

PHOTON-M-2 EXPERIMENT MANAGEMENT PLAN

1. EXPERIMENT TITLE: "PLASMID"

Spaceflight Effects on Structural Stability and Genetic Information Transfer in Plasmid pIJ702 of Actinomycetes *Streptomyces lividans* 66

2. PRINCIPAL INVESTIGATORS:

From Russia: Dr. Tatiana A. Voeikova, Genetics Research Center

From US: Dr. Barry H. Pyle, Montana State University, Bozeman, Montana

3. CO-INVESTIGATORS:

From Russia: Dr. Tabakov Viacheslav, Genetics Research Center

From US: Dr. Elinor deLancey Pulcini, Montana State University, Bozeman

4. OBJECTIVES:

1. To study spaceflight effects on genetic structures
2. To identify the pattern and mechanism of genetic changes
3. To determine relationships between the changes and specific spaceflight factors

5. BACKGROUND/HYPOTHESES:

The streptomycetes are actinobacteria which grow as a mycelium with branching filaments or hyphae and form conidial fruiting bodies. Although they were originally classified as lower fungi, they are now considered to be Gram-positive bacteria. They are responsible for the "earthy" odor of soil, and many produce antibiotics like streptomycin. The plasmid pIJ702 codes for thiostrepton resistance. Thiostrepton is a highly modified multicyclic peptide antibiotic best known as an inhibitor of protein synthesis. Thiostrepton is also a potent activator of gene expression in *S. lividans*. The primary significance of this research lies in the understanding of the stability and expression of plasmid and chromosomal genes in spaceflight compared to that on earth.

Streptomyces bacteria are characterized by a high genome instability that causes the formation of a variety of spontaneous and induced mutagens, which frequently have discernible phenotypic manifestations. Therefore, the status of streptomycetes genome may serve as a sensitive indicator of spaceflight effects on the genetic apparatus of exposed biospecimens.

Our proposal is to use as a test-object a multi-copy plasmid pIJ702, which is a simple and thoroughly examined component of streptomycetes genome. The distribution of plasmid DNA across a spore is known to be a random process that depends on plasmid replicon properties, microbial host characteristics and environmental parameters that may affect them. Metabolic changes in the host organism together with direct environmental effects on plasmid DNA may increase structural instability and cause gene mutations in the

plasmid itself. The mutation frequency can be identified by studying the expression of marker genes localized in plasmid DNA. Plasmid pIJ 702 carries a marker gene responsible for a dark pigment formed by host cells. A damage of this gene should result in discoloration of colonies carrying plasmid DNA.

The US collaborators propose the following analyses to enhance the scientific data produced by the experiment:

- 1) Using primers for the plasmid marker gene, polymerase chain reaction (PCR) would be performed to confirm that the plasmid marker is present in the strain that bore the plasmid.
- 2) To determine the plasmid copy number per cell, which may be affected by microgravity/spaceflight conditions, plasmid DNA would be separated from chromosomal DNA using standard molecular cloning techniques. The amount of plasmid DNA would then be quantified, and presence of the plasmid marker would be confirmed by PCR.
- 3) Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE) could be performed in our laboratory to provide detect point mutations on the plasmid. If chromosomal markers are available, these could also be analyzed for point mutations using DGGE. DNA bands from the DGGE gels would be sequenced using BigDye version 3.1 (ABI) and analyzed using the Sequencer Program. These assays would complement the Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) analysis (restriction analysis) proposed by the Russian investigators.

- 4) If suitably preserved and stowed samples can be provided, proteomic analyses would be possible. In addition, if RNA preservation is possible, the US collaborators could do Real Time PCR (RT-PCR) to assess relative translation of the plasmid under flight vs ground conditions.

Since it has been found that antibiotic production in similar microbes is enhanced in space, this research will contribute to the elucidation of how this occurs. Transgenic *S. lividans* and other species of streptomycetes have been used to express genes from a variety of other organisms including humans. There may be commercial benefit in the production of antibiotics or other compounds in space or manipulation of cultures on earth to produce larger amounts of valuable pharmaceuticals. The US research would focus on molecular analysis of *Streptomyces lividans* 66 plasmid pIJ 702 retention, stability and amplification in response to spaceflight conditions, to supplement and complement the analyses to be completed by the Russian investigators.

