

На правах рукописи

Новотоцкая-Власова Ксения Александровна

**Холодоактивные липолитические ферменты психротрофных микроорганизмов,
выделенных из многолетнемерзлых осадков**

Специальность 03.02.03 – микробиология

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Пушино – 2015

Работа выполнена в лаборатории криологии почв Федерального государственного бюджетного учреждения науки институт физико-химических и биологических проблем почвоведения Российской академии наук (ИФХБПП РАН).

Научные руководители:

Гиличинский Давид Абрамович, доктор геолого-минералогических наук, заведующий лабораторией криологии почв Федерального государственного бюджетного учреждения науки институт физико-химических и биологических проблем почвоведения Российской академии наук (ИФХБПП РАН);

Петровская Лада Евгеньевна, кандидат химических наук, старший научный сотрудник лаборатории инженерии белка Федерального государственного бюджетного учреждения науки институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук (ИБХ РАН).

Официальные оппоненты:

Петрова Майя Александровна, доктор биологических наук, заведующая сектором анализа и хранения микроорганизмов лаборатории молекулярной генетики микроорганизмов Федерального государственного бюджетного учреждения науки институт молекулярной генетики Российской академии наук (ИМГ РАН);

Пименов Николай Викторович, доктор биологических наук, руководитель лаборатории реликтовых микробных сообществ Федерального государственного бюджетного учреждения науки институт микробиологии им. С.Н. Виноградского Российской академии наук (ИНМИ РАН).

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки институт экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения Российской академии наук (ИЭГМ УрО РАН).

Защита диссертации состоится «__» _____ 2015г. в _____ на заседании диссертационного совета Д 002.121.01 при ИБФМ РАН по адресу: 142290, Московская обл., г.Пушино, пр. Науки, 5, ИБФМ РАН

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ИБФМ РАН.

Автореферат размещен на сайтах <http://vak.ed.gov.ru> и <http://ibpm.ru>

Автореферат диссертации разослан «__» _____ 2015г.

Ученый секретарь

диссертационного совета

доктор биологических наук _____ Т.В. Кулаковская

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Вечная мерзлота представляет собой грунты и осадочные породы, находящиеся по меньшей мере два года при температуре 0 °С и ниже. В общей сложности она занимает около 26% поверхности Земли и более 50% территории России. Для этой среды характерны уникальные условия, в частности, отрицательная в течение геологически длительных периодов температура, низкая активность воды, слабая доступность органических веществ, минимальная скорость диффузии и длительное воздействие гамма-радиации от минералов вмещающих пород (Gilichinsky, 2002). Сотрудниками лаборатории криологии почв ИФХБП РАН установлено, что вечномерзлые отложения Арктики и Антарктики содержат значительное количество микроорганизмов, проявляющих метаболическую активность при температурах до -17°С (Rivkina et al., 2000). В ходе проведенных исследований были выделены и описаны многие микроорганизмы – бактерии в том числе актиномицеты и цианобактерии, зеленые водоросли, археи, дрожжи и микромицеты, протисты, выживающие при длительном хранении в вечномерзлых грунтах (Карасев и др., 1998; Вайнштейн и др., 1995; Vishnivetskaya et al., 2001 Rivkina et al., 2007; Golubev, 1998; Ozerskaya et al., 2004; Шатилович и др., 2010 и др.).

В частности, из вечномерзлых отложений различного возраста выделены и описаны бактерии *Exiguobacterium sibiricum* (Rodrigues et al., 2006), *Psychrobacter arcticus* и *P. cryohalolentis* (Bakermans et al., 2006), *P. muriicola* (Щербакова и др., 2009), *Celerinatantimonas yamalensis*, *Clostridium algariphilum*, *Methanobacterium arcticum* (Shcherbakova et al., 2005; 2011; 2013), *M. veterum* (Krivushin et al., 2010), которые сохранили жизнеспособность и обладали способностью к росту в широком диапазоне температур (от -5 до +40 °С) после криоконсервации на протяжении геологического времени до 3-х миллионов лет. Для выяснения механизмов выживаемости микроорганизмов в вечномерзлых породах необходимо установить, каким образом их клетки обеспечивают активный метаболизм и размножение в широком температурном диапазоне, а также поддержание жизнедеятельности при длительном нахождении при отрицательных температурах. Решение этой фундаментальной проблемы на молекулярном уровне способствует углубленному пониманию механизмов адаптации микроорганизмов к условиям вечной мерзлоты, а также определению возможных пространственных и временных границ существования жизни не только на Земле, но и на других планетах и космических телах криогенного типа.

В результате секвенирования геномов бактерий *P. arcticus* и *P. cryohalolentis*, а также последующего транскриптомного и протеомного анализа установлено наличие различных механизмов адаптации к низкотемпературным условиям существования, включая изменение текучести мембран за счет повышения доли ненасыщенных жирных кислот в липидах, увеличение синтеза осмолитов и веществ с антиоксидантной активностью, и других. Одним из таких механизмов является синтез ферментов, обладающих высокой каталитической активностью при низких температурах, в том числе липолитических.

Учитывая вышесказанное, основной целью данной работы являлся поиск специфических особенностей ферментов микроорганизмов из вечной мерзлоты, обеспечивающих их адаптацию к экстремальным условиям существования, на примере липолитических ферментов.

Цель и задачи исследования. Целью нашей работы было получение и изучение холодоактивных липаз из микроорганизмов, выделенных из экосистем многолетнемерзлых отложений.

Для достижения цели решались следующие задачи:

1. Выявление жизнеспособных бактерий в составе микробных сообществ низкотемпературных рассолов (криопэггов), обладающих липолитической активностью и создание коллекции психрофильных и галофильных микроорганизмов, обладающих липолитической активностью.

2. Изучение морфологических характеристик выделенных штаммов, определение их таксономического положения.
3. Поиск в геноме *P. cryohalolentis* K5^T генов белков-гомологов липаз родственных микроорганизмов, амплификация этих генов, клонирование их и экспрессия в *E. coli*
4. Очистка и характеристика целевых белков.

Научная новизна работы. Впервые проведена оценка наличия липолитической активности у микроорганизмов, выделенных из отрицательнотемпературных рассолов (криопэггов) в вечной мерзлоте. Выделены и частично охарактеризованы чистые культуры бактерий, обладающих липолитической активностью. Впервые выделены и изучены липолитические ферменты психроактивной бактерии *P. cryohalolentis* K5^T, выделенной из арктического криопэга. Показано, что выделенные липолитические ферменты EstPc, Lip1Pc и Lip2Pc являются холодоактивными и обладают рядом уникальных свойств.

Практическое значение. Полученные липолитические ферменты могут быть использованы в пищевой промышленности, в легкой промышленности, в тонком химическом синтезе и при биоремедиации сточных вод и почв.

Обычно продуцентами холодоактивных ферментов являются микроорганизмы - психрофилы, чей температурный оптимум лежит ниже 15°C. Исследователи этих ферментов часто сталкиваются с проблемой их нестабильности при более высоких температурах.

Результаты наших исследований показали, что ферменты EstPc и Lip2Pc обладают не только высокой активностью при низких температурах, но и повышенной термостабильностью при относительно высоких температурах, что делает их перспективными для применения в различных областях промышленности.

Апробация работы. Основные положения работы доложены на Международной конференции по мерзлотной микробиологии MicroPermWorkshop (Потсдам, Германия, 2010), 15-ой, 17-ой Пушкинских конференциях молодых ученых «Биология-наука 21-го века» (2011, 2013), Всероссийских Молодежных школах-конференциях «Актуальные аспекты современной микробиологии» (Москва, 2011, 2012), Международной научно-практической конференции «Постгеномные методы анализа в биологии, лабораторной и клинической медицине» (Новосибирск, 2011), Всероссийском симпозиуме «Биологически активные вещества микроорганизмов: прошлое, настоящее, будущее» (Москва, 2011), Международной конференции "EarthCryology: XXI Century" (Пушино, 2013), 10-ый международный конгресс "Экстремофилы (Санкт-Петербург, 2014), а также на ежегодных отчетах научных лабораторий ИФХиБПП РАН (2010-2014).

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 19 работ, в том числе в рецензируемых журналах, рекомендуемых ВАК - 2, в зарубежных рецензируемых журналах - 2, патент на изобретение РФ - 1 и 14 тезисов международных конференций.

Структура и объем работы. Диссертация изложена на 171 странице и состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов, результатов и обсуждения, выводов и списка литературы, включающего 283 ссылки, из которых 267 на иностранном языке, содержит 30 таблицы и 42 рисунка.

Благодарности. Работа выполнялась в лаборатории криологии почв Федерального государственного бюджетного учреждения науки институт физико-химических и биологических проблем почвоведения Российской академии наук (ИФХБПП РАН). Ряд экспериментов проведены в лаборатории инженерии белка Федерального государственного бюджетного учреждения науки институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН (ИБХ РАН).

Автор искренне благодарен сотрудникам, способствовавшим выполнению данной диссертационной работы, зав. лабораторией криологии почв, к.г.-м.н. Ривкиной Е.М. и с.н.с Спириной Е.В. (ИФХБПП РАН) за конструктивную критику и за помощь в планировании экспериментов. Особую благодарность я выражаю сотрудникам лаборатории инженерии белка ИБХ РАН к.б.н. Шингаровой Л.Н., Крюковой Е.А., Болдыревой Е.Ф. за помощь в освоении новых методов и проведении экспериментов. Я приношу свои благодарности сотрудникам лаборатории анаэробных микроорганизмов ИБФМ РАН зав. лаб., к.б.н В.А. Щербаковой и м.н.с Я.В. Рыжмановой за помощь в интерпретации результатов исследований.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объектами исследования служили образцы **криопэггов**, отобранные в результате экспедиций на запад центральной части **полуострова Ямал** (70°29'00" с. ш., 68°00'00" в.д.) (образцы №1, 2, 3), на **Аляску** в район мыса Барроу (71°18'64" с.ш., 156°39'3" з.д.) (образец №4), в тундровую зону **Колымской низменности** в район озера Якутское (69°50'с.ш., 159°30'в.д.) (образцы №5, 6), а также **накопительные и чистые культуры** бактерий, выделенные из этих образцов.

Отбор проб воды из скважин, вскрывающих криопэги, осуществляли с помощью гидрохимического батометра ПЭ 1105 в стерильные емкости.

Учет **общей численности** микроорганизмов проводили методом флуоресцентной микроскопии (Axiostar Plus, Zeiss, 100x Plan-NEOFLUAR, масляная иммерсия), окрашивая препараты флуорохромом Акридином оранжевым (Звягинцев, 1991).

Учет **численности культивируемых микроорганизмов и выделение чистых культур** проводили при посеве культур на твердые питательные среды R2A и 1/2 TSB с различным содержанием NaCl.

Морфологию клеток определяли при помощи светового микроскопа Zeiss Axiostar plus, а так же методами флуоресцентной микроскопии, окрашивая клетки флуорохромом DAPI (Sigma). Грам-принадлежность определяли с помощью 3% раствора КОН (Добровольская и др., 1989).

Определение наличия **липолитической активности** у выделенных штаммов микроорганизмов и *P. cryohalolentis* определяли методами, описанными ранее (Hasan et al., 2009), по появлению флюоресцирующего окрашивания штриха на чашках, содержащих родамин В (среда АСР) и появлению гало на чашках с трибутирином (среда АСТ).

Геномную ДНК выделяли с использованием наборов UltraClean® Soil DNA Isolation Kit и UltraClean® Microbial DNA Isolation Kit (Mobio, США).

