммы и условия культивирования. Штамм *S. fradiae* ATCC 19609 выращивали в жидкой среде YEME с 25% сахарозы при 28°C в течение 24 ч (логарифмическая фаза роста), мицелий собирали в течение 30 мин центрифугированием при 3000 g.

Штаммы *E. coli* DH5 α (F^- , Ф80 Δ lacZ Δ M15 Δ (lacZYA-argF) U169) фирмы «Promega» (США) и BL21(DE3) (F^- *dcm ompT hsdS*(r_B⁻m_B⁻) *gal* λ (DE3)) фирмы «Novagen» (США) выращивали на среде Лурия (L-бульон). Твердые среды содержали 2,0% агара, 150мкг/мл ампициллина.

Манипуляции с ДНК. Геномную ДНК штамма *S. fradiae* ATCC 19609 выделяли методом, изложенным в руководствах Кизер и др. Выделение плазмидной ДНК, приготовление компетентной культуры *E. coli*, трансформацию

и анализ рекомбинантных плазмид проводили с использованием стандартных методов Маниатис и др. В экспериментах по клонированию фрагментов ДНК и экспрессии генов всех субъединиц F_0F_1 -АТФ-синтазы использовали вектор pET32a («Novagen», США). Плазмидную ДНК выделяли методом щелочного лизиса, а также с использованием набора Plasmid Miniprep Kit («Fermentas», Литва). Выделение фрагментов ДНК из 1% агарозного геля проводили с помощью набора Gel Extraction Kit («Fermentas», Литва).

Аmplификацию (ПЦР) с геномной ДНК штамма *S. fradiae* ATCC 19609 проводили с использованием набора РСК-100 («Dialat Ltd.», Россия) на приборах РТС-0150 («MJ Research, Inc.», США) и Терцик ТП4-ПЦР01 («ДНК-технология», Россия). Для амплификации фрагментов ДНК всех субъединиц было сконструировано 16 олигонуклеотидов, гомологичных фланкирующим областям α -, ϵ -, β -, δ -, γ -, α -, γ -, β - и ϵ -субъединиц F_0F_1 -АТФ-синтаз, находящихся в базе данных NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) штаммов *S. coelicolor*, *S. lividans* и *S. avermitilis* с использованием программы NCBI/Primer-BLAST.

Олигонуклеотиды для клонирования были сконструированы на основании секвенирования амплифицированных нуклеотидных последовательностей субъединиц. Амплифицированные фрагменты, содержащие гены всех субъединиц, клонировали в экспрессионный вектор pET32a по сайтам эндонуклеаз рестрикции *EcoRI* и *HindIII*.

Анализ экспрессии генов F_0F_1 -АТФ-синтазы в системе *E. coli* BL21(DE3).

Клетки *E. coli* BL21(DE3), содержащие сконструированные плазмиды, выращивали на качалке в колбах с жидкой средой (L-бульон), содержащей ампициллин, при 37°C и 250 об/мин до оптической плотности 0,6 (~2 часа), экспрессию индуцировали добавлением 1,0 mM ИПТГ. Культивировали при +28°C в течение 1-4 ч, после чего клетки осаждали центрифугированием (5000 об/мин, 10 мин, +4°C) и замораживали при -20°C.

Для изучения экспрессии клетки ресуспендировали в 200-300 мкл К-фосфатного лизирующего буфера и 100-150 мкл Sample буфера, затем прогревали

при 95°C в течение 10 мин и анализировали с помощью SDS-электрофореза в 12.5% ПААГ по методу Лэммли. В качестве контроля использовали фракции белков штамма *E.coli* BL21(DE3), содержащего плазмиду pET32a без вставки.

Выделение рекомбинантных белков всех 8 субъединиц, клонированных в *E. coli*. Рекомбинантные белки выделяли методом металлоаффинной хроматографии на His-связывающих Ni-NTA колонках с помощью набора Ni-NTA Fast Start Kit (6) («Qiagen») в нативных условиях. Концентрацию выделенных белков определяли по методу Бредфорд.

Фосфорилирование субъединиц F₀F₁-АТФ-синтазы. Анализ фосфорилирования рекомбинантных субъединиц АТФ синтазы проводили в присутствии суммарного препарата СТПК *S. fradiae* ATCC 19609, полученного аффинной хроматографией на цибакрон-Сефарозе.

Фосфорилирование субъединиц проводили в 30 мкл буфера А, содержащего 50 mM Tris-HCl (pH 7,8), 100 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 5 mM β-меркаптоэтанол, 0,1 mM ФМСФ, 0,01%-ный Tween-20, 10%-ный глицерин. Вносили по 3 мкг рекомбинантных белков δ-, α-, γ-, β-, ε-, а-, с- или b-субъединиц и АТР до конечной концентрации 50 мкМ (содержащего 10 Бк/пмоль [γ-32P]-АТР, ИБХ им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН). Добавляли по 0,5 мкг СТПК и инкубировали в течение 10 мин при 28°C, реакцию останавливали добавлением 17 мкл буфера для приготовления образцов, прогревали 5 мин при 95°C. Образцы анализировали с помощью SDS-электрофореза в 12,5% ПААГ. Гели фиксировали в 50%-ной ТХУ, окрашивали 0,1% Кумасси R250 и экспонировали с рентгеновской пленкой.

Идентификация фосфорилированных белков во фракции мембранных везикул *S. fradiae* ATCC 19609.

Мицелий *S. fradiae* ATCC 19609 осаждали в течение 10 мин 7800 об/мин при +18°C, после чего производили трехкратную отмывку в 10 объемах 10 mM Tris-HCl, pH-7,5. Центрифугировали 15 мин 7800 об/мин при +18°C. Полученные осадки растворяли в буфере (10 объемов), содержащем: 50 mM Tris-HCl (pH 7,5),

10 mM MgCl₂, 10% глицерин, 1 mM PMSF, 0,5 mM DTT, коктейль ингибиторов протеаз («Promega», США), лизоцим 1 мг/мл. Инкубировали при постоянном перемешивании 30 мин +37 °С. Полученные протопласты разрушали озвучивание в УЗД Vibra Cell™ Ultrasonic Processor («Sonic», США): частота 20 кГц трижды по 30 с при 4°С. Клеточные обломки осаждали центрифугированием в течение 20 мин при 4°С и 10 000 g. Отобранный в стерильные пробирки супернатант центрифугировали 10 ч при +4°С и 100 000 g, ресуспендировали в том же буфере (без лизоцима) и повторно центрифугировали 16 ч при 4°С и 150 000 g. Полученные осадки растворяли в шести объемах буфера.