6. FLIGHT EXPERIMENT:

1. Overview:

The experiment will determine spaceflight effects on the stability of plasmid pIJ702 in the bacterium *Streptomyces lividans*. The organism produces conidial fruiting bodies (spores) which can be used to inoculate agar growth medium. The plasmid has two markers: 1) resistance to the antibiotic thiostrepton, and 2) production of melanin. Organisms that have the intact original plasmid will grow on a solid selective medium containing thiostrepton and produce black colonies with darkening of the medium around the colonies. The genetic sequence of the plasmid is prone to mutation, even in the absence of specific stresses that are likely to cause mutation. Mutations may be indicated by the loss of the ability of the organism to grow on thiostrepton selective medium, and/or loss of the dark melanin colony pigmentation. In addition, changes may be detected by molecular biology techniques including RFLP, PCR, and DGGE. Relative translation of the plasmid following growth under different conditions may be compared using Real Time PCR, and protein expression determined by Proteomic analyses. Petri dishes with growing microbes on agar are placed in a metal container (no temperature control).

2. Specimen Requirements:

Microbes grow on the surface of agar medium at 15-35 °C. At 20 °C the generation cycle is 14-16 days.

Flight Samples

Sixteen Petri dishes containing agar will be inoculated for the flight experiment. Half of the plates will be prepared with non-selective medium that does not contain thiostrepton. The other half will be prepared with selective thiostrepton agar. Thus, 8 plates containing selective medium and 8 plates containing non-selective medium will be prepared. Sterile growth medium will be poured aseptically into sterile plastic Petri dishes each with a diameter of 6 cm x 2cm. The plates will be sealed with parafilm to prevent release of volatile metabolic products or contamination by volatile compounds in the ambient environment.

Of each set of 8 plates, 4 will be prepared with rich nutrient medium (ISP agar) and 4 with minimal medium which contains only salts and agar. Half of the plates of each type of medium will be inoculated with a large number of spores using a heavy suspension (heavy inoculum). Typically, growth on these plates should be confluent, forming a lawn of colonies. The other half of the plates will be inoculated with a small number of spores using a diluted suspension (light inoculum). Growth on these plates should be discrete colonies. Each of the 8 medium-inoculum combinations will be prepared in duplicate. One of each duplicate plate will be used by Dr. Voeikova (8 plates) and one of each duplicate plate will be shipped to Montana State University for use by the Pyle Lab.

Selective Thiostrepton Medium				Non-selective Medium			
Rich ISP Agar		Minimal Medium		Rich ISP Agar		Minimal Medium	
Heavy inoculum	Light inoculum	Heavy inoculum	Light Inoculum	Heavy Inoculum	Light Inoculum	Heavy Inoculum	Light Inoculum
2 plates	2 plates	2 plates	2 plates	2 plates	2 plates	2 plates	2 plates

Ground Samples

Multiples of the above numbers of plates may be used for time-delayed-synchronous ground controls, to allow for changes according to temperature data to be provided during the flight. This will allow incubation of sets of plates at various time-points during the experiment to determine the effects of each stage of the flight preparation, orbital conditions, and return.

3. Data Requirements: – None

Data regarding in-flight and ground-control experimental operating conditions are requested by the US collaborators to be provided post flight.

4. Equipment Requirements: – None

5. Pre-flight Procedures:

- Microorganisms grown on agar medium in Petri dishes
- Petri dishes placed in a flight container
- Flight container placed in a biotransporter at 4-10 °C
- Biotransporter shipped to the launch site
- Flight container placed onboard Foton-M-2

6. In-flight Procedures: - None

7. Post-flight Procedures:

- Flight container removed from Foton-M-2
- Flight container placed in a biotransporter at 4-10 °C
- Biotransporter shipped to the Genetics Research Center
- Petri Dishes prepared for shipment to US collaborators at 4 °C (see 10.0 Biosample Preparation/Test Procedures)

7. CONTROL EXPERIMENT(S) :

To be performed simultaneously with the flight experiment as agreed upon with IMBP. Ground controls will be maintained at nominal (ambient) temperatures.