Нуклеотидный состав исследовали методом термической денатурации ДНК на спектрофотометре Beckman Coulter DU800 (Великобритания).

Аmplификацию гена 16S рНК проводили при помощи набора реактивов Encyclo PCR kit (Евроген, Россия) с универсальными бактериальными праймерами (27F и 1492R).

Секвенирование гена 16S рНК проводили в компании Eurogen (Россия) на секвенаторе Applied Biosystem 3730 XL DNA Analyzer.

Анализ полученных последовательностей проводили в программе Clustal_X, (Thompson et al., 1997), На основе нуклеотидных последовательностей фрагментов гена 16S rRNA с использованием пакета программ MEGA 6 (Tamura et al., 2013) была построена филогенетическая дендрограмма с применением методов поиска ближайших соседей ("neighbour-joining") (Saitou & Nei, 1987) и "minimum evolution" (Rzhetsky & Nei 1992).

Для **амплификации генов липолитических ферментов** *P. cryohalolentis* использовали праймеры, разработанные автором: EstPcF; EstPcR; Lip1PcF; Lip1PcR; ND1F; ND2F; ND3F; ND4F; ND5F; ND5R; Lip2PcF; Lip2PcR; LifPcd23F; LifPcd62F и LifPcR.

Для **получения рекомбинантных белков** была разработана система экспрессии их генов в клетках *E. coli*.

Для **очистки белков** была использована Ni-аффинная хроматография.

Характеристику липолитических свойств **белков** проводили спектрофотометрическим методом с использованием в качестве субстрата *n*-нитрофениловых эфиров жирных кислот в качестве субстрата (Wahler and Reymond, 2001). Были исследованы удельная и субстратная специфичности белков, активность в зависимости от pH и температуры, стабильность при различной температуре и в присутствии различных метал-ионов, детергентов и органических растворителей.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

1 Криопэги как источник продуцентов холодоактивных липолитических ферментов

С целью обнаружения продуцентов холодоактивных липолитических ферментов в образцах криопэгов Колымской низменности, п-ова Ямал и Аляски нами были использованы как традиционный микробиологический подход, включающий выделение в чистую культуру отдельных представителей микробных сообществ, обладающих соответствующей активностью, так и современные генноинженерные и биоинформационные методы. В результате применения этих подходов из образцов криопэгов выделены и частично охарактеризованы культуры аэробных галофильных микроорганизмов – продуцентов липолитических ферментов.

1.1 Микробиологическая характеристика исследуемых криопэгов

Изучение микробных сообществ аэробных психрофильно-галофильных микроорганизмов в указанных образцах показало, что наименьшее количество клеток (до 10^4 кл/мл) было выявлено в образце криопэгов Аляски (Табл. 1). Это может быть связано с гранулометрическим составом вмещающих криопэги многолетнемерзлых пород и с содержанием в них льда.

При высеве из проб воды из криопэгов, культивировавшихся в накопительных культурах при 4 и 20°C на жидких питательных средах с содержанием NaCl 100 и 150 г/л, и из оригинальных образцов на агаризованные среды (1/2 TSB и R2A с содержанием NaCl 100, 150, 200 и 250 г/л) было выделено около 140 штаммов аэробных галофильных микроорганизмов. Однако около 2/3 штаммов галофильных бактерий было утрачено из-за их неспособности давать рост при пересевах. Из чистых культур, выделенных в ходе предварительных экспериментов, была создана рабочая коллекция, содержащая 44 штамма микроорганизмов способных к росту при высоких концентрациях NaCl и низких температурах.

Таблица 1. Результаты количественного учета и липолитического скрининга микроорганизмов.

| Общий счет, кл/мл | Количество штаммов, высеянных на твердые среды с NaCl | Количество чистых культур способных к росту при низких температурах | Количество штаммов, обладающих липолитической активностью |
|--|---|---|---|
| Полуостров Ямал, образцы №1-3 | | | |
| 2×10^6 | 72 | 25 | 12 |
| Полуостров Аляска, образец №4 | | | |
| 1×10^4 | 47 | 13 | 7 |
| Колымская низменность, образцы №5-6 | | | |
| $1,5 \times 10^6$ | 24 | 5 | 1 |

1.2 Скрининг на наличие липолитической активности у выделенных бактерий

Для выявления среди выделенных штаммов микроорганизмов с липолитической активностью изучали рост бактерий на средах с субстратами, имеющими различную длину углеводородной цепи, - трибутирином (C₄) и оливковым маслом (C₁₈). Для оценки влияния NaCl на активность ферментов реакцию проводили как в присутствии в среде соли, так и без нее.

Было показано, что липазной активностью обладают 20 штаммов из 44, причем 8 из них проявили способность утилизировать в качестве субстрата как трибутирин, так и оливковое масло, а 5 штаммов использовали только трибутирин, и 7 штаммов - только оливковое масло. Эти результаты свидетельствовали о том, что выделенные микроорганизмы обладают различным набором липолитических ферментов и способны утилизировать субстраты с различной длиной углеводородной цепи. При этом нами не было выявлено корреляции между наличием липолитической активности у микроорганизма и повышенным содержанием NaCl в среде для скрининга. Наибольшее число штаммов, обладающих липолитической активностью, было выделено из криопэгов образцов №2 (п-ов Ямал) и №4 (Аляска) (Табл. 1).

1.3 Морфологический и филогенетический анализ культур, давших положительный результат на липолитический скрининг

Для культур, давших положительный результат при скрининге, были проведены микроскопические исследования и описание колоний. Морфологически, клетки выделенных культур представляли собой палочки разной длины и микрококки. Колонии были, в основном, однородными и пигментированными.

В результате определения нуклеотидных последовательностей генов 16S рНК выделенных культур и их сравнения с последовательностями, имеющимися в базах данных RDP и GenBank, с использованием программы BLAST, обнаружено, что выделенные штаммы принадлежали к двум филумам *Firmicutes* и *Actinobacteria*. Филум *Actinobacteria* объединяет в себе 6 штаммов (из образцов №1, 2, 6), принадлежащих к роду *Brevibacterium*; 2 штамма (из образцов №2 и 3) - к роду *Dietzia*, 8 штаммов к роду *Citricoccus* (из образцов №2 и 4), 1 штамм - к роду *Kocuria* (из образца №2). Филум *Firmicutes* представлен 1 штаммом, относящимся к роду *Bacillus* (из образца №2) и 1 штаммом (из образца №4), принадлежащим к роду *Lacticigenium*.

Таким образом, в результате проведенной работы создана коллекция из 20 штаммов чистых культур микроорганизмов, обладающих липолитической активностью. Основную часть коллекции составляют представители актинобактериальных семейств *Dietziaceae*, *Micrococcaceae* (роды *Citricoccus* и *Kocuria*) и *Brevibacteriaceae* (род *Brevibacterium*).

Из филогенетической дендрограммы (Рис. 1), построенной с использованием последовательностей генов 16S рНК, видно, что штаммы LJа-T10, JaCP-T38 и LJа-T5 (п-ов Ямал) относятся к одному виду рода *Brevibacterium*, близкому галофильному виду *B. marinus*, выделенному из морской воды (Lee, 2008). Другой штамм JaCP-T44 (п-ов Ямал) генетически близок *B. antiquum*, типовой штамм которого VKM Ac-2118^T выделен из плейстоценовых многолетнемерзлых отложений Колымской низменности (Гавриш и др., 2004). Для двух из восьми штаммов, представляющих род *Citricoccus*, были получены почти полные последовательности генов 16S рНК. Штамм JaCP-T29 (п-ов Ямал) оказался близок виду *Citricoccus muralis*, а штамм Al-T9 (п-ов Аляска) - виду *C. nitrophenolicus*. Род *Dietzia* был представлен двумя штаммами, близкими между собой и виду *D. maris*.

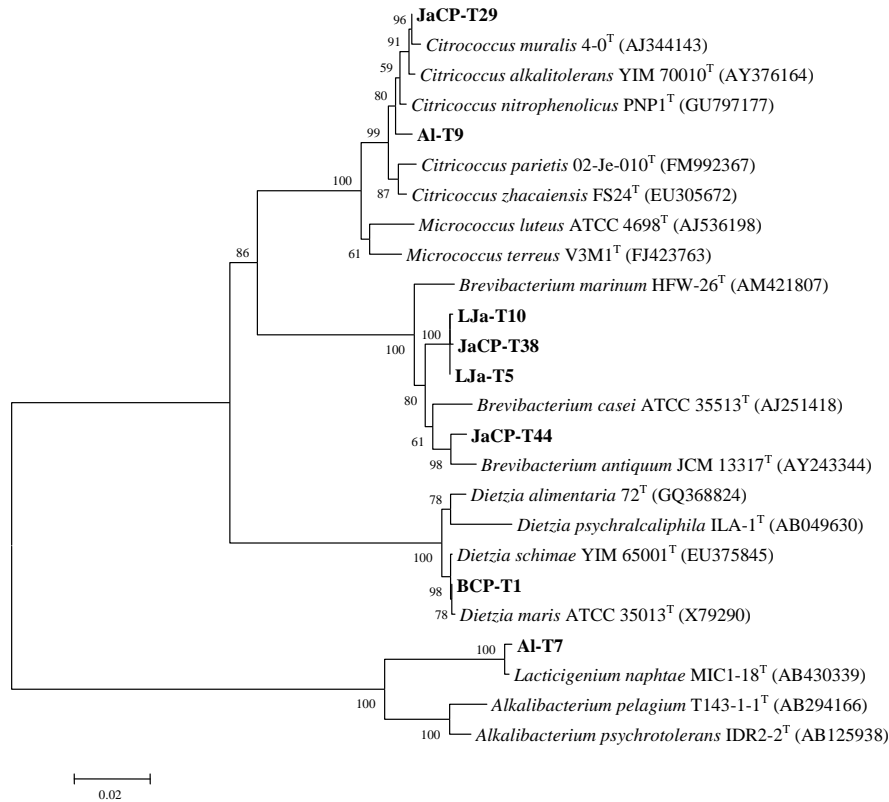


Рис. 1 Филогенетическая дендрограмма, построенная на основе анализа нуклеотидных последовательностей генов 16S рРНК некоторых штаммов, выделенных из арктических криопэггов, с использованием метода поиска ближайших соседей (“*neighbour-joining*”). Данные “bootstrap”-анализа (выраженные в процентах от 1000 реплик) указаны в точках ветвления.

Наиболее интересным из выделенных бактерий филума *Firmicutes* оказался штамм AI-T7 (п-ов Аляска), генетически близкий единственному виду *L. naphthae* рода *Lacticigenium* семейства *Carnobacteriaceae*. Это факультативно-анаэробные галофильные бактерии, устойчивые к 17% NaCl. Другой штамм - грамположительная бактерия штамм YaCP-T24 (п-ов Ямал) - наиболее близка к виду *Bacillus pumilus*, споры которой чрезвычайно устойчивы к стрессовым факторам окружающей среды, таким как УФ-излучение, высыхание и воздействие окислителей (Link et al., 2004). Штаммы этого вида характеризуются также высокой солеустойчивостью. Большинство известных продуцентов холодоактивных липаз относятся к грам-отрицательным бактериям филума *Proteobacteria*, в том числе к классу *Gammaproteobacteria*. Многие исследователи этих липаз сталкиваются с их нестабильностью под действием различных факторов (температура, добавление солей и детергентов и др.) (Kulakova et al., 2004). Полученная нами коллекция грам-положительных галофильных психроактивных бактерий является потенциальным источником липолитических холодоактивных ферментов, предположительно обладающих повышенной стабильностью.