Фосфорилирование белков мембранных везикул проводили в течение 10 мин при 25°С в буфере, содержащем 25 mM Tris-HCl (pH 7,4), 5 mM MgCl₂, 5 mM MnCl₂, 1 mM DTT, 1 mM ЭДТА, 0,1 mM PMSF. Реакцию начинали добавлением АТФ до конечной концентрации 100 мкМ, содержащей 10–20 мкКи [γ -³²P]-АТФ (5000 Ки/мМ (186 ПБк/М)), ИБХ им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН), в присутствии 100 мкг белка везикул. Белки осаждали пятью объемами холодного ацетона, выдерживали 2 ч при –20°С, осадки собирали центрифугированием в течение 20 мин при 4°С и 20 000 g и растворяли в буфере, содержащем 8,5 М мочевины, 2%-ный Тритон X-100, 2,2% амфолиты, 5%-ный β -меркаптоэтанол, удаляли нерастворенные агрегаты центрифугированием, супернатант использовали для дальнейшего разделения методом 2D (двумерного) электрофореза.

Двумерный гель-электрофорез (SDS-PAGE). Проводили по методике О'Фарелла с небольшими модификациями. Подготовку образцов для масс-спектрометрии проводили по методике, рекомендованной фирмой «Promega», США (In Gel Digest Protocol), масс-спектры получены методом, рекомендованным фирмой «Bruker Daltonics» (США) на аналитическом масс-спектрометре Bruker Daltonics (UltrafleXtreme Maldi ToF/ToF Ms) («Bruker Daltonics GmbH», Германия) в отделе протеомных исследований НИИ биомедицинской химии им. В.Н.

Ореховича РАМН. Идентификацию белков осуществляли при помощи программы Mascot (www.matrixscience.com).

Получение препаратов инвертированных мембранных везикул *S. fradiae* для измерения АТФ-синтазной активности. Мицелий *S. fradiae* ATCC19609 осаждали в течение 10 мин 7800 об/мин при +18°C, после чего производили трехкратную отмывку в 10 объемах раствора, содержащего: 250 мМ сахарозу, 10 мМ Tris-HCl, pH-7,5, 1мМ PMSF. Центрифугировали 15 мин 7800 об/мин при +18°C. Полученные осадки растворяли в буфере (10 объемов), содержащем: 50мМ MOPS, 10 мМ MgCl₂, 10% глицерин, 1мг/мл лизоцим, 1мМ PMSF. Инкубировали при постоянном перемешивании 1 час +37 °С. Полученные протопласты разрушали озвучивание в УЗД Vibra Cell™ Ultrasonic Processor («Sonic», США): частота 20 кГц трижды (20 сек pulse/ 15 сек off, в ледяной бане). Центрифугировали 20 мин при +4°C и 14000 об/мин. Супернатант отбирали в 1,5 мл пробирки и центрифугировали 1 ч при +4°C и 280 000 g, ресуспендировали в буфере, содержащем: 50 мМ MOPS pH-7,5; 10 мМ MgCl₂; коктейль ингибиторов протеаз («Roche», Германия) и повторно центрифугировали 1 ч при +4°C и 280 000 g. Полученные осадки растворяли в буфере с добавлением глицерина до 10% (5 объемов). Замораживали в жидком азоте и хранили при -70°C.

Измерение АТФ-синтазной активности в препаратах инвертированных мембранных везикул *S. fradiae* ATCC 19609. Ингибирующее действие производных олигомицина А на F₀F₁-АТФ-синтазу в инвертированных мембранных везикулах *S. fradiae* ATCC19609 определяли по методике Koul A. et al. 2007 с небольшими модификациями. АТФ-синтазная активность определялась с использованием автоматизированной лабораторной рабочей станции Biomek 3000® («Beckman Coulter», США) и набора ATP bioluminescence Assay Kit HS II, («Sigma», США). Люминесцентный сигнал (RLU- relative light units) - измеряли, используя DTX 880 Multimode Detector («Beckman Coulter», США). Параметры измерения: время -1000 мс, чувствительность измерения – expected high activity.

Получение препаратов инвертированных мембранных везикул *S. fradiae* ATCC 19609 для измерения АТФ-синтазной активности. Мицелий *S. fradiae* ATCC19609 осаждали в течение 10 мин 7800 об/мин при +18°C, после чего производили трехкратную отмывку в 10 объемах раствора, содержащего: 250 мМ сахарозу, 10 мМ Tris-HCl, pH-7,5, 1мМ PMSF. Центрифугировали 15 мин 7800 об/мин при +18°C. Полученные осадки растворяли в буфере (10 объемов), содержащем: 50мМ MOPS, 10 мМ MgCl₂, 10% глицерин, 1мг/мл лизоцим, 1мМ PMSF. Инкубировали при постоянном перемешивании 1 час +37 °С. Полученные протопласты разрушали озвучивание в УЗД Vibra Cell™ Ultrasonic Processor («Sonics», США): частота 20 кГц трижды (20 сек pulse/ 15 сек off, в ледяной бане). Центрифугировали 20 мин при +4°C и 14000 об/мин. Супернатант отбирали в 1,5 мл пробирки и центрифугировали 1 ч при +4°C и 280 000 g, ресуспендировали в буфере, содержащем: 50 мМ MOPS pH-7,5; 10 мМ MgCl₂; коктейль ингибиторов протеаз («Roche», Германия) и повторно центрифугировали 1 ч при +4°C и 280 000 g. Полученные осадки растворяли в буфере с добавлением глицерина до 10% (5 объемов). Замораживали в жидком азоте и хранили при -70°C.

Измерение АТФ-синтазной активности в препаратах инвертированных мембранных везикул *S. fradiae* ATCC 19609. Определение ингибирующего действия производных олигомицина А на F₀F₁-АТФ-синтазу в инвертированных мембранных везикулах *S. fradiae* ATCC19609 проводили по методике Koul A. с небольшими модификациями.