8. PRELAUNCH EXPERIMENTAL VERIFICATION TESTING:

1. Russian Tests

At a preparation stage:

- *Streptomyces lividans 66* glycerol suspension thawed or harvested from agar media.
- Plasmid carrying monoclonal with distinct expression of plasmid pigment forming gene (*mel*) selected
- Stability of plasmid pIJ702 DNA transfer measured in terms of thiostrepton resistance which depends on marker gene *tsr*
- Structural stability of plasmid DNA in plasmid carrying clones determined with respect to expression of marker gene responsible for pigment formation (*mel*)

2. Pre-flight testing:

- Comprehensive study of plasmid pIJ702 structural and genetic stability when *S. lividans 66* grows in the absence of antibiotic (non-selective growth)
- Comprehensive study of plasmid pIJ702 structural and genetic stability when *S. lividans 66* grows in the presence of antibiotic (selective growth)
- Growth of microbial spores in selective and non-selective Petri dishes

Tests with similar samples need to be performed in US to determine sample requirements.

9. SPECIMEN COLLECTION AND LABELING PROCEDURES: None

Labeling key will be provided to Pyle Lab with Petri dishes.

10. BIOSAMPLE PREPARATION/TEST PROCEDURES:

Biosamples are prepared at the Genetics Research Center. Genetic and molecular-biological methods are used.

Candidate protein preservatives include concentrated RNA Later (Ambion), a cocktail containing EDTA, TRIS, Phenylmethylsulfonylfluoride (PMSF) and dithiothreitol (DTT), or Protease Inhibitor Cocktail (Sigma P8465). In addition, if RNA preservation prior to shipping samples to the US is possible, Real Time PCR (RT-PCR) could be used to assess relative translation of the plasmid under flight vs ground conditions. In this case, samples fixed, as soon as possible post recovery, with a solution such as concentrated RNA Later (Ambion) or RNA Protect (Qiagen) would be required.

The US collaborators would use additional genetic and molecular-biological methods to significantly enhance the scientific results of the experiment. Provided that genetic sequence data is available, materials required for the US collaborators is available within their laboratory or can be readily purchased from a variety

of sources. All the equipment required to perform these experiments is available within the Department of Microbiology at Montana State University, Bozeman.

Results will be analyzed and submitted to international peer-reviewed scientific journals with joint authorship by the Russian investigators and US collaborators.

11. DATA SHEET AND/FLOW SHEET:

Electronic data, printed matter, photos

12. DATA TRANSFER AND ANALYSIS REQUIREMENTS/PROCEDURES:

1. Data Recording:

To be agreed upon with IMBP and other participants in the experiment

Data regarding in-flight and ground-control experimental operating conditions are requested by the US collaborators.

2. On-site Data Analysis: – None

FOTON-M-2 EXPERIMENT MANAGEMENT PLAN

1. EXPERIMENT TITLE: "PLASMID-F2"

Spaceflight Effects on Structural Stability and Genetic Information Transfer in Plasmid pIJ702 of actinomycetes *Streptomyces lividans* 66

2. PRINCIPAL INVESTIGATORS:

From Russia: Dr. Tatiana A. Voeikova, Genetics Research Center

From US: Dr. Barry H. Pyle, Montana State University, Bozeman, Montana

3. CO-INVESTIGATORS:

From Russia: Dr. Viacheslav Y. Tabakov, Genetics Research Center

From US: Postdoctoral Research Associate (To be determined), Montana State University, Bozeman

4. OBJECTIVES:

1. To study spaceflight effects on genetic structures of the microorganism
2. To identify the pattern and mechanism of genetic changes
3. To determine relationships between the changes and specific spaceflight factors