Результаты работы показали, что наиболее перспективными для выделения продуцентов липолитических ферментов являются криопэги Ямала и Аляски (Табл. 2). Дальнейшие исследования позволят изучить филогенетические свойства выделенных галотолерантных и галофильных бактерий, обладающих липазной активностью, и установить их таксономический статус.

2 Липолитическая система *P. cryohalolentis*

P. cryohalolentis штамм K5^T был выделен из криопэга в вечной мерзлоте Арктики (Рис. 2) (Bakermans et al., 2006). Клетки этой аэробной бактерии представляли собой грамотрицательные, неподвижные, непигментированные, неспорообразующие коккобациллы размером 0,9-1,3 мкм в длину и 0,5-0,8 мкм в ширину. *P. cryohalolentis* образовывал гладкие матовые круглые колонии диаметром 2 мм. Хотя оптимальный рост наблюдался при температуре 22°C, штамм K5^T мог осуществлять метаболические реакции при отрицательных температурах до -10°C. NaCl был необязателен для роста, но рост не ингибировался в присутствии соли (до 1,7 М). Биохимические тесты показали положительные результаты на щелочную фосфатазу, эстеразу (C₄), липазу (C₈), липазу (C₁₄), лейцинариламидазу и нафтол-AS-VI-фосфогидролазу.

2.1 Изучение липолитической активности *P. cryohalolentis* в зависимости от стадии роста культуры и температуры культивирования

Для подтверждения наличия липолитической активности у *P. cryohalolentis* культуру высевали на среды АСР и АСТ и инкубировали при температурах 4°C и 22°C. При использовании обоих субстратов были получены положительные результаты. при инкубировании при 4°C зона гидролиза и интенсивность окрашивания в УФ свете была больше, что указывает на потенциальное наличие холодоактивных ферментов у этого организма (Рис. 2).

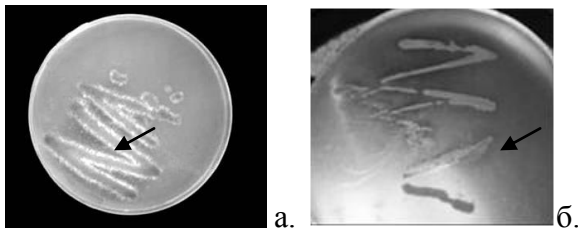


Рис. 2 Колонии *P. cryohalolentis*, выращенные при +4°C: а - на среде с родамином В и оливковым маслом в УФ свете (стрелкой указано свечение, указывающее на липолитическую активность); б – на среде с трибутирином (стрелкой указана зона гидролиза).

В результате исследования липолитической активности *P. cryohalolentis* на различных стадиях роста культуры подтверждено наличие как внеклеточной, так и внутриклеточной липазной активности у этого организма (Рис. 3). Обнаружено, что внутриклеточная активность была выше внеклеточной, что может указывать на наличие у *P. cryohalolentis* в основном внутриклеточных липолитических ферментов. Также мы показали, что как эстеразная, так и липазная внеклеточная активность снижается после перехода культуры в стационарную фазу роста, в то время как внутриклеточная активность остается на постоянном уровне. Схожие результаты были получены при изучении липолитической системы *Acinetobacter calcoaceticus* BD413 (Kok et al., 1993), а также *Staphylococcus warneri* M (Yokoi et al., 2012).

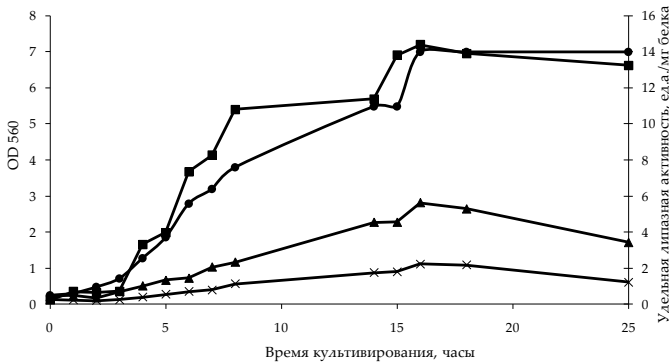


Рис. 3 Зависимость липазной активности от стадии роста *P. cryohalolentis*. ●—● - кривая роста *P. cryohalolentis*. ■—■ - внутриклеточная эстеразная активность, измеренная с помощью *n*-НФБ. ▲—▲ - внеклеточная эстеразная активность, измеренная с помощью *n*-НФБ. ×—× - внеклеточная липазная активность, измеренная с помощью *n*-НФП.

2.2 Моделирование липолитической системы *P. cryohalolentis* с использованием методов биоинформатики

Наличие полной геномной последовательности *P. cryohalolentis* K5^T в базах данных [http://www.genome.jp/dbget-bin/www_bget?gn:T00350] позволило нам осуществить идентификацию и последующее клонирование генов потенциальных липолитических ферментов этого микроорганизма.

Липолитические ферменты относятся к семейству α/β гидролаз. 12 генов *P. cryohalolentis* были аннотированы как последовательности, кодирующие белки, относящиеся к данному семейству. Все обнаруженные потенциальные липолитические ферменты *P. cryohalolentis* преимущественно состоят примерно из 300 а.о., за исключением Pcryo_2458, включающего 483 а.о. С целью выбора генов для клонирования мы провели поиск в геноме *P. cryohalolentis* гомологов известных липаз/эстераз родственных бактерий с помощью программы BLAST (Altschul et al., 1990). В качестве запроса были использованы аминокислотные последовательности липазы 1 *Psychrobacter immobilis* (Q02104, Arpigny et al., 1993), эстеразы PsyEst *Psychrobacter* sp. Ant300 (Q769C8, Kulakova et al., 2004), и липазы *Burcholderia cepacia* (P22088, Joergensen et al., 1991). В качестве гомологов этих белков в геноме *P. cryohalolentis* были идентифицированы кодирующие последовательности Pcryo_0023 (EstPc), Pcryo_2458 (Lip1Pc) и Pcryo_0443 (Lip2Pc), соответственно.

Исследование аминокислотных последовательностей целевых белков при помощи различных алгоритмов позволило обнаружить некоторые особенности их строения. Так, с использованием программ SignalP и LipoP было идентифицировано наличие сигнальных последовательностей (СП) в молекулах Pcryo_0023 и Pcryo_0443. Обе эти последовательности включают N-концевой участок, содержащий положительно заряженные остатки (n), центральный гидрофобный участок (h) и C-концевую часть, включающую сайт узнавания сигнальной пептидазы. При этом строение первой из них, имеющей длину 18 а.о., указывает на то, что белок Pcryo_0023 является липопротеином и ассоциирован с внешней мембраной *P. cryohalolentis*.

Pcryo_0443 содержит сигнальную последовательность из 39 а.о. Длинные СП характерны также для гомологичных липаз, например, СП липазы *B. cepacia* состоит из 44 а.о., *B. glumae* – из 39. По сравнению с классическим устройством данная последовательность обладает увеличенным центральным участком. Предполагаемый сайт расщепления сигнальной пептидазой I соответствует консенсусной последовательности Ala-X-Ala (Tuteja, 2005).

Изучение строения соответствующего участка генома показало, что в 3' направлении от гена Pcryo_0443 располагается ген Pcryo_0444. С использованием программы BLAST было показано, что аминокислотная последовательность белка Pcryo_0444 гомологична последовательности липазоспецифических шаперонов, например, белка LimA *B. cepacia* (P22089), которые обеспечивают сворачивание липаз в периплазме бактериальных клеток и их секрецию в культуральную жидкость. Таким образом, можно предположить, что экспорт Pcryo_0443, как и гомологичных ферментов, осуществляется при участии шаперона Pcryo_0444.

В составе аминокислотной последовательности Pcryo_2458 не обнаружено наличия секреторного сигнала, кроме того, этот белок содержит 10 остатков цистеина, что характерно для цитоплазматических белков. Таким образом, результаты предварительного анализа аминокислотных последовательностей Pcryo_0023 (EstPc), Pcryo_0443 (Lip2Pc) и Pcryo_2458 (Lip1Pc) позволяют предположить, что Pcryo_2458 (Lip1Pc) локализован в цитоплазме клеток *P. cryohalolentis*, в то время как Pcryo_0023 (EstPc) и Pcryo_0443 (Lip2Pc) являются секретлируемыми белками. При этом первый из них может быть прикреплен к поверхности клеток при помощи липопротеинового сигнала, а второй секретруется в

культуральную жидкость при участии специализированного шаперона Pcryo_0444 (LifPc) (Рис. 4).

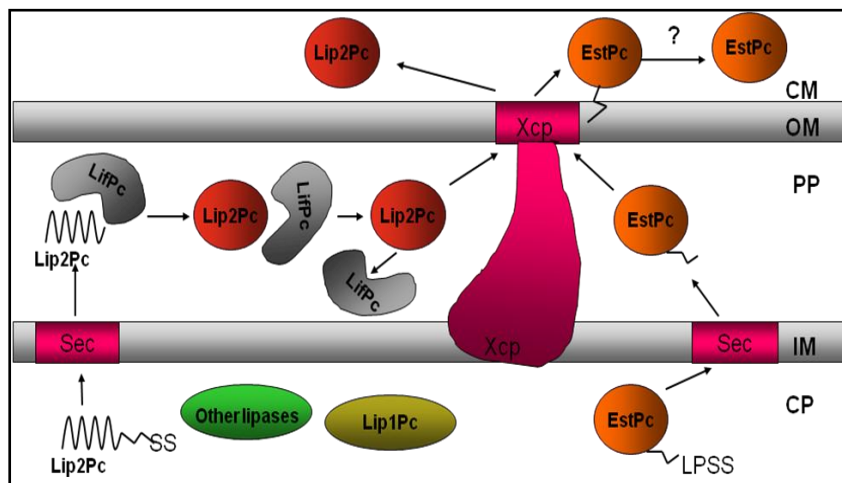


Рис. 4 Схема предполагаемой липолитической системы *P. cryohalolentis* (на основании биоинформационного анализа). CM – культуральная среда; OM – наружная мембрана; PP – периплазма; IM – внутренняя мембрана; CP – цитоплазма; SS – сигнальная последовательность; LPSS – липопротеиновый сигнал; LifPc – стерический шаперон фермента Lip2Pc; EstPc, Lip1Pc, Lip2Pc – липолитические ферменты *P. cryohalolentis*; Sec, Xcp – компоненты секреторной системы *P. cryohalolentis*.

3 Холодоактивные липолитические ферменты *P. cryo*

3.1 Получение, очистка и характеристика белка EstPc

3.1.1 Анализ аминокислотной последовательности EstPc

Кодирующая последовательность EstPc была идентифицирована в геноме *P. cryohalolentis* K5^T на основании гомологии с липазой *Psychrobacter immobilis* (Arpigny et al., 1993). Степень сходства между этими двумя белками составила 89% гомологичных и 78% идентичных остатков. Ген *estPc* состоит из 948 п.о., кодирующих 315 аминокислотных остатков. Содержание GC пар в гене составляет 43,99%. Рассчитанные молекулярная масса и изоэлектрическая точка составили 34562.7 Да и 6,55, соответственно.