Инвертированные мембранные везикулы *S. fradiae* ATCC 19609 разводили до конечной концентрации 50 мкг белка в 1 мл буфера, содержащего 50 мМ MOPS, pH-7,5, 10мМ MgCl₂, и предварительно инкубировали с контрольным ингибитором или с олигомицином А 10 мин при перемешивании (при комнатной температуре). Были использованы стандартные ингибиторы F₀F₁-АТФ-синтазы: N,N-Dicyclohexylcarbodiimide (DCCD, «Alfa Aesar», Великобритания), Олигомицин А (чистота 95% , получен в АНО «НИЦ «БИОАН», Россия). В качестве отрицательного контроля использовали Levofloxacin («Sigma», США). В

реакционную смесь вносили NADH до конечной концентрации 2,5 мМ и инкубировали при энергичном встряхивании 1 мин при комнатной температуре. Реакцию начинали добавлением АДФ до конечной концентрации 1 мМ и K_2HPO_4 до 10 мМ. Аликвоты реакционных смесей отбирали через 1, 10, 20, 40 и 60 мин инкубации и добавляли к 400 мкл ледяного раствора, содержащего 2 мМ ЭДТА, 1% ТХУ. Все дальнейшие манипуляции проводили с использованием автоматизированной лабораторной рабочей станции Biomek 3000® («Beckman Coulter», США). 5 мкл смеси добавляли к 100 мкл буфера, содержащего 100 мМ Tris-HOAc, 2 мМ ЭДТА, pH-7,75, и перемешивали в лунках 96-луночного планшета. Затем, в лунки вносили 50 мкл люциферазного реагента (ATP bioluminescence Assay Kit HS II, «Sigma», США). Люминесцентный сигнал (RLU - relative light units) - измеряли, используя DTX 880 Multimode Detector («Beckman Coulter», США). Параметры измерения: время –1000 мс, чувствительность измерения – expected high activity.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Определение нуклеотидных последовательностей генов субъединиц и структуры кластера F_0F_1 АТФ-синтазы штамма *S. fradiae* АТСС 19609.

Ранее была определена нуклеотидная последовательность генов оперона F_0F_1 - АТФ-синтазы штамма *Streptomyces lividans* ТК24. Оперон содержит девять генов, *atp1BEFHAGDC*, кодирующих восемь структурных компонентов комплекса АТФ-синтазы и I-белка, полипептида неизвестной функции.

Для определения нуклеотидных последовательностей генов всех субъединиц F_0F_1 - АТФ-синтазы штамма *S. fradiae* АТСС 19609 сконструировано 16 олигонуклеотидов по фланкирующим областям (95-100% идентичности) геномных ДНК АТФ-синтаз представленных в базе данных NCBI штаммов *S.coelicolor*, *S.lividans* и *S.vermitilis*.

Изоляцию генов субъединиц F_0F_1 -АТФ-синтазы осуществляли с геномной ДНК штамма *S. fradiae* АТСС 19609 методом ПЦР. Полученные фрагменты секвенированы, с использованием программы BLAST определяли стартовые

кодоны трансляции и терминирующие кодоны для всех субъединиц. Определена структура кластера F_0F_1 -АТФ-синтазы штамма *S. fradiae* ATCC 19609. Установлено, что кластер имеет стандартную структуру, гены субъединиц расположены в следующей последовательности: *atpI* (ген, кодирующий регуляторный белок AtpI), далее расположены гены *atpB*, *atpE*, *atpF*, *atpH*, *atpA*, *atpG*, *atpD*, *atpC*, кодирующие субъединицы α , δ , α , γ , β и ϵ (рис.1).

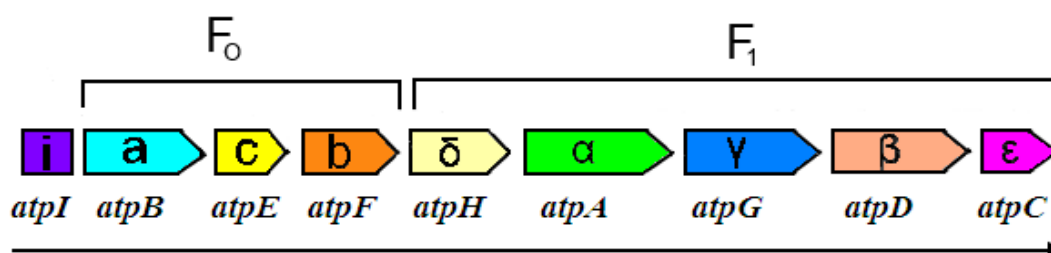


Рисунок 1. АТФ-синтаза штамма *S. fradiae* ATCC 19609 – структура кластера, кодирующего субъединицы.

I -белок, F_0 -часть (субъединицы α , δ и β) и F_1 -часть (субъединицы δ , α , γ , β , ϵ)

В лаборатории генетики микроорганизмов ИОГен РАН проведено секвенирование геномной ДНК штамма *S. fradiae* ATCC 19609, GenBank (JNAD000000000.1). Нуклеотидные последовательности всех аннотированных генов АТФ-синтазы ([NCBI PGAP](#)) совпали с ранее секвенированными.

Окружение генов F_0F_1 -АТФ-синтазы штамма *S. fradiae* ATCC 19609 полностью совпадает с окружениями, характерными для большинства штаммов рода *Streptomyces* (за исключением штамма *S. avermitilis* MA-4680), представленных в базе данных NCBI: со стороны 5'-конца хромосомы непосредственно перед кластером расположены гены тирозиновой фосфатазы и трансферазы, за кластером расположены ген секретлируемого белка и хитиназы (таблица 1). У штамма *S. avermitilis* MA-4680 перед кластером расположены гены синтеза олигомицина А – ингибитора F_0F_1 -АТФ-синтазы.

Таблица 1. Локализация генов F₀F₁-АТФ-синтазы на хромосоме *S. fradiae* ATCC 19609.