5. BACKGROUND/HYPOTHESES:

The streptomycetes are actinobacteria that grow as a mycelium and later form spore chains. Although they were originally classified as lower fungi, they are now considered to be Gram-positive bacteria. They are responsible for the "earthy" odor of soil, and many produce antibiotics like streptomycin. The plasmid pIJ702 was constructed from plasmid pIJ101 isolated from *Streptomyces coelicolor*. The gene for thiostrepton resistance and the gene for melanin production were cloned into the plasmid from chromosomes of different streptomycetes strains. Thiostrepton is a highly modified multicyclic peptide antibiotic best known as an inhibitor of protein synthesis. Thiostrepton is also a potent activator of gene expression in *S. lividans*. The primary goal of this research is to compare the stability and expression of plasmid and chromosomal genes in spaceflight and ground samples.

Since it has been found that antibiotic production in similar microbes may change in space, this research will contribute to the elucidation of how this occurs. Recombinant *S. lividans* and other species of streptomycetes have been used to express genes from a variety of other organisms including humans. There may be commercial benefit in the production of antibiotics or other compounds in space or manipulation of cultures on earth to produce larger amounts of valuable pharmaceuticals.

Streptomyces spp. are characterized by a high genome instability that causes the formation of a variety of spontaneous and induced mutagens, which frequently have discernible phenotypic manifestations. Therefore, the status of the streptomycete genome may serve as a sensitive indicator of spaceflight effects on the genetic apparatus of exposed biospecimens.

Our proposal is to use as a test-object a multi-copy plasmid pIJ702, which is a simple and thoroughly examined component of streptomycetes genome. The distribution of plasmid DNA across a spore is known to be a random process that depends on plasmid replicon properties, microbial host characteristics and environmental parameters that may affect them. Metabolic changes in the host organism together with direct environmental effects on plasmid DNA may increase structural instability and cause gene mutations in the plasmid itself. The mutation frequency can be identified by studying the expression of marker genes localized in plasmid DNA. Plasmid pIJ702 carries a marker gene responsible for a dark pigment, melanin, formed by host cells. A change in this gene should result in decolorization of colonies carrying plasmid DNA.

The US collaborators propose the following analyses to enhance the scientific data produced by the experiment:

1) Using primers for the plasmid marker gene, polymerase chain reaction (PCR) will be performed to confirm that the plasmid marker is present in the strain that bore the plasmid.

2) To determine the plasmid copy number per cell, which may be affected by microgravity/spaceflight conditions, plasmid DNA will be separated from chromosomal DNA using standard molecular cloning techniques. The amount of plasmid DNA will then be quantified, and presence of the plasmid marker will be confirmed by PCR.

3) Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE) will be performed to detect point mutations on the plasmid. If chromosomal markers are available, these can also be analyzed for point mutations using DGGE. DNA bands from the DGGE gels will be sequenced using BigDye version 3.1 (ABI) and analyzed using the Sequencer Program. These assays will complement the Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) analysis (restriction analysis) proposed by the Russian investigators.

4) Proteomic analyses using 2-D gel electrophoresis followed by MALDI-TOF analysis will be performed to determine differences in protein expression. In addition, if RNA is shown by the US investigator to be stable during the period from return to Earth to receipt in the US lab, the US personnel can prepare postflight samples in Dr. Voeikova's lab prior to shipment to the US and could do Real Time PCR (RT-PCR) to assess relative translation of the plasmid under flight vs ground conditions in Dr. Pyle's lab.

The US research will focus on molecular analysis of *S. lividans* 66 plasmid pIJ702 retention, stability and amplification in response to spaceflight conditions, to supplement and complement the analyses to be completed by the Russian investigators. While the study organism is not pathogenic, this experiment will provide information on genetic stability in bacteria. If spaceflight enhances growth of the bacteria and/or stimulates plasmid amplification causing increased thiostrepton resistance, it is likely that bacterial pathogens may be similarly affected. The results of this experiment will thus lead to insights into potential effects of spaceflight on the genetics of virulence in pathogenic bacteria. Possible changes in such pathogens may impact human health risks which will be a significant factor in future long-duration spaceflight missions, including those carrying crews to the moon and on to Mars.