Известно, что геномы многих штаммов *Psychrobacter* sp. содержат гены липаз/эстераз, в том числе холодоактивных (Arpigny et al., 1993, 1995; Yumoto et al., 2003; Kulakova et al., 2004; Zhang et al., 2007, Chen et al., 2011). Филогенетический анализ показал, что некоторые из этих белков имеют схожие аминокислотные последовательности и вместе с EstPc принадлежат к семейству V липолитических ферментов (Arpigny & Jaeger, 1999). Для них характерно наличие дипептида HG в N-концевой части белка и мотива GX SXG, содержащего каталитический остаток серина (Рис. 5а). У EstPc этот мотив окружен дополнительными остатками глицина, что предположительно может способствовать увеличению конформационной подвижности активного центра, характерного для холодоактивных белков. Соотношение числа остатков Lys к суммарному числу положительно заряженных остатков (Lys+Arg) в EstPc составляет 0,28, что также является характерным для холодоактивных белков (Borders et al., 1994). На основании структурной гомологии в составе EstPc было определено расположение аминокислотных остатков, образующих каталитическую триаду (S142, D264, H292) и оксианионную полость (F76, M143).

Исследование аминокислотной последовательности EstPc при помощи программ SignalP и LipopP показало наличие липопротеиновой сигнальной последовательности (СП) на N-конце белка с сайтом узнавания сигнальной пептидазы между 18 и 19 аминокислотными остатками (VVG-CT). Другой возможный сайт узнавания был предсказан между 27 и 28 остатками (TLA-INT).

3.1.2 Экспрессия гена *estPc* в *E.coli* и очистка рекомбинантного белка EstPc

На первом этапе работы с использованием ген-специфических праймеров мы амплифицировали из геномной ДНК *P. cryohalolentis* K5^T полноразмерный ген *estPc*. Он был клонирован в вектор для экспрессии на основе pET32a под контролем сильного регулируемого промотора *T7lac*. При этом на 3'-конце полученного гена располагается

последовательность, кодирующая гексагистиридиновый фрагмент, для последующей очистки белка при помощи металлоаффинной хроматографии. Изучение экспрессии этого гена в клетках штамма BL21(DE3) методом белкового электрофореза не обнаружило наличия белкового продукта соответствующей массы. Мы предположили, что вероятной причиной отсутствия или крайне низкого уровня экспрессии полноразмерного гена *estPc* может быть его неправильная локализация в клетках *E. coli*. Для проверки этого предположения мы осуществили делецию 27 кодонов, соответствующих сигнальному пептиду. Укороченный ген, содержащий 867 п.о., был клонирован в тот же плазмидный вектор, в результате была получена плазида рEstPc. В процессе подбора оптимальных условий экспрессии было показано, что максимальный уровень синтеза и наибольшая концентрация в растворимой фракции белка EstPc наблюдается при выращивании культуры в течение 4 часов в присутствии 0,1 мМ ИПТГ при 27°C. В таких условиях происходит синтез рекомбинантного белка с подвижностью, соответствующей молекулярной массе 33 кДа (Рис.5, дорожка 2), что соответствует рассчитанной молекулярной массе зрелой эстеразы EstPc (32,985.6 Да).

Благодаря наличию С-концевой гексагистиридиновой последовательности белок EstPc был очищен с помощью Ni-аффинной хроматографии (Рис. 5, дорожка 3).

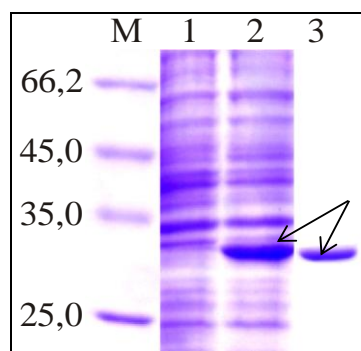


Рис. 5 Анализ результатов экспрессии и очистки EstPc. Электрофореграмма: **1** - тотальный клеточный белок из неиндуцированных клеток; **2** - общий клеточный белок из клеток *E. coli* BL21(DE3), трансформированных плазмидой рEstPc; **3** - белок EstPc очищенный с помощью Ni-аффинной хроматографии. **М** - маркеры молекулярного веса белков (кДа). Стрелками указано положение белка EstPc.

3.1.2 Характеристика рекомбинантного белка EstPc

Исследование белка EstPc показало, что, по сравнению с грубым экстрактом клеток, чистота белка после Ni-аффинной хроматографии повысилась в 3,7 раза. Выход рекомбинантного белка с удельной активностью 8767 е.а./ мг составил около 30 мг из 1 л культуры. Было показано, что максимальная каталитическая активность EstPc наблюдалась при использовании короткоцепочечного субстрата С₄. Активность при использовании длинноцепочечных субстратов составила (8,3% для С₁₂ - и 2% для С₁₆ -). Эти результаты позволяют утверждать, что полученный белок является эстеразой, а не липазой, в отличие от высокомолекулярной липазы LipX из *Psychrobacter* sp. C18 (90% сходства аминокислотных последовательностей) с максимумом активности по отношению к С₁₄ (Chen et al., 2011). Таким образом, субстратная специфичность ферментов, даже имеющих высокую степень гомологии аминокислотной последовательности, может существенно отличаться, что доказывает актуальность поиска и исследования новых вариантов белков из родственных видов бактерий.

Максимум эстеразной активности EstPc наблюдался в буфере с рН 8.5. Аналогичные данные были получены и для других щелочных липаз/эстераз, выделенных из психротрофов, например, из *Psychrobacter* sp. C 18 (Chen et al., 2011), *Pseudomonas* sp. штамм B11-1 (Choo et al., 1998), *Acinetobacter baumannii* BD5 (Park et al., 2009) и *Psychrobacter* sp. 7195 (Zhang et al., 2007).

Оптимальной температурой для активности EstPc являлась 35°C (Рис. 6). Аналогичный оптимум характерен также для липаз из *A. baumannii* BD5 (Park et al., 2009), *Pseudomonas* sp. KB700A (Rashid et al., 2001). С другой стороны, родственные ферменты LipP из *Pseudomonas* sp. B11-1 (Choo et al., 1998) и Lip3 из *Moraxella* sp. TA144 (Feller et al., 1991) демонстрировали

более высокий оптимум активности (45°C). При этом активность EstPc при 5 и 10°C составила 90,5 и 91,5%, соответственно, в отличие от LipX (Chen et al., 2011), чья относительная активность при этих температурах была меньше 30%.

Установлено, что EstPc обладает повышенной термостабильностью по сравнению с другими холодоактивными липазами/эстеразами, так как только инкубирование при 90°C в течение 1 часа снижало активность более, чем на 70% (Рис. 7). Согласно литературным данным, холодоактивные ферменты преимущественно отличаются низкой термостабильностью. Так, активность LipX снижалась до 30 и 20% после инкубации при 65 и 70°C в течение 1 часа (Chen et al., 2011). Активность KB-Lip снижалась более, чем на 70% при кратковременном прогреве при 60°C (Rashid et al., 2001), а LipP после инкубации при 70°C в течение 30 минут полностью инактивировалась (Choo et al., 1998).

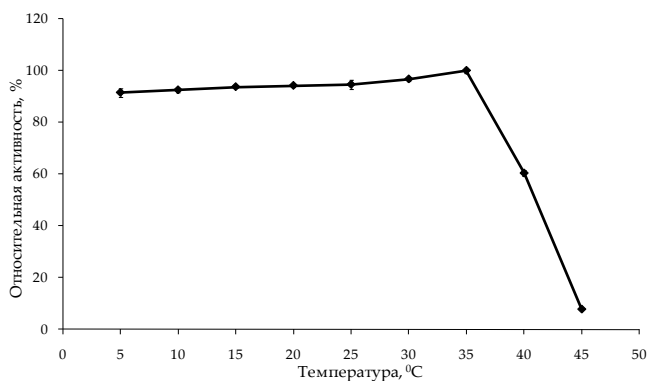


Рис. 6 Зависимость активности белка EstPc от температуры. Фермент инкубировали в реакционной смеси, содержащей 50 мМ Трис-НСl (рН 8,0) и 0,25 мМ *n*-НФБ в течение 15 минут. Активность при 35°C принимали за 100%.

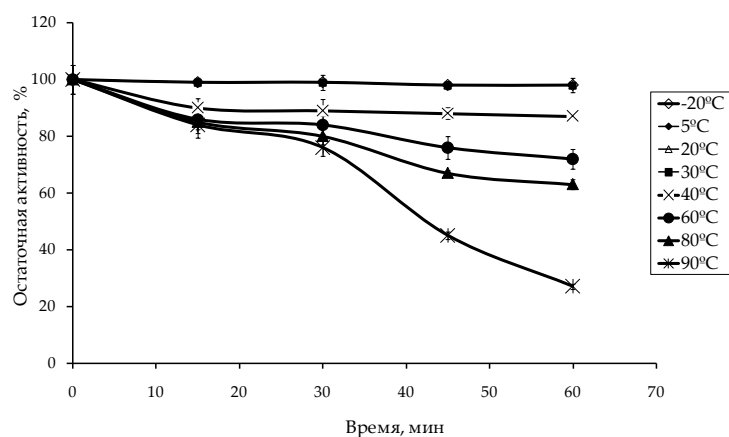


Рис. 7 Термостабильность белка EstPc. Фермент инкубировали в реакционной смеси при различных температурах в течение 1 часа и измеряли остаточную активность была с 0,25 мМ *n*-НФБ в течение 15 минут при 25°C. Активность до прогрева принимали за 100%.

Добавление NaCl в реакционную смесь резко увеличивало активность эстеразы (180% от активности в буфере без соли). Дальнейшее увеличение концентрации соли от 0,25 М до 1,75 М оказывало незначительное влияние на активность EstPc. Активность гомологичной липазы LipX также возрастала в присутствии NaCl (Chen et al., 2011), но эффект не был так заметен, как в случае EstPc.

Установлено, что эстеразная активность EstPc частично подавлялась ионами Mg^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} , Cu^{2+} и полностью ингибировалась ионами Zn^{2+} . Ион Mn^{2+} и ЭДТА оказывали стимулирующее воздействие на активность EstPc, а ионы Ca^{2+} не влияли на нее. Известно, что ионы Zn^{2+} также полностью ингибировали липазы LipX, LipP и LipA1 (Chen et al., 2011, Choo et al., 1998, Zhang et al., 2007). Интересно отметить, что присутствие ЭДТА инактивировало большинство сходных с EstPc ферментов (LipX, LipA1 и PsyEst) или не влияло на них (LipP) (Chen et al., 2011, Choo et al., 1998, Kulakova et al., 2004, Zhang et al., 2007).

3.2 Получение и очистка белка Lip1Pc и его мутантов

3.2.1 Анализ аминокислотной последовательности Lip1Pc и планирование делеций

Кодирующая последовательность Lip1Pc была идентифицирована в геноме *P. cryohalolentis* K5^T на основании гомологии с эстеразой *Psychrobacter* sp. Ant300 (Kulakova et al., 2004). Степень сходства между этими двумя белками составляет 72% гомологичных и 61% идентичных остатков. Недавно была опубликована аминокислотная последовательность липазы D2XSH4 из *Psychrobacter* sp. G, обнаруживающая более высокую степень гомологии с Lip1Pc (99%), однако авторам не удалось добиться функциональной экспрессии этого белка в клетках *E. coli* (Xuezheng et al., 2010). Среди наиболее близких Lip1Pc белков можно отметить также холодоактивную липазу из *Psychrobacter* sp. 2-17 (Parra et al., 2008) и Lip2 из *Moraxella* sp. (Feller et al., 1991).

На основании гомологии с родственными белками было сделано предположение, что Lip1Pc принадлежит к семейству IV липолитических ферментов (семейству HSL; (Arpigny and Jaeger, 1999). Аминокислотные последовательности липаз и эстераз, составляющих это семейство, обнаруживают значительное сходство с последовательностью каталитического домена гормончувствительной липазы (HSL) млекопитающих (Langin et al., 1993) и присутствие характерных мотивов HGGGF и GDSAG, последний из которых включает в себя каталитический остаток серина. На основании гомологии аминокислотных последовательностей в молекуле Lip1Pc было предсказано расположение аминокислотных остатков, образующих каталитическую триаду (S299, D414, H444) и полость оксианиона (G228, A300).