Название гена	Название белка, кодируемого данным геном	Locus_tag (идентификатор в базе данных)	Локализация гена
-	hypothetical protein SFRA_00840	SFRA_00840	198419 - 199066
-	protein tyrosine phosphatase	SFRA_00845	199063 - 199776
-	transferase	SFRA_00850	200207 - 201568
<i>atpI</i>	ATP synthase I	SFRA_00855	201884 - 202321
<i>atpB</i>	ATP synthase F ₀ F ₁ subunit A	SFRA_00860	202586 - 203407
<i>atpE</i>	ATP synthase subunit C	SFRA_00865	203478 - 203702
<i>atpF</i>	ATP synthase F ₀ F ₁ subunit B	SFRA_00870	203744 - 204301
<i>atpH</i>	ATP synthase F ₀ F ₁ subunit delta	SFRA_00875	204298 - 205113
<i>atpA</i>	ATP synthase F ₀ F ₁ subunit alpha	SFRA_00880	205233 - 206804
<i>atpG</i>	ATP synthase F ₀ F ₁ subunit gamma	SFRA_00885	206807 - 207724
<i>atpD</i>	ATP F ₀ F ₁ synthase subunit beta	SFRA_00890	207730 - 209184
<i>atpC</i>	ATP synthase subunit epsilon	SFRA_00895	209317 - 209694
-	hypothetical protein SFRA_00900	SFRA_00900	209820 - 210269
-	chitinase	SFRA_00905	210467 - 211732
-	hypothetical protein SFRA_00910	SFRA_00910	211970 - 212221

Сравнительный анализ аминокислотных последовательностей субъединиц F₀F₁-АТФ-синтазы с последовательностями субъединиц других видов *Streptomyces* показал, что для всех субъединиц, кроме с-субъединицы ближайшими гомологами являются субъединицы, АТФ-синтаз *S. albus* и *S. xinghaiensis*. Для с-субъединицы ближайшими гомологами являются субъединицы, АТФ-синтаз *S. ambofaciens*, *S. parvulus* и *S. subbrutilus*. Субъединицы α и β высоко консервативны. Менее консервативными являются δ- и γ-субъединицы. Процент идентичности субъединиц α и β у разных представителей актинобактерий, не ниже 54%, тогда как процент идентичности субъединицы γ и ε между разными представителями актинобактерий может быть равен 31%, а субъединицы δ 27%.

Получение рекомбинантных белков субъединиц F₀F₁-АТФ-синтазы *S. fradiae* ATCC 19609.

С этой целью проводили клонирование генов всех субъединиц в *E. coli*. Изоляцию генов 8 субъединиц осуществляли с геномной ДНК штамма *S. fradiae*

АТСС 19609 методом ПЦР с использованием олигонуклеотидов, гомологичных N- и C- концевым областям генов и содержащих сайты узнавания эндонуклеаз рестрикции *EcoRI* и *HindIII*.

Для клонирования был выбран экспрессионный вектор pET32a. Линкер pET32a содержит His-Tag и S-tag для выделения и очистки белков с помощью аффинной хроматографии и последовательность тиоредоксина Trx•Tag (109 аминокислот) в N-концевой области. Тиоредоксин восстанавливает дисульфидные связи в белках, способствуя формированию у них правильной третичной структуры. Данная генетическая конструкция обеспечивает высокий уровень синтеза и растворимость целевого белка в составе рекомбинантного белка тиоредоксин/целевой белок и способствует правильному формированию его структуры, что значительно облегчает процедуру очистки белков в растворимой форме.

Кроме того, гены *atpE* и *atpC*, кодирующие белки субъединиц ϵ и δ , имеют протяженность 225 и 378 п.н., расчетная молекулярная масса данных белков составляет 7,411 и 13,074 кДа соответственно. Данные гены при клонировании в плазмиды, не содержащие ген тиоредоксина, не экспрессировались в *E. coli*.

Полученные фрагменты ДНК клонированы по сайтам эндонуклеаз рестрикции *EcoRI* и *HindIII* в экспрессионный вектор pET32a. В результате клонирования генов α -, β -, γ -, δ -, ϵ -, ζ -, η - субъединиц получены гибридные плазмиды pET32a:*atpH*, pET32a:*atpA*, pET32a:*atpG*, pET32a:*atpD*, pET32a:*atpC*, pET32a:*atpB*, pET32a:*atpE* и pET32a:*atpF*.

Для изучения экспрессии генов 8 субъединиц в *E. coli* штамм BL21(DE3) трансформировали полученными гибридными плазмидами.

Для проверки экспрессии гена ϵ -субъединицы штамм *E. coli* BL21(DE3), содержащий плазмиду pET32a:*atpE*, выращивали в жидкой среде LB с индукцией ИПТГ в течение 1, 2 и 4 ч. В качестве контроля анализировали растворимую фракцию белков штамма BL21(DE3), содержащего плазмиду pET32a без вставки. При клонировании гена ϵ - субъединицы в клетках *E. coli* BL21(DE3) наблюдалась

дополнительная фракция белка с молекулярной массой 30 кДа. Эта величина соответствует расчетной молекулярной массе белка с-субъединицы в сумме с молекулярной массой белка всего линкера плазмиды pET32a, содержащей тиоредоксин. Установлено, что максимальный уровень экспрессии был достигнут при индукции ИПТГ в течение 4 ч (рис.2).

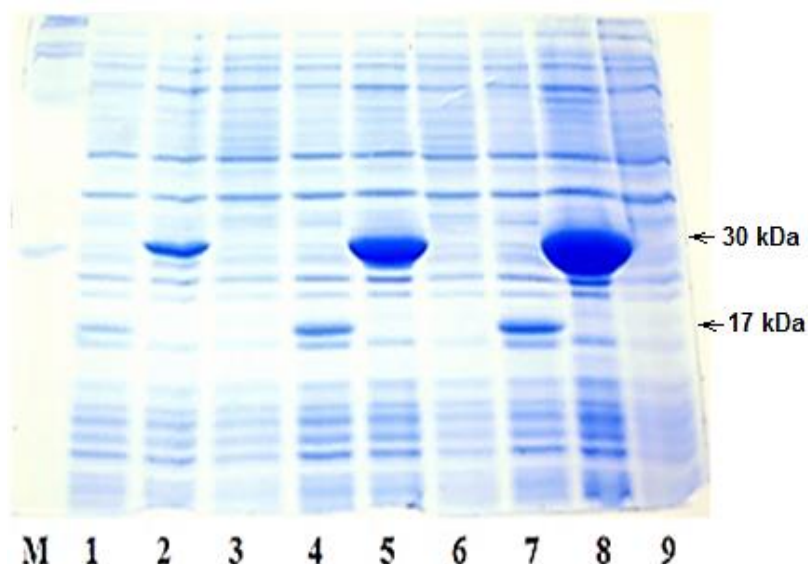


Рисунок 2. Электрофореграмма растворимой фракции белков штамма *E.coli* BL21(DE3), содержащего плазмиду pET32a с с-субъединицей.