6. FLIGHT EXPERIMENT:

1. Overview:

The experiment will determine spaceflight effects on the stability of plasmid pIJ702 in *S. lividans* 66. The organism produces spores, which can be used to inoculate agar growth medium. The plasmid has two markers: 1) resistance to the antibiotic thiostrepton, and 2) production of melanin. Organisms that have the intact original plasmid will grow on a solid selective medium containing thiostrepton and produce black colonies with darkening of the medium around the colonies. The genetic sequence of the plasmid is prone to mutation, even in the absence of specific stresses that are likely to cause mutation. Mutations may be indicated by the loss of the ability of the organism to grow on thiostrepton selective medium, and/or loss of the dark melanin colony pigmentation. In addition, changes may be detected by molecular biology techniques including RFLP, PCR, and DGGE. Relative translation of the plasmid following growth under different conditions may be compared using Real Time PCR, and protein expression determined by Proteomic analyses.

2. Specimen Requirements:

Microbes grow on the surface of agar medium at 15-35 °C. At 20 °C the generation cycle is 14-16 days. During flight Petri dishes with growing microbes on agar will be stowed in a metal container (no temperature control).

Flight Samples

Sixteen Petri dishes containing agar will be inoculated for the flight experiment. Half of these plates will be prepared with non-selective medium that does not contain thiostrepton. The other half will be prepared with selective thiostrepton agar. Thus, 8 plates containing selective medium and 8 plates containing non-selective medium will be prepared. Sterile growth medium will be poured aseptically into sterile plastic Petri dishes each with a diameter of 6 cm and 2 cm deep.

Half of the plates of each type of medium (4 each) will be inoculated with a large number of spores using a heavy suspension (heavy inoculum). Typically, growth on these plates should be confluent, forming a lawn of colonies. The other half of the plates (4 each) will be inoculated with a small number of spores using a diluted suspension (light inoculum). Growth on these plates should be discrete colonies. The plates will be sealed with parafilm to prevent release of volatile metabolic products or contamination by volatile compounds in the ambient environment. Two plates of each medium / inoculum combination will be used by Dr. Voeikova

(8 plates) and two plates of each medium/inoculum combination will be provided for use by the Pyle Lab (8 plates).

Selective Thiostrepton Medium		Non-selective Medium	
Rich ISP agar		Rich ISP agar	
Heavy Inoculum	Light Inoculum	Heavy Inoculum	Light Inoculum
4 plates	4 plates	4 plates	4 plates

3. Data Requirements:

The US collaborators request information on the formulation and preparation of media, as well as the growth and preparation of the microorganism for the two types of inoculation. This information will be used for preflight trials and the postflight simulation experiment. They also request data regarding in-flight and ground-control experimental operating conditions to be provided postflight.

4. Equipment Requirements: None.

5. Pre-flight Procedures:

- Microorganisms grown on agar medium in Petri dishes
- Petri dishes placed in a flight container
- Flight container placed in a biotransporter at $4 \pm 2^\circ\text{C}$
- Biotransporter shipped to the launch site
- Flight container placed onboard Foton-M-2

6. In-flight Procedures: – None

7. Post-flight Procedures:

- Flight container removed from Foton-M-2
- Flight container placed in a biotransporter at $4 \pm 2^\circ\text{C}$
- Biotransporter shipped to the Dr. Voeikova's lab
- U.S. personnel will sample, fix and freeze bacterial growth from the set of Petri dishes provided.
- Samples will be shipped to the US by US personnel.

7. CONTROL EXPERIMENTS:

There are two control experiments, one time-delayed synchronous and one laboratory control. The synchronous control experiment will be performed with a one day delay from the flight experiment, using actual down-linked temperature data as agreed upon with IMBP and at IMBP facilities. The laboratory control experiment will be performed at Dr. Voeikova's laboratory, using nominal transport/incubation temperatures and actual flight experiment timelines (to be provided from the time of turnover). This will allow examination of plates at various time-points during the experiment to determine the status of the cultures at different stages.