Анализ первичной структуры Lip1Pc с помощью программы SignalP (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) не обнаружил наличия сигнальной последовательности на N-конце этого белка. Предсказание вторичной структуры Lip1Pc с помощью программы PsiPred обнаружило типичное для представителей семейства α/β -гидролаз строение каталитического домена, включающего в себя восемь β -тяжей и девять α -спиралей. N-концевой домен белка длиной 177 а.о. включает десять α -спиральных участков. С целью изучения структурной и функциональной роли N-концевого домена было запланировано получение и характеристика пяти делеционных мутантов Lip1Pc, с последовательным укорочением N-конца в белках ND1-4 (ND1, Δ 1-42; ND2, Δ 1-70; ND3, Δ 1-110; ND4, Δ 1-122) и внутренней делецией 50 а.о. в ND5 (Δ 127-176). При выборе N-концевых остатков мутантов ND1-4 мы основывались на расположении границ предполагаемых α -спиралей в составе N-концевого домена. Положение делеции в мутанте ND5 было обусловлено отсутствием соответствующей аминокислотной последовательности в молекуле гомологичной эстеразы *Psychrobacter* sp. Ant300.

3.2.2 Экспрессия в *E.coli* и очистка Lip1Pc и его мутантов

Полноразмерный ген *lip1Pc* был амплифицирован на матрице геномной ДНК *P. cryohalolentis* K5^T с использованием специфических олигонуклеотидных праймеров и клонирован в экспрессионный вектор рЕТ32а под контролем промотора T7lac. Клонирование в этот вектор обеспечивало добавление к продукту экспрессии C-концевого гексагистидинового фрагмента для последующей очистки рекомбинантного белка при помощи металлоаффинной хроматографии. Гены делеционных мутантов ND1-4 были получены и клонированы аналогичным образом. Для конструирования мутанта ND5 мы воспользовались методом двустадийного SOE-PCR с использованием перекрывающихся внутренних праймеров.

Для наработки рекомбинантного белка Lip1Pc полученной плазмидой трансформировали компетентные клетки штамма *E. coli* BL21(DE3). Индукцию проводили 0.1 mM ИПТГ при 27°C, что обеспечивало наибольший выход продукта экспрессии в растворимой форме, в соответствии с данными белкового электрофореза и измерения

липолитической активности. После индукции уровень экспрессии полученного гена в клетках штамма BL21(DE3) достигал 10% (Рис. 8, дорожка 2) общего клеточного белка. Белки ND1-5 были получены в тех же условиях (Рис. 8, дорожки 3-7). Необходимо отметить, что уровень экспрессии белков ND3 и ND4 оказался существенно выше (до 40% общего клеточного белка), однако большая часть продуктов обнаруживалась в составе телец включения.

По результатам белкового электрофореза очищенный с помощью Ni-аффинной хроматографии Lip1Pc представляет собой одиночную полосу с приблизительной молекулярной массой 54 кДа, что соответствует рассчитанной массе белка с гексагистиридиновой последовательностью (54.6 кДа, Рис. 8, дорожка 1). Электрофоретическая подвижность мутантов ND1-5, очищенных аналогичным способом, также соответствует рассчитанным молекулярным массам (50.1, 46.9, 42.5, 41.1, 50 кДа, соответственно) (Рис. 8, дорожки 2-6).

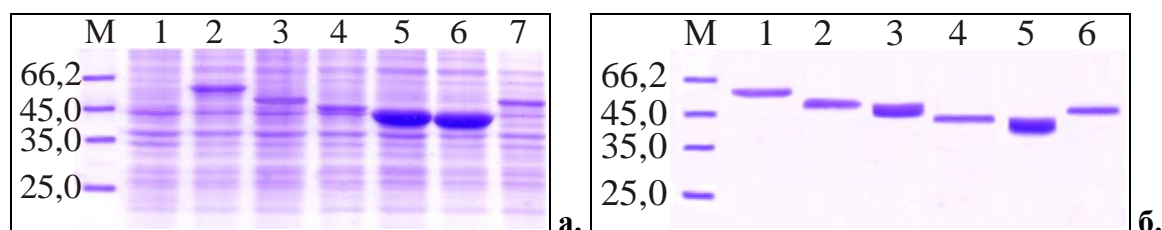


Рис. 8 Анализ результатов экспрессии и очистки Lip1Pc и его мутантов. Электрофореграмма: **а)** 1 - общий клеточный белок из неиндуцированных клеток; 2 - 7 - тотальный клеточный белок из индуцированных клеток *E. coli* BL21(DE3), трансформированных плазмидами pLip1Pc (2), pND1 (3), pND2 (4), pND3 (5), pND4 (6), pND5 (7); **б)** очищенные с помощью Ni-аффинной хроматографии белки: 1 – Lip1Pc; 2 - ND1; 3 – ND2; 4 – ND3; 5 – ND4; 6 – ND5. М - маркеры молекулярного веса белков (кДа).

3.2.3 Характеристика рекомбинантного белка Lip1Pc

Благодаря высокому уровню экспрессии и хорошей растворимости белка Lip1Pc его очистка методом Ni-аффинной хроматографии позволила добиться повышения чистоты препарата по сравнению с клеточным экстрактом в 17 раз. Выход рекомбинантного белка составил около 25 мг из 1 л культуры с удельной активностью 1413 е.а./ мг. Результаты определения субстратной специфичности выделенного фермента показали, что Lip1Pc может быть отнесен к липазам, поскольку лучше утилизирует субстраты со средней и длинной углеводородной цепью (C_{10} – 82% и C_{12} – 100% максимальной активности). Это отличает Lip1Pc от гомологичных ей липаз/эстераз, так, PsyEst из *Psychrobacter* sp. Ant300 (Kulakova et al., 2004) и lipase2 из *Moraxella* sp. TA144 (Feller et al., 1991) демонстрировали максимум активности с C_4 субстратом, а МВР-липаза из *Psychrobacter* sp. 2-17 (Parra et al., 2008) - с C_6 .

Очищенная Lip1Pc была активна в буферах с различными значениями pH (7,2-9,5), однако максимальная активность наблюдалась в Трис-НСl, pH 8,5. Как было указано выше, этот результат является типичным для большинства известных щелочных липаз/эстераз.

Влияние температуры на активность полученного белка исследовали в диапазоне 5-50°C с использованием *n*-НФБ в качестве субстрата. Полученные результаты показали, что максимальная активность Lip1Pc наблюдается при 25°C (Рис. 9), температуре, типичной для многих холодоактивных ферментов (Parra et al 2008; Zhang et al., 2007). В результате исследования термостабильности было установлено, что Lip1Pc обладает высокой стабильностью при температурах от -20 до +20°C и быстро инактивируется при нагревании выше 40°C (Рис. 10). Отличительной особенностью холодоактивных ферментов, в том числе липаз, является их низкая стабильность при повышенных температурах (Arpigny et al., 1997). Lip1Pc, как и гомологичные холодоактивные липазы/эстеразы (Parra et al., 2008; De Santi et al., 2010), продемонстрировал это свойство.

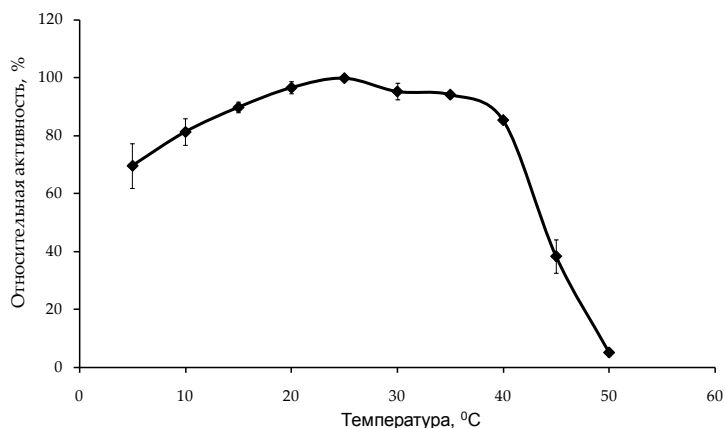


Рис. 9 Зависимость активности белка Lip1Pc от температуры. Фермент инкубировали в реакционной смеси, содержащей 50мМ Трис-НСl (рН 8,0) и 0,25 мМ *n*-НФБ в течение 15 мин. Активность при 25°C принимали за 100%.

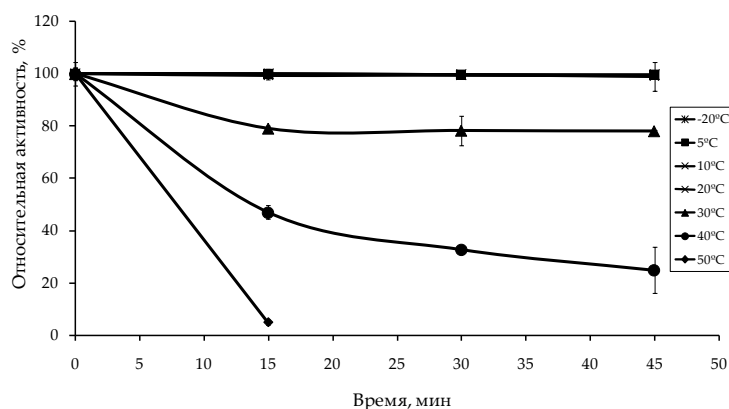


Рис. 10 Термостабильность белка Lip1Pc. Фермент инкубировали в реакционной смеси при различных температурах в течение 45 минут и измеряли остаточную активность после инкубации с 0,25 мМ *n*-НФБ в течение 15 минут при 25°C. Активность до прогрева принимали за 100%.

Установлено, что активность фермента частично подавлялась при наличии в реакционной смеси NaN_3 и ионов Mg^{2+} , Mn^{2+} , Ca^{2+} . Полная инактивация Lip1Pc достигается добавлением ионов Zn^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} , Cu^{2+} и ФМСФ, в то время как ЭДТА незначительно повышает его активность. Сходные результаты влияния различных ингибиторов были получены и для гомологичного белка PsyEst (Kulakova et al., 2004).

3.2.4 Влияние укорочения N-концевого домена на субстратную специфичность, активность и термостабильность Lip1Pc

В результате проведенных исследований установлено, что делеция первых 110 и 122 а.о. Lip1Pc, а также делеция участка длиной 50 а.о. ($\Delta 127-176$) приводит к полному исчезновению липазной активности белков ND3, ND4 и ND5 и снижению удельной активности ND1 (896 ед.а./мг) и ND2 (1000 ед.а./мг) по сравнению с Lip1Pc (1413 ед.а./мг), что указывает на важную роль N-концевой последовательности в функциональной организации белка.

Были изучены свойства мутантных белков ND1 и ND2 по отношению к субстрату и температуре. Установлено, что по сравнению с Lip1Pc активность ND1 и ND2 при использовании *n*-НФП (C_{16}) в качестве субстрата снижалась на 13 и 7%, соответственно, однако оба мутанта показали увеличенную на 20% по сравнению с Lip1Pc активность по отношению к *n*-НФД (C_{10}), то есть субстратная специфичность мутантных липаз стала более узкой в силу более выраженного предпочтения C_{10} и C_{12} по сравнению с C_{16} . Это может быть связано с участием N-концевых последовательностей в формировании субстратного туннеля у ферментов, относящихся к семейству HSL и ограничением доступа к активному центру белка (Wei et al., 1999).