М – белковый маркер; 1,2,3 - индукция ИПТГ в течение 1 ч; 4,5,6 - индукция ИПТГ в течение 2 ч; 7,8,9 - индукция ИПТГ в течение 4 ч.

1, 4, 7 – плаزمида pET32a; 2, 5, 8 - плазмида pET32a:*atpE* (с- субъединица); 3, 6, 9 - плазмида pET32a:*atpE* (с- субъединица - проба до индукции ИПТГ)

Для изучения экспрессии генов остальных субъединиц штамм *E. coli* BL21(DE3), содержащий плазмиды pET32a:*atpH*, pET32a:*atpA*, pET32a:*atpG*, pET32a:*atpD*, pET32a:*atpC*, pET32a:*atpB* и pET32a:*atpF*, выращивали в жидкой среде LB с индукцией ИПТГ в течение 4 ч. При клонировании δ-, α-, γ-, β-, ε-, а- и b-субъединиц в клетках *E. coli*, содержащих плазмиды с клонированными генами, наблюдались дополнительные фракции белков с соответствующими молекулярными массами 51, 80, 56, 75, 36, 53 и 43 кДа (рис. 3). Эти величины соответствуют расчетным молекулярным массам белков соответствующих субъединиц в сумме с молекулярной массой белка всего линкера плазмиды

pET32a, содержащей тиоредоксин. Уровень синтеза целевых белков δ -, α -, γ -, β -и ε - субъединиц составлял 40–50% от общего клеточного белка.

Биомассу, полученную из 150 мл культуры, осаждали центрифугированием, замораживали при -20°C и затем использовали для выделения белков.

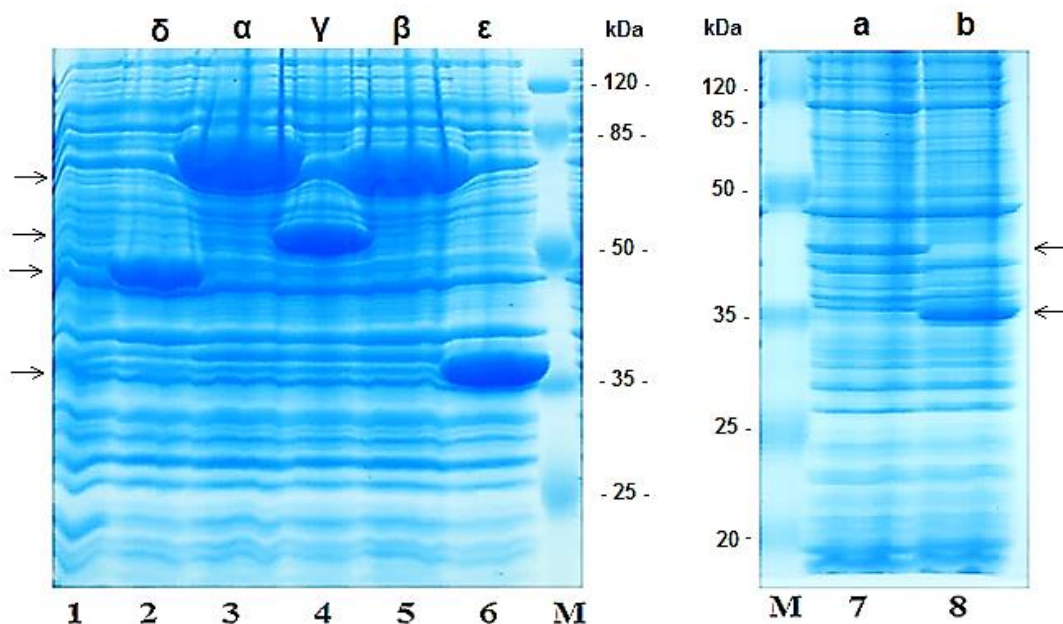


Рисунок 3. Электрофореграмма растворимой фракции белков штамма *E. coli* BL21(DE3), содержащих плазмиду pET32a с α -, β -, γ -, δ -, ε -, a- и b-субъединицами: 1–pET32a; 2 - pET32a:*atpH* (δ -субъединица); 3 - pET32a:*atpA* (α -субъединица); 4 - pET32a:*atpG* (γ -субъединица); 5 – pET32a:*atpD* (β -субъединица); 6 - pET32a:*atpC* (ε -субъединица «эпсилон»); M – белковый маркер; 7 – pET32a:*atpV* (a-субъединица); 8 – pET32a:*atpF* (b-субъединица).

Для последующего изучения фосфорилирования рекомбинантные белки всех 8 субъединиц, клонированных в *E. coli*, выделены в нативных условиях хроматографией на His-связывающих Ni-NTA колонках («Qiagen», Германия) согласно протоколу QIAexpress в препаративных количествах.

Изучение фосфорилирования рекомбинантных белков субъединиц

F₀F₁-АТФ-синтазы *S. fradiae* ATCC 19609 суммарным препаратом

СТПК *in vitro*.

Анализ фосфорилирования рекомбинантных белков субъединиц АТФ синтазы проводили в присутствии суммарного препарата протеинкиназ *S. fradiae*

АТСС 19609, полученного аффинной хроматографией на цибакрон-Сефарозе. Для того, чтобы исключить искажение результатов за счет эндогенного фосфорилирования, киназы предварительно инкубировали в присутствии немеченой АТФ.

Белки каждой из 8 субъединиц инкубировали с препаратом протеинкиназ *S. fradiae* АТСС 19609 и [γ - 32 P]-АТФ в буферном растворе, затем проводили электрофорез меченых белков в SDS-ПААГ (рис. 4, а). Включение радиоактивного фосфата в них определяли автордиографией (рис.4, б).