8. PRELAUNCH EXPERIMENTAL VERIFICATION TESTING:

1. Russian Tests:

At the preparation stage:

- Growth of *S. lividans* 66 plasmid pIJ702 on agar media
- Plasmid carrying monoclonal with distinct expression of the plasmid pigment forming gene *mel* selected
- Stability of plasmid pIJ702 DNA transfer measured in terms of thiostrepton resistance which depends on the marker gene *tsr*
- Structural stability of plasmid DNA in plasmid carrying clones determined with respect to expression of the marker gene responsible for pigment formation *mel*.

Preflight testing:

- Comprehensive study of plasmid pIJ702 structural and genetic stability when *S. lividans* 66 grows in the absence of antibiotic (non-selective growth)
- Comprehensive study of plasmid pIJ702 structural and genetic stability when *S. lividans* 66 grows in the presence of antibiotic (selective growth)

- Growth of microbial spores in selective and non-selective Petri dishes

The US will provide pipettes, a digital camera, and a digital recording thermometer.

2. U.S. Tests:

Tests using *S. lividans* 66 strain with plasmid pIJ702 obtained from the Genetics Research Center collection and media components similar to those used in Dr. Voeikova's lab will be performed for preflight testing and a postflight simulation study.

3. Integrated Russian and U.S. Tests: None

9. SPECIMEN COLLECTION AND LABELING PROCEDURES:

Labeling key will be provided to Pyle Lab with Petri dishes containing cultures.

10. SPECIMEN PREPARATION/TEST PROCEDURES:

Petri dishes will be prepared by Dr. Voeikova's lab personnel and analyzed using genetic and molecular biology methods.

The US collaborators will use additional genetic and molecular biology methods to significantly enhance the scientific results of the experiment. Materials required for the US collaborators are available within their laboratory or can be readily purchased from a variety of sources. All the equipment required to perform these experiments is available within the Department of Microbiology at Montana State University, Bozeman.

11. DATA SHEET AND/OR FLOW SHEET:

Electronic data, printed matter, photos

12. DATA TRANSFER AND ANALYSIS REQUIREMENTS/PROCEDURES:

1. Data Recording:

Data regarding in-flight and ground-control experimental operating conditions are requested by the US collaborators.

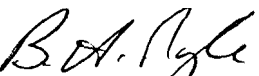
2. On-site Data Analysis: – None

13. PHOTO/DIAGRAMS:

To be attached to final science report.

This document was signed on March 11, 2005 by:

For the US side:



Dr. Barry H. Pyle

For the Russian side:



Dr. Tatiana A. Voeikova

PROPOSAL FOR COLLABORATION ON FOTON M-2 MISSION

We will require no new equipment for this study. The study will require -1 year to complete. Resources for a dedicated postdoctoral fellow or graduate student and partial salary support for the PI would be requested. Additionally, modest M&O would be required for charges in the proteomics center and for the lab.

Specify linkage to Exploration Initiative / Critical Path Roadmap;

Protection of the crew from infectious agents is a concern expressed in the NASA Critical Path Roadmap. It remains unknown as to how bacteria will respond and adapt to long term spaceflight. *Streptomyces* species are common environmental contaminants and likely to be present on space craft. These experiments to describe on a molecular level the adaptation of the bacteria to the space environment will provide important information to begin to formulate a rational risk assessment for infectious disease microbes in long term space flight. It will also validate the LSMMG model as to its reliability as a ground based model.

List/describe current NA8A grant or other funding for ongoing related activities;

Streptococcus pneumoniae gene expression and virulence potential in the Space environment.

Cooperative agreement - NCC - 2-1160

The experimentation is organized into three specific objectives. Experiments will be performed to identify and characterize *S. pneumoniae* genes which are differentially expressed in response to the space environment or in response to LSMMG using high aspect rotating vessels. The second objective will be to investigate the expression of known *S. pneumoniae* virulence genes or properties in LSMMG. Finally, we will determine if *S. pneumoniae* genes differentially expressed in LSMMG or during space flight are also expressed during animal infection.