Температурный оптимум активности ND1 составил 25°C, как и у исходного белка, а у ND2 он понизился до 20°C. По сравнению с Lip1Pc диапазон температур, в котором

активность белков составляла более 80% от максимальной, для мутантов несколько сузилась (5-30°C для ND1 и 5-35°C для ND2). При этом остаточная активность ND1 и ND2 после инкубации в течение 45 мин при 30°C оказалась повышена на 13 и 17% соответственно, а после инкубации при 40°C остаточная активность ND2 была на 43% выше, чем у Lip1Pc. Однако оба мутанта, так же как и исходный белок, практически полностью инактивировались после инкубации при 50°C (Табл.2). Стабилизирующий эффект делеций предположительно является результатом более компактной конформации мутантов по сравнению с полноразмерным белком.

Полученные нами данные изучения мутантных вариантов липазы Lip1Pc подтверждают значение N-концевого домена белка для активности и термостабильности липаз семейства HSL.

Таблица 2 Сравнение свойств белка Lip1Pc и его делеционных мутантов ND1, ND2.

| Белок | Удельная активность, ед.а./мг ¹ | Субстратный оптимум ² | Температурный оптимум, °С ³ | Термостабильность при 30/40/50°C, % ⁴ |
|--------|--|----------------------------------|--|--|
| Lip1Pc | 1413 | C ₁₂ | 25 | 79/47/5 |
| ND1 | 896 | C ₁₀ | 25 | 92/35/2,5 |
| ND2 | 1000 | C _{10/C12} | 20 | 96/91/5 |

¹ - удельную активность определяли как количество единиц липазной активности (ед.а.) на 1 мг белка. За единицу липазной активности принимали количество фермента, необходимое для высвобождения 1 мкмоль *n*-нитрофенола за 1 мин;

² - специфичность белков по отношению к субстратам измеряли с использованием *n*-нитрофениловых эфиров карбоновых кислот с различной длиной углеводородной цепи (C₂, C₄, C₈, C₁₀, C₁₂ и C₁₆);

³ - зависимость активности от температуры измеряли после инкубирования ферментов в течение 15 мин при разных температурах с *n*-НФБ;

⁴ - показана термостабильность белков, определенная измерением остаточной активности после инкубирования в течение 45 минут при температурах 30, 40 и 50°C.

3.3 Получение и очистка белка Lip2Pc

3.3.1 Анализ аминокислотной последовательности и клонирование генов *lip2Pc* и *lifPc*

На основании гомологии с последовательностями липолитических ферментов родственных микроорганизмов в геноме *P. cryohalolentis* было обнаружено существование оперона, кодирующего потенциальную липазу Lip2Pc и специфический шаперон LifPc. Объединение этих генов в составе оперона указывало на необходимость их координированной экспрессии, что характерно для других пар липаза-фолдаза (Rosenu et al., 2004). Аминокислотная последовательность Lip2Pc обнаруживала максимальное сходство (59% одинаковых остатков) с липазами из других видов *Psychrobacter* (ZP_08459952 липаза *Psychrobacter* sp. 15011 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/bioproject/65121>; YP_001279868 белок, относящийся к семейству α/β -гидролаз, из *Psychrobacter* sp. PRwf-1 http://www.genome.jp/dbget-bin/www_bget?genome:T00541). Относительно высокое сходство с липазами *Pseudomonas* (около 50% идентичных остатков с *P. stutzeri*, *P. mendocina* и *P. aeruginosa* PAO1) (Yan et al., 2008; YP_001188052 липаза *Pseudomonas mendocina* ymp http://www.genome.jp/dbget-bin/www_bget?genome:T00510; Chihara-Siomi et al., 1992) позволило отнести эту липазу к семейству I.1 (или abH15 - липазы *Burkholderia*) в классификации липолитических ферментов.

На основании гомологии аминокислотные остатки, образующие каталитическую триаду, были идентифицированы как Ser144, Asp295 и His317. Оксианионозная полость предположительно образуется Met77 и Gln145.

Анализ аминокислотной последовательности LifPc выявил меньшее сходство с известными липазспецифическими шаперонами из других микроорганизмов. Например, число идентичных остатков между LifPc и Lif из *Psychrobacter* sp. PRwf-1 составляет только 44%, в то время как сходство соответствующих липаз - 59%. Основываясь на уровне гомологии аминокислотной последовательности, этот белок можно отнести к Семейству I Lif-белков, что подтверждается наличием консервативного мотива FDYFLSA (остатки 112-118) в последовательности LifPc. Анализ аминокислотной последовательности LifPc с помощью алгоритма ТМММ (<http://www.cbs.dtu.dk/services/ТМММ-2.0/>) выявил наличие на N-конце белка потенциального трансмембранного сегмента (остатки 9-28), который предположительно служит для прикрепления шаперона к внутренней мембране клетки бактерий. Ранее было показано, что делеции этого сегмента, а также прилегающего участка не влияют на функциональную активность шаперона (Quyen et al., 1999).

3.3.2 Экспрессия генов *lip2Pc* и *lifPc* в *E.coli*. Рефолдинг *in vitro* рекомбинантной Lip2Pc

Анализ с помощью программы SignalP показал наличие СП в молекуле Lip2Pc с сайтом отщепления между 39 и 40 аминокислотными остатками. На первом этапе работы мы амплифицировали из геномной ДНК *P. cryohalolentis* K5^T полноразмерный ген *lip2Pc* с использованием ген-специфических праймеров и клонировали его в вектор на основе pET32a таким образом, что продукт экспрессии не содержал дополнительных последовательностей. Исследование его экспрессии в клетках штамма BL21(DE3) показало, что при любых условиях индукции и концентрации ИПТГ Lip2Pc образует нерастворимые тела включения. На следующем этапе мы осуществили делецию 39 5'-концевых кодонов гена *lip2Pc*, соответствующих СП. Укороченный ген, содержащий 945 п.о., был клонирован в тот же плазмидный вектор, что и полноразмерный, и экспрессирован в клетках *E.coli*. Было показано, что укороченный белок Lip2Pc также образует нерастворимые тела включения независимо от условий культивирования штамма-продуцента. Поэтому для дальнейших экспериментов мы использовали зрелый Lip2Pc, чтобы избежать возможного негативного влияния неотщепленной СП на процесс рефолдинга. Анализ экспрессии гена *lip2Pc* с помощью белкового электрофореза биомассы клеток штамма-продуцента показал, что рекомбинантный белок с приблизительной молекулярной массой 33 кДа, соответствующей расчетной молекулярной массе зрелого полипептида Lip2Pc, синтезируется клетками на высоком уровне (Рис. 11а, дорожка 2). Многочисленные исследования доказали, что правильный фолдинг ферментов этого класса как *in vivo*, так и *in vitro* зависит от присутствия специфического шаперона (Rosenau et al., 2004). С помощью ПЦР нами были получены три варианта гена *lifPc*, кодирующих полноразмерный шаперон, а также его укороченные варианты с делециями трансмембранного сегмента (Δ 1-28) и прилегающего участка (Δ 1-62) - *lifPcd28* и *lifPcd62*. Эти гены были клонированы в вектор для экспрессии на основе pET32a, что обеспечило наличие на 3' - конце последовательности, кодирующей His-tag. Анализ результатов экспрессии полноразмерного шаперона показал, что белок присутствует в двух формах, соответствующих полноразмерному белку и продукту протеолитического расщепления. Поэтому были получены и использованы укороченные варианты шаперона LifPcd28 и LifPcd62 (40 и 36 кДа, соответственно). Оба белка были успешно экспрессированы в клетках *E. coli* BL21(DE3) в присутствии 0,1 мМ ИПТГ при 27°C и очищены с помощью Ni-аффинной хроматографии (Рис. 11а, дорожки 3 и 4). Пилотные эксперименты с обоими вариантами шаперона показали их одинаковую активность в процессе рефолдинга рекомбинантной липазы Lip2Pc, поэтому в дальнейших экспериментах использовался только белок LifPcd62.

В результате промывки тел включения детергентсодержащим буфером была достигнута высокая степень чистоты рекомбинантного белка Lip2Pc (Рис. 11б дорожка 1), который был затем растворен в буфере, содержащем 8 М мочевины и 10 мМ меркаптоэтанол, в концентрации 4 мг/мл.

Как показали многочисленные исследования, на эффективность рефолдинга денатурированной липазы влияют различные факторы (Quyen et al., 1999; Akbari et al., 2010; Yamaguchi et al., 2013). Эффективная экспрессия Lip2Pc и LifPc в клетках *E. coli* BL21(DE3) и разработка процедуры рефолдинга в 96-луночном планшете позволили проанализировать влияние многих параметров на эффективность этого процесса. Было проведено исследование влияния следующих параметров: концентрация липазы, весовое соотношение липаза/шаперон, присутствие различных вариантов шаперона (LifPcd28 или LifPcd62), присутствие соли, детергентов, глицерина или мочевины (Табл. 3). Было показано, что принципиальное значение для эффективного рефолдинга Lip2Pc имеет добавление 45% глицерина в буфер для рефолдинга. Другими важными параметрами, влияющими на эффективность процесса, оказались присутствие мочевины и β -меркаптоэтанола. Наличие ионов кальция также оказало позитивное влияние, предположительно благодаря стабилизации активной конформации белка. Так как оба варианта шаперона продемонстрировали одинаковую активность (Табл. 3), для дальнейшего подбора условий использовали только LifPcd62. Было показано, что соотношение липаза:шаперон 1:2 повышает эффективность рефолдинга (на 9%), также как и снижение концентрации липазы с 200 мкг/мл до 100 мкг/мл (на 33%) (Табл. 3).

Для избавления от шаперона смесь после рефолдинга наносили на Ni-аффинную колонку и элюировали с помощью имидазолсодержащего буфера. В результате электрофоретического анализа в ДСН-ПААГ установлено, что липаза оказывалась в проскоке, в то время как фракции, полученные после элюции, содержали чистый шаперон LifPcd62 (Рис. 11б дорожки.4-5). В ряде предыдущих исследований было показано, что липаза, полученная в процессе рефолдинга *in vitro*, по окончании процесса остается связанной в комплексе с Lif-шапероном (Rauwels et al., 2012). Полученные нами результаты указывают на то, что комплекс Lip2Pc с LifPcd62, по-видимому, менее стабилен, что позволило провести частичную очистку липазы от фолдазы, имеющей His-tag, с помощью Ni-аффинной хроматографии. Небольшое количество фолдазы, присутствующее в конечной фракции, не влияет на полученные результаты в силу отсутствия липолитической активности у шаперона.