Из полученных результатов видно, что наблюдается включение меченого фосфата в белки с молекулярными массами 75 и 56 кДа, представляющие собой слитые с тиоредоксином β - и γ -субъединицы АТФ-синтазы соответственно. Удельное мечение γ -субъединицы примерно на порядок выше, чем β -субъединицы. Наблюдается небольшое включение метки в белки с молекулярными массами 80 и 36 кДа, представляющие собой α - и ε -субъединицы. Включение меченого фосфата в другие субъединицы F_0 - и F_1 -части АТФ-синтазы (а, б, с и д) не обнаружено. Отсутствие включения также указывает на то, что в полученных рекомбинантных гибридных белках, слитых с тиоредоксином α -, β -, γ - и ε -субъединиц, модифицируются именно субъединицы АТФ-синтазы, а не тиоредоксин.

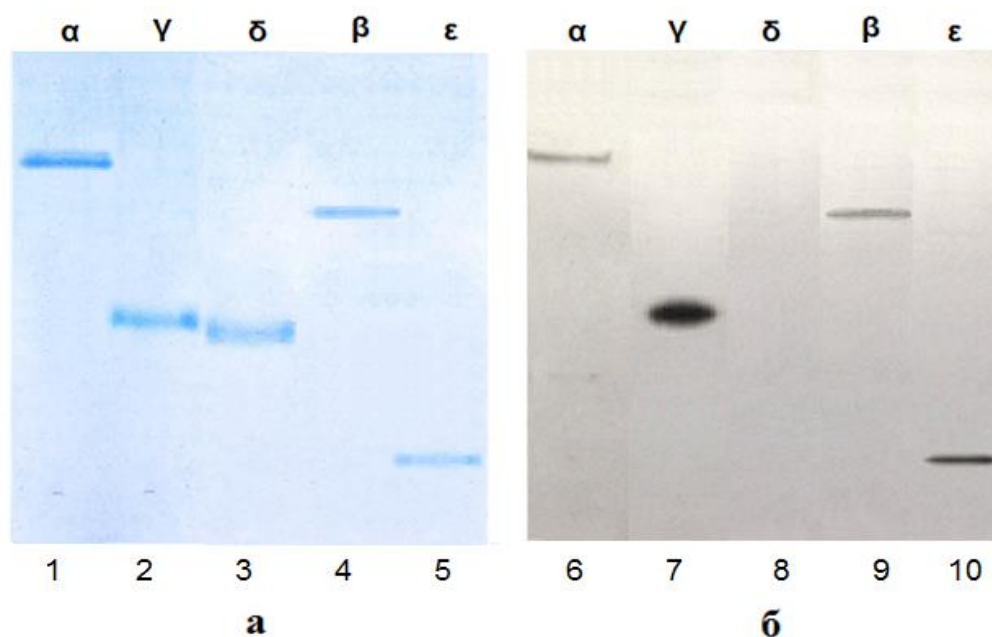


Рис. 4. *a* – Электрофореграмма гелей после электрофореза рекомбинантных субъединиц α (1), γ (2), δ (3), β (4), ϵ (5); *б* – автордиограф фосфорилированных субъединиц α (6), γ (7), δ (8), β (9), ϵ (10) F_0F_1 -АТФ-синтазы *S. fradiae* ATCC 19609.

Таким образом, в настоящей работе впервые показано, что α -, β -, γ - и ϵ -субъединицы F_0F_1 -АТФ-синтазного комплекса актиномицетов могут фосфорилироваться эндогенными СТПК.

Идентификация фосфорилированных белков во фракции мембранных везикул *S. fradiae* ATCC 19609.

С целью идентификации фосфорилированных белков были оптимизированы условия выделения белков мембранных везикул *S. fradiae* ATCC 19609, содержащих F_0F_1 -АТФ-синтазу.

Белки фракции мембранных везикул были фосфорилированы *in vitro* с использованием $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-АТФ}$. Фосфорилированные белки разделены методом двумерного электрофореза (рис. 5).

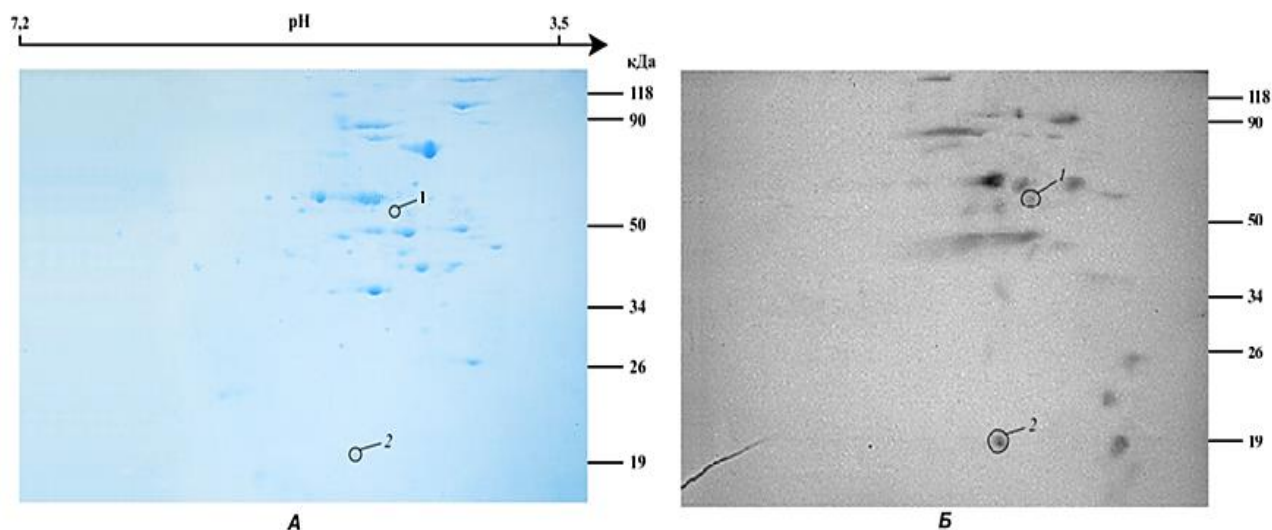


Рисунок 5. 2D SDS-PAGE белков мембранных везикул *S. fradiae* ATCC 19609. *а* – Электрофореграмма геля, окрашенного Кумасси G250. *б* – автордиограмма. Масс-спектрометрическая идентификация отмеченных полипептидов: 1 – F₁-часть АТФ-синтазы, субъединица β; 2 – F₀-часть АТФ-синтазы, субъединица b.