Proposal for collaboration on Foton M-2 Mission

Please prepare a short (1 or 2 page) description of collaborative activities for the Foton M-2 mission (see basis for activity, background information, and experimental descriptions on following pages). This should include the following:

Your Name: Richard Boyle, Ph.D., NASA Ames Research Center

Potential additional collaborators:

Experiment Title: "RECEPTOR" Neural Readaptation of Crayfish Statolith Receptors to Earth's Gravity Following Return from Space.

Description of collaborative research activity. (Include materials, supplies, equipment or other support needed – see constraints in background section below.)

The Ames team is prepared to help in all phases. In-flight recordings would be highly desired, but the post-flight study of readaptation is of particular merit, and would be complementary to our past Shuttle missions. Once the crayfish are retrieved, we will identify the presumed changes that occurred in the statocyst organ as a result of the exposure to microgravity, and following the readaptation of the neural system to the normal 1 g environment.

Introduction: Only recently did we learn that adaptation of physiological response in the gravito-inertial sensing organs can occur rapidly in an organism in direct response to a change in gravitational force (Boyle R, Mensinger AF, Yoshida K, Usui S, Intravala A, Tricas T, and Highstein SM. Neural readaptation to 1G following return from space. *J. Neurophysiol*, 86: 2118-2122, 2001). Within the first day after STS-90 and STS-95 shuttle landing, a hypersensitivity was observed. The magnitude of response of toadfish utricular afferents to applied translations was enhanced on average three-times greater than for controls. The reduced gravity in orbit apparently resulted in an upregulation of afferent sensitivity. The time course of return to normal afferent sensitivity parallels the reported decrease in vestibular disorientation in astronauts after return from space. While our data do not pinpoint a mechanism, the observed changes are assumed limited to a few possibilities: a) an increase in the sensitivity of the transducer, b) a temporary structural alteration affecting the mechanoreception of the otolith, or otolith-stereociliary coupling that causes an enhanced bundle deflection for a given movement, or c) a pre- or post-synaptic alteration in the strength of synaptic

transmission. Since the number of synaptic ribbons in certain type II hair cells in rodent is labile, increasing following exposure to microgravity (Ross 2000), an increase in number of synaptic ribbons in toadfish otolith hair cells following exposure to microgravity could potentially explain the present results.

Our Contribution: Our team has the expertise from the STS-90 and -95 missions, we published our results in the Journal of Neurophysiology (see above), and we have all the necessary hardware and software in place, operational, and available for the project. We recently constructed an acceleration platform to study the neural responses of fish lagenar afferents to

Proposal for collaboration on Foton M-2 Mission

control vertical accelerations and vibrations. The device is ideal for the study of readaptation of crayfish statocyst afferents to 1g following the exposure to a space mission. The acceleration system consists of a 40 pounds peak sine force permanent magnet shaker with a 2.5 cm stroke (displacement), with a frequency range of DC to 6.5Khz, attached to baseplate; the baseplate is supported by four linear bearings and pneumatic lifts. The shaker is driven by an air-cooled, direct-coupled audio amplifier. Multi-axis micromanipulators are attached by posts to the baseplate to allow glass (preferably) or metal electrodes to penetrate the nerve for responding the electrical activity of individual nerve afferent fibers. All neurophysiological equipment is available, including amplifiers, buffer amplifiers, oscilloscopes, micropipette pullers, etc. Afferent activity and signals from accelerometers attached to the baseplate are digitized using an external computer interface (CED 1401 Plus) and recorded using Spike2 acquisition software on a Pentium PC. The data are analyzed using routines already written in Wavemetrics Igor.

Experimental Protocol: Upon landing the crayfish will be prepared for electrophysiological experiments. The electrical activity of individual afferent fibers supplying the statocyst on one or both sides will be recorded