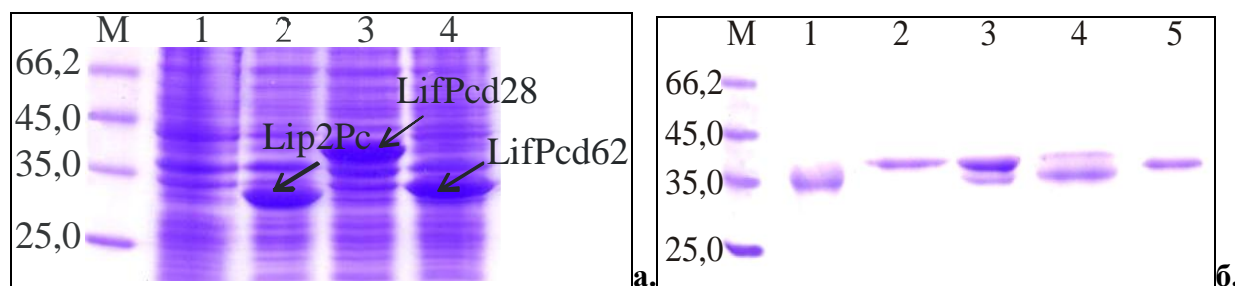


Рис. 11 Электрофоретический анализ: **а)** экспрессии Lip2Pc и укороченных вариантов шаперона LifPc. **1** - общий клеточный белок из неиндуцированных клеток; **2-4** - общий клеточный белок из индуцированных клеток *E. coli* BL21(DE3), трансформированных плазмидами pLip2Pc (**2**), pLifPcd28 (**3**), pLifPcd62 (**4**), после индукции. Стрелками показано положение белков Lip2Pc, LifPcd28 и LifPcd62; **б)** взаимодействия между Lip2Pc и специфическим шапероном LifPc **1** – очищенная Lip2Pc (растворенные тела включения); **2** – очищенный с помощью Ni- аффинной хроматографии LifPcd62; **3** – смесь Lip2Pc и LifPcd62 (1:2) в буфере для рефолдинга; **4** – фракция несвязавшихся с носителем белков после загрузки образца с дорожки 3 на колонку с Ni-сефарозой; **5** – элюция образца буфером, содержащим 300 мМ имидазола, . **М** – маркеры молекулярной массы белков (кДа).

Таблица 3 Влияние различных добавок на липолитическую активность Lip2Pc после рефолдинга.

| Добавки | Удельная активность, ед.а./мг белка | Относительная активность, % |
|--|-------------------------------------|-----------------------------|
| Нет* | 0 | - |
| LifPcd62, 0,2 мг/мл | 0 | - |
| 45% глицерин | 0 | - |
| 45% глицерин+LifPcd62, 0,1 мг/мл | 4550 | 91 |
| 45% глицерин+LifPcd28, 0,1 мг/мл | 4650 | 93 |
| 45% глицерин+LifPcd62, 0,2 мг/мл | 5000 | 100 |
| 45% глицерин+LifPcd62, 0,2 мг/мл+0,01% Тритон X-100 | 5300 | 107 |
| 45% глицерин+LifPcd62, 0,2 мг/мл+5 мМ β-меркаптоэтанол | 6000 | 121 |
| 45% глицерин+LifPcd62, 0,2 мг/мл+1,5 М мочевины | 6200 | 125 |
| 45% глицерин+LifPcd62, 0,2 мг/мл+200мМ NaCl | 5100 | 103 |
| 45% глицерин+LifPcd62, 0,2 мг/мл+0,01% Тритон X-100+5 мМ β-меркаптоэтанол+1,5 М мочевины+200 мМ NaCl | 6900 | 140 |

*Рефолдинг Lip2Pc (0,1 мг/мл) проводился в буфере 50 мМ Трис-HCl pH 8,0, 5 мМ CaCl₂.

3.3.3 Характеристика рекомбинантного белка Lip2Pc

В результате проведенных экспериментов нами разработан протокол эффективного рефолдинга липазы Lip2Pc в присутствии специфического шаперона. Получен препарат холодоактивной липазы Lip2Pc, с удельной активностью около 6900 ед. а./мг. Биохимические исследования показали, что полученная рекомбинантная липаза Lip2Pc обладает широким спектром субстратной специфичности. Максимальная ферментативная активность Lip2Pc была обнаружена при использовании *n*-НФП (C₁₆). Полученные результаты подтверждают правильность предварительного отнесения Lip2Pc к семейству I липаз (настоящие липазы), которые предпочитают длинноцепочечные субстраты (Arpigny and Jaeger, 1999).

Так же как EstPc, Lip1Pc и большинство других липаз/эстераз, полученных из психротрофов *Psychrobacter* sp. C 18 (Chen et al., 2011), *Pseudomonas* sp. штамм B11-1 (Choo et al., 1998), *A. baumannii* BD5 (Park et al., 2009) и *Psychrobacter* sp. 7195 (Zang et al., 2007) Lip2Pc является щелочной липазой с оптимумом при pH 9,0.

Температурный оптимум активности Lip2Pc наблюдается при 25°C в то время как у других холодоактивных липаз максимум выше на 5-15°C (Choo et al., 1998, Park et al., 2009, Suzuki et al., 2002). По сравнению с другими липазами Lip2Pc обладает также более широким температурным диапазоном активности - так, например, ее активность при 5 и 65°C составила 80% от максимальной (Рис. 12). Исследование термостабильности белка Lip2Pc показало, что как и EstPc, она обладает повышенной стабильностью при относительно высоких температурах по сравнению с ранее описанными холодоактивными липазами/эстеразами, так как даже после инкубации в течение 1 часа при температуре 80°C белок сохранял 20% активности, а при более низких температурах активность белка сохранялась на уровне 60-100% от начальной (Рис. 13).

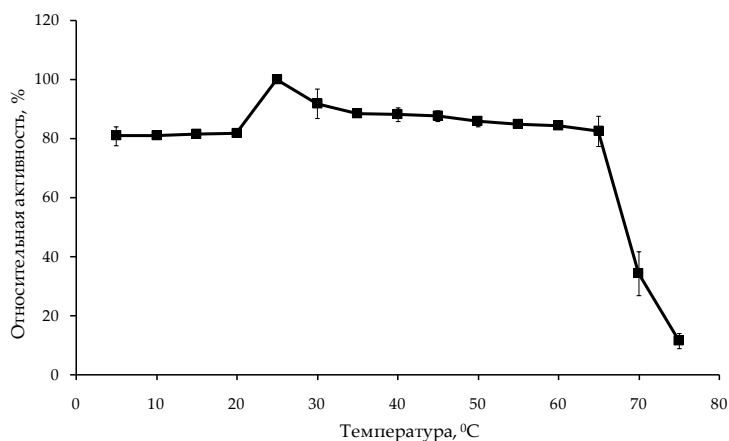


Рис. 12 Зависимость активности белка Lip2Pc от температуры. Фермент инкубировали в реакционной смеси, содержащей 50 мМ Трис-НСl, рН 8,0 и 0,1 мМ п-НФД в течение 15 мин. Активность при 25°C принимали за 100%.

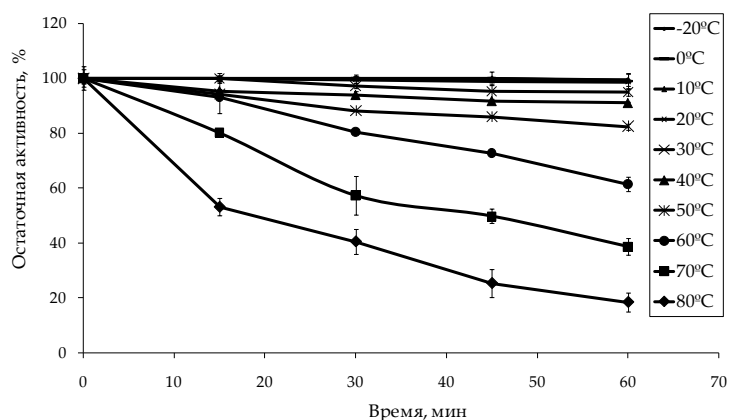


Рис. 13 Термостабильность белка Lip2Pc. Lip2Pc инкубировали в реакционной смеси, содержащей 50 мМ Трис-НСl, рН 8.0 при различных температурах в течение 1 часа. Остаточную активность измеряли с 0,25 мМ п-НФД в качестве субстрата. Остаточная активность после инкубации при -20, 0 и 20°C составила 100%. Активность до прогрева принимали за 100%.

Установлено, что активность фермента Lip2Pc частично подавлялась при наличии в реакционной смеси NaN_3 , ПМСФ и ионов Mg^{2+} , Ni^{2+} , Co^{2+} . а также снижалась в два раза при добавлении Cu^{2+} или Zn^{2+} . ЭДТА инактивирует Lip2Pc более, чем на 75% так же как и большинство других описанных холодоактивных липаз (Chen et al., 2011, Choo et al.).

Исследование влияния различных неионных детергентов показало, что Triton X-100 и Tween 20 снижают активность Lip2Pc более, чем на 70%, CHAPS и ДСН в концентрации 0,05% повышают активность Lip2Pc на 20%, а более высокие концентрации ДСН (0,5%) полностью ингибируют белок. Инактивация белков ДСН была показана так же для LipX, РК-12CS и AEST, в то время как активность LipA1 снижалась только на 20% при добавлении ДСН (Chen et al., 2011; Jinwal et al., 2003; Suzuki et al., 2002, Zhang et al., 2007).

Было показано, что Lip2Pc стабильна в присутствии органических растворителей в концентрации 10 и 30%, за исключением 30% ацетонитрила, который полностью инактивирует рекомбинантный фермент, в отличие от LipX и LipP, чья активность снижалась и в присутствии этанола той же концентрации (Chen et al., 2011; Choo et al., 1998).

Таким образом, в результате проделанной работы нами получены и охарактеризованы три липолитических фермента *P.cryohalolentis* – EstPc, Lip1Pc и Lip2Pc. Установлено, что EstPc является эстеразой с максимумом активности при использовании субстратов с короткой углеводородной цепью, а Lip1Pc и Lip2Pc – липазами, способными утилизировать длинноцепочечные субстраты. Щелочной рН (8,5-9,0) и температурный оптимумы (25-35°C) полученных белков характерны и для других изученных холодоактивных ферментов (Choo et al., 1998, Chen et al., 2010, Kulakova et al., 2004). Отличительными особенностями изученных белков EstPc, Lip1Pc и Lip2Pc являются более широкий температурный диапазон активности и высокая активность при температурах, близких к 0°C. Белки EstPc и Lip2Pc продемонстрировали относительно высокую термостабильность при температурах выше 60°C, нехарактерную для многих других холодоактивных белков (Choo et al., 1998, Chen et al.,

2010, Kulakova et al., 2004, Zhang et al., 2007). Также показано, что полученные белки обладают различной стабильностью по отношению к ионам металлов, детергентам, органическим растворителям и другим добавкам. Наименее высокую стабильность обнаружил Lip1Pc, активность которого подавлялась большинством изученных веществ. Наиболее стабильным оказался Lip2Pc, продемонстрировавший способность сохранять активность в присутствии большинства добавок, в том числе в присутствии 0,05% ДСН и 5% ацетонитрила.

На основании полученных данных можно утверждать, что липолитические ферменты *P. cryohalolentis*, полученные и охарактеризованные в данной работе, обладают специфическими свойствами, отличающими их от других представителей семейства и представляющими интерес как для исследований в области структуры и функции белковых молекул, так и для практического применения.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Результаты проведенного исследования позволяют утверждать, что криопэги вечной мерзлоты содержат большое количество видов микроорганизмов, обладающих липолитической активностью в условиях пониженной температуры и высокой солености. Нами впервые создана коллекция психротолерантных галофильных микроорганизмов, выделенных из переохлажденных высокоминерализованных вод в толще вечной мерзлоты (криопэгов) Колымской низменности, Аляски и полуострова Ямал - потенциальных продуцентов холодоактивных липолитических ферментов, и изучены их морфологические и физиолого-биохимические характеристики. Установлено, что изоляты в основном представлены грамположительными и грамотрицательными палочками и кокками. Методом филогенетического анализа с использованием данных секвенирования последовательностей генов 16S рРНК проведено определение таксономического положения выделенных микроорганизмов. Было показано, что полученные микроорганизмы принадлежат к двум основным филумам *Actinobacteria* (родам *Brevibacterium*, *Citricoccus*, *Kocuria*, и *Dietzia*) и *Firmicutes* (родам *Lactigenium* и *Bacillus*). Изучение липолитической активности выделенных микроорганизмов продемонстрировало наличие у них липолитических ферментов с различной субстратной специфичностью.