С помощью масс-спектрометрического анализа идентифицированы белки, молекулярная масса которых, совпадает с молекулярной массой белков субъединиц F₀F₁-АТФ-синтазы. Выявлено два белка, идентичных β-субъединице F₁-части и b-субъединице F₀-части F₀F₁-АТФ-синтазы. Отсутствие γ-субъединицы в препаратах может объясняться ее селективной потерей в ходе приготовления препаратов к электрофорезу. Другие идентифицированные белки могут быть связаны с функционированием F₀F₁-АТФ-синтазы (данные представлены в диссертационной работе).

Определение ингибирующего действия олигомицина А и его производных на активность F₀F₁-АТФ-синтазы *Streptomyces fradiae* ATCC 19609

Определено ингибирующее действие олигомицина А на F₀F₁-АТФ-синтазу в препаратах инвертированных мембранных везикул (imv) *S. fradiae* ATCC1960, по методике, опубликованной Ватлиным А.А. Для модуляции клеточных процессов и активации мембран, образования протонного градиента, использовали восстановленный НАД (НАДН/NADH). В качестве положительного контроля использовался классический ингибитор F₀F₁-АТФ-

синтазы - N, N-дициклогексилкарбодиимид (DCCD), который, как известно, связывается с с-субъединицей F_0 – части. Модификация с-субъединицы блокирует протонную транслокацию в F_0 - и связанную с гидролизом активность АТФ в F_1 – части. В качестве отрицательного контроля выбран левофлоксацин (lfx), конечная концентрация DCCD и lfx составляла 100 мкМ. Было проведено сравнение ингибирующего действия дициклогексилкарбодиимида (DCCD) и олигомицина А (olgA) на F_0F_1 - АТФ-синтазу *S.fradiae* ATCC19609, результаты представлены на рисунке 6.

Ингибирующее влияние DCCD (100мкМ) на 10 минуте прохождения ферментативной реакции составило 61%, а далее на 20-60мин снижалось до 54-57%. Олигомицин А (olgA) (100мкМ) частично ингибирует АТФ-синтазную активность в среднем на 31%, что приблизительно в 2 раза ниже степени ингибирования DCCD (100мкМ) на протяжении всего эксперимента (1-60 мин.). Таким образом, DCCD может использоваться как положительный контроль для поставленной ферментативной реакции.

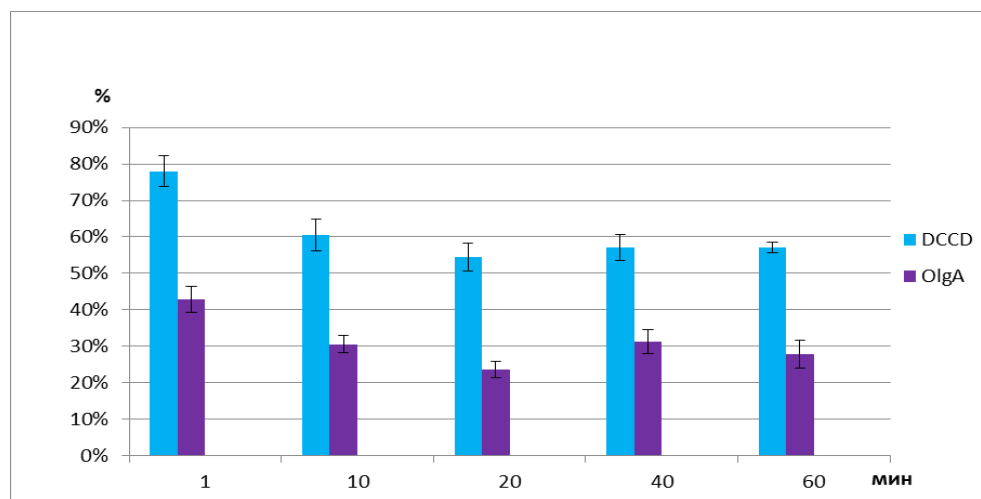
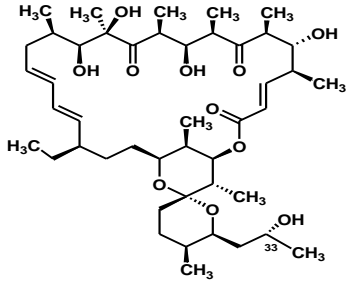
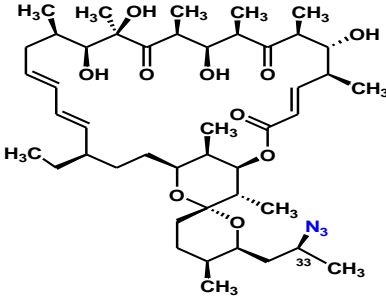
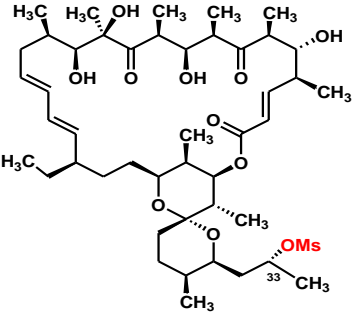
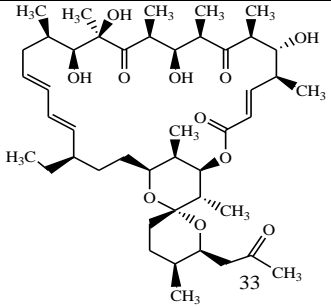
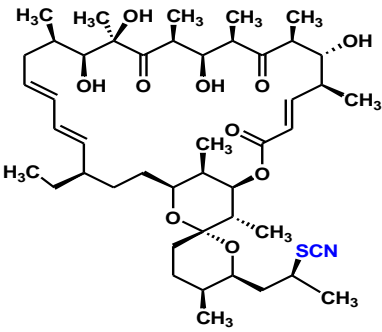
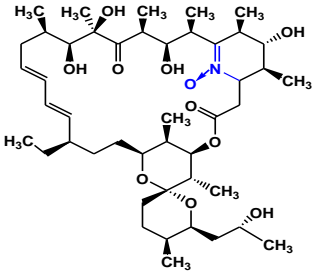
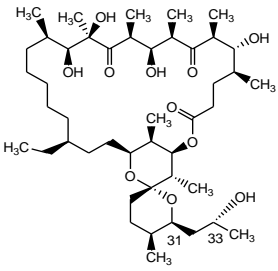


Рисунок 6. Ингибирование АТФ-синтазной активности F_0F_1 -АТФ-синтазы в препаратах инвертированных мембранных везикул *S.fradiae* ATCC 19609, предобработанных левофлоксацином (lfx, 100мкМ), дициклогексилкарбодиимидом (DCCD, 100 мкМ) и олигомицином А (olgA, 100 мкМ). На вертикальной оси: процент ингибирования (%), на горизонтальной: интервалы времени в минутах (мин).