Проведено исследование липолитической системы *P. cryohalolentis*, выделенного ранее из криопэга Колымской низменности (Bakermans et al., 2006). Продемонстрировано наличие как внеклеточной, так и внутриклеточной липолитической активности у этого микроорганизма. При понижении температуры культивирования наблюдалось увеличение липолитической активности данного штамма, что позволило предположить наличие у *P. cryohalolentis* холодоактивных липолитических ферментов. На основании имеющихся данных полногеномного секвенирования с помощью методов биоинформатики смоделирована липолитическая система этого микроорганизма, включающая внутри- и внеклеточные липолитические ферменты с различной субстратной специфичностью.

Нами сконструированы эффективные системы экспрессии в клетках *E. coli* потенциальных холодоактивных липолитических ферментов *P. cryohalolentis*, разработаны методики их выделения и рефолдинга. Выделенные ферменты были подробно охарактеризованы. Установлено, что EstPc является относительно термостабильной эстеразой, обладающей высокой активностью при низких температурах, Lip1Pc - липазой, способной эффективно утилизировать при пониженных температурах субстраты с длиной углеводородной цепи C₁₀-C₁₂, а Lip2Pc - холодоактивным липолитическим ферментом, способным использовать субстраты с длиной углеводородной цепи C₁₄-C₁₆ и обладающим относительно высокой термостабильностью.

Исследование свойств данных белков подтвердило ранее сконструированную модель липолитической системы *P. cryohalolentis*. и обнаружило наличие активности в широком температурном диапазоне и относительной термостабильности у двух полученных в работе липаз. Такие свойства существенно отличают эти ферменты от ранее изученных

холодоактивных биокатализаторов и делают их интересными объектами для структурно-функциональных исследований и биотехнологического применения.

Результаты работы позволяют утверждать, что криопэги являются перспективным источником для получения штаммов-продуцентов ферментов, в частности, обладающих липолитической активностью при низких температурах и повышенной солености.

ВЫВОДЫ

1. Создана и охарактеризована коллекция микроорганизмов из 20 штаммов, выделенных из криопэгов Колымской низменности, п-ова Ямал и Аляски - потенциальных продуцентов холодоактивных липолитических ферментов.

2. Установлено, что выделенные культуры принадлежат к двум основным филумам *Actinobacteria* (родам *Brevibacterium*, *Citricoccus*, *Kocuria* и *Dietzia*) и *Firmicutes* (родам *Lactigenium* и *Bacillus*).

3. С помощью методов биоинформатики в геноме *P. cryohalolentis* идентифицированы гены потенциальных липолитических ферментов. Проведены амплификация и клонирование трех генов (*estPc*, *lip1Pc* и *lip2Pc*), кодирующих холодоактивные липолитические ферменты *P. cryohalolentis*.

4. Сконструированы высокоэффективные системы экспрессии в *E. coli* генов *estPc*, *lip1Pc*, *lip2Pc*, а также гена липазоспецифического шаперона *lifPc*. Разработаны методики культивирования штаммов-продуцентов и очистки рекомбинантных белков. Разработана методика рефолдинга *in vitro* Lip2Pc с участием липазоспецифического шаперона LifPc.

5. Проведена функциональная характеристика полученных белков. Установлено, что EstPc обладает максимальной активностью в отношении короткоцепочечных субстратов (C₄), в то время как для белков Lip1Pc, Lip2Pc показана высокая липолитическая активность в отношении субстратов с относительно длинной углеродной цепью (C₁₂-C₁₆).

6. Продемонстрировано наличие высокой липолитической активности при низких температурах у всех выделенных белков и относительно высокая термостабильность белков EstPc и Lip2Pc.

СПИСОК ОПУБЛИКОВАННЫХ РАБОТ

1. **Novototskaya-Vlasova K.A.**, Petrovskaya L.E., Yakimov S.A., Gilichinsky D.A. Cloning, purification, and characterization of a cold-adapted esterase produced by *Psychrobacter cryohalolentis* K5^T from Siberian cryopeg. FEMS. **2012**. V. 82. P. 367-75.
2. Петровская Л.Е., **К.А. Новотоцкая-Власова**, Е.В. Спирина, Г.А. Хохлова, Е.М. Ривкина, Д.А. Гиличинский, Д.А. Долгих, академик РАН М.П. Кирпичников. Липолитические ферменты микроорганизмов из криопэгов вечной мерзлоты. Доклады Академии Наук. **2012**. Т. 445. С.102-105.
3. **Новотоцкая-Власова К.А.**, Петровская Л.Е., Ривкина Е.М., Долгих Д.А., Кирпичников М.П. Характеристика холодоактивной липазы *Psychrobacter cryohalolentis* K5^T и ее делеционных мутантов. Биохимия. **2013**. Т. 78. С. 501–512.
4. **Novototskaya-Vlasova K.A.**, Petrovskaya L.E., Kryukova E.A., Rivkina E.M., Dolgikh D.A., Kirpichnikov M.P. Expression and chaperone-assisted refolding of a new cold-active lipase from *Psychrobacter cryohalolentis* K5^T. Protein Expres. Purif. **2013**. V. 91. P. 96-103.
5. **Новотоцкая-Власова К.А.**, Петровская Л.Е., Щербакова В.А., Ривкина Е.М., Гиличинский Д.А. Патент №2478708. Рекомбинантная плазмидная ДНК рEstPc, кодирующая полипептид со свойствами эстеразы *Psychrobacter cryohalolentis* K5^T, и штамм бактерий *Escherichia coli* - продуцент полипептида со свойствами эстеразы *Psychrobacter cryohalolentis* K5^T. Дата выдачи патента **09.10.2012**.
6. Petrovskaya L.E., V.V. Chupin, S.V. Sychev, E. N. Lyukmanova, E.A. Kryukova, E.P. Lukashev, **К.А. Novototskaya-Vlasova**, et al. Biotechnological potential of Siberian permafrost.

The 10th European Workshop on Astrobiology, 6-8 September **2010**, Puschino, Russia. Abstract book, p.29.

7. **Novototskaya-Vlasova K.A.**, Petrovskaya L.E., Kryukova E.A., Gilichinsky D.A. Cloning and expression in *E.coli* of potential cold-active lipases produced by psychrotrophic bacterium *Psychrobacter cryohalolentis* K5^T. MicroPerm Workshop: An international workshop to initiate the circumpolar integration of permafrost microbiological studies, 8-10 November **2010**, Potsdam, Germany. Abstract book p. 29.

8. **Новотоцкая-Власова К.А.**, Петровская Л.Е., Крюкова Е.А., Гиличинский Д.А. Получение и свойства липаз психротрофного микроорганизма *Psychrobacter cryohalolentis* K5^T. Всероссийский симпозиум. Биологически активные вещества микроорганизмов: прошлое, настоящее, будущее, 2-4 февраля **2011**, Москва, Россия. Сборник тезисов с.88.

9. **Новотоцкая-Власова К.А.**, Петровская Л.Е., Крюкова Е.А., Гиличинский Д.А. Липолитическая система психротрофного микроорганизма *Psychrobacter cryohalolentis* K5^T. 15-ая школа-конференция молодых ученых. Биология – наука XXI века, 18-22 апреля **2011**, Пущино, Россия. Сборник тезисов с.133.

10. **Новотоцкая-Власова К.А.**, Петровская Л.Е., Крюкова Е.А., Гиличинский Д.А. Психротрофный микроорганизм *Psychrobacter cryohalolentis* K5^T как продуцент холодоактивных липолитических ферментов. VII Молодежная школа-конференция. Актуальные проблемы современной микробиологии, 24-26 октября **2011**, Москва, Россия. Сборник тезисов с.130.

11. **Новотоцкая-Власова К.А.**, Петровская Л.Е., Крюкова Е.А., Гиличинский Д.А. Конструирование штаммов-продуцентов холодоактивных липаз на основании геномного и протеомного анализа *Psychrobacter cryohalolentis* K5^T. Международная научно-практическая конференция. Постгеномные методы анализа в биологии, лабораторной и клинической медицине, 14-17 ноября **2011**, Новосибирск, Россия. Сборник тезисов с.205.

12. Петровская Л.Е., Лукашев Е.П., **Новотоцкая-Власова К.А.**, Крюкова Е.А., Сычев С.В., Спирина Е.В., Ривкина Е.М., Гиличинский Д.А., Долгих Д.А., Кирпичников М.П. Микробные сообщества Вечной мерзлоты как источник новых генов для биотехнологии. V Российский симпозиум. Белки и Пептиды, 8-12 августа **2011**, Петрозаводск, Россия. Сборник тезисов с.78.

13. Петровская Л.Е., Лукашев Е.П., **Новотоцкая-Власова К.А.**, Спирина Е.В., Ривкина Е.М., Долгих Д.А. Молекулярные механизмы адаптации микроорганизмов из вечной мерзлоты. Междисциплинарная конференция. Адаптационные стратегии живых систем, 11-16 июня **2012**, Новый Свет, Украина. Сборник тезисов с. 397

14. Петровская Л.Е., Долгих Д.А., **Новотоцкая-Власова К.А.**, Спирина Е.В., Ривкина Е.М. Структурно-функциональные исследования белков микроорганизмов из вечной мерзлоты. 1-ая Всероссийская научная школа-конференция по астробиологии. 16-19 сентября **2012**, Пущино, Россия. Сборник тезисов с. 56.

15. Petrovskaya L.; **Novototskaya-Vlasova K.**; Rivkina E.; Dolgikh D. Structure-functional study of "permafrost-adapted" proteins. 12th European Workshop on Astrobiology "EANA'12". 15-18 October **2012**, Стокгольм, Швеция. Abstract book p. 69.

16. **Новотоцкая-Власова К.А.**, Петровская Л.Е., Крюкова Е.А., Гиличинский Д.А. Эффективный рефолдинг in vitro холодо-активной липазы психротрофного микроорганизма *Psychrobacter cryohalolentis* K5^T. VIII Молодежная школа-конференция. Актуальные проблемы современной микробиологии, 29-31 октября **2012**, Москва, Россия. Сборник тезисов с.29.

17. **Новотоцкая-Власова К.А.**, Петровская Л.Е., Ривкина Е.М. Характеристика липолитических ферментов психротрофного микроорганизма *Psychrobacter cryohalolentis* K5^T. 17-ая школа-конференция молодых ученых. Биология – наука XXI века, 21-26 апреля **2013**, Пущино, Россия. Сборник тезисов с.128.

18. **Novototskaya-Vlasova K.A.**, Petrovskaya L.E., Rivkina E.M. Characteristic of properties of lipolytic enzymes from psychrotrophic bacterium *Psychrobacter cryohalolentis* K5^T. Earth Cryology: XXI Century, 29 сентября - 3 октября **2013**, Пушино, Россия. Сборник тезисов с.81.
19. **Novototskaya-Vlasova K.**, G. Khokhlova, L. Petrovskaya, E. Kryukova, E. Rivkina, A. Vologzhannikova, S. Permyakov, D. Dolgikh, M. Kirpichnikov The residues adjacent to active site of cold-active esterase EstPc from permafrost bacterium *Psychrobacter cryohalolentis* K5^T are crucial for structural stability of the enzyme. 10-th International congress. Extremophiles-2014, 7-11 September **2014**, Saint-Petersburg, Russia. Abstract book p. 79.