Из литературных источников известно, что олигомицин по С33-положению связывается с с-кольцом АТФ-синтазы, блокируя транслокацию протонов, перекрывая доступ к основному карбоксилу, а также образует водородные связи по макролактонному кольцу. В Институте по изысканию новых антибиотиков имени Г.Ф.Гаузе были синтезированы производные олигомицина А, содержащие модификации по с33-положению и по макролактонному кольцу. Было изучено влияния олигомицина А и его производных (Olg1, Olg 2,Olg 3,Olg 4, Olg 17, Olg 18) на синтез АТФ в препаратах инвертированных мембранных везикул *S. fradiae* АТСС 19609, данные приведены в таблице 2.

Таблица 2. Определение ингибирующего действия производных олигомицина А на F₀F₁-АТФ-синтазу *S.fradiae* АТСС 19609.

Название вещества	Структурная формула	Ингибирование
Олигомицин А Olg А		31±2,5%
(33S)-азид-33- дезоксиолигомицин А Olg 2		53±7,4%

<p>33-O- мезилолигомицин Olg 3</p>		<p>40±4,5%</p>
<p>33-дегидро- олигомицин Olg18 LСТА-2642</p>		<p>15±2,6%</p>
<p>(33S)-33-дезокси-33- тиоцианатоолигоми- цин А Olg 4</p>		<p>14±6,4%</p>
<p>Нитрон-олигомицин Olg 1</p>		<p>0%</p>
<p>Пергидро- олигомицин Olg 17 LСТА-2644</p>		<p>0%</p>

Полученные данные позволяют судить о связи между структурой и активностью производных олигомицина А в отношении F_0F_1 -АТФ-синтазы. Производные, модифицированные по С33-положению проявляли различную активность:

- ингибирующее действие азидоолигомицина (Olg 2), мезилоолигомицина (Olg 3) превышает действие олигомицина А, приблизительно в 1,5 раз;
- дегидроолигомицин (Olg18), тиоцианатоолигомицин А (Olg 4) проявляли сниженную активность по сравнению с олигомицином А, приблизительно в 2 раза;
- нитрон-олигомицин (Olg 1), пергидро-олигомицин (Olg 17), модифицированный по макролактонному кольцу не оказывали влияния на F_0F_1 -АТФ-синтазу.

Т.о. были найдены производные, ингибирующая активность которых в несколько раз превышала активность олигомицина А, в дальнейшем они могут использоваться, как наиболее эффективный инструмент для исследований комплекса. Показано, что модификации по макролактонному кольцу приводят к нарушению связывания АТФ-синтазы и олигомицина, что позволяет делать выводы о структурном взаимодействии ингибитора с F_0F_1 -АТФ-синтазой.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате работы определены нуклеотидные последовательности генов субъединиц и структура кластера F_0F_1 -АТФ-синтазы штамма *S. fradiae* ATCC 19609, разработаны эффективные подходы для экспрессии генов в *E.coli* и очистки рекомбинантных белков 8 субъединиц F_0F_1 -АТФ-синтазы *S. fradiae*.

Впервые показано фосфорилирование ν -, γ -, β - α - и ε - субъединиц F_0F_1 -АТФ-синтазы *S. fradiae* ATCC 19609.

Определено ингибирующее действие олигомицина А и 6 его полусинтетических производных на активность F_0F_1 -АТФ-синтазы *S. fradiae* ATCC 19609.

ВЫВОДЫ

1. Установлено, что кластер генов F_0F_1 -АТФ-синтазы штамма *S. fradiae* АТСС 19609 имеет консервативную структуру, характерную для рода *Streptomyces*. Внутри рода *Streptomyces* наиболее консервативными являются субъединицы α , β , b и c более 83% идентичности аминокислотных последовательностей, менее консервативными являются субъединицы γ , δ , ϵ , и a более 72% идентичности аминокислотных последовательностей.
2. Рекombинантные белки γ -, β - α - и ϵ -субъединиц F_1 -части F_0F_1 -АТФ-синтазы *S. fradiae* АТСС 19609 фосфорилируются суммарным препаратом серинтреониновых протеинкиназ в составе клеточного экстракта.
3. Субъединицы β и b F_0F_1 -АТФ-синтазного комплекса фосфорилируются во фракции мембранных везикул.
4. Производные олигомицина А, модифицированные по макролактонному кольцу и по С33-положению в разной степени влияют на ингибирование синтеза АТФ, наибольшую активность проявляет (33S)-азид-33-дезоксидолигомицин А (Olg 2), которая превышает активность олигомицина А в 1,7 раз.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в журналах, соответствующих Перечню ВАК:

1. Беккер О.Б., Мавлетова Д.А., Любимова И.К., **Мирончева Т.А.**, Штиль А.А., Даниленко В.Н. Индукция программированного лизиса культуры *Streptomyces lividans* ингибиторами серин-треониновых протеинкиназ эукариотического типа / Микробиология. 2012. Т.81. №2. С.177-184.
2. Алексеева М.Г., **Мирончева Т.А.**, Мавлетова Д.А., Елизаров С.М., Захаревич Н.В., Даниленко В.Н. Биохимическая и структурная характеристика F₀F₁-АТФ-синтазы *Streptomyces fradiae* ATCC 19609/ Биохимия, 2015, № 3, С. 358-373

Публикации в тезисах научных конференций:

Nezametdinova V.Z., Alekseeva M.G., **Mironcheva T.A.**, Danilenko V.N. Structural and Functional Characterization of Eukaryotic Type Serin-Treonin Protein Kinases in the *Bifidobacterium longum* B379M Strain. //Abstracts 2nd International Congress-Partnering & Exhibition on Biotechnology and Bioenergy. World Trade Center, Moscow, Russia. April 13-15, 2010. P 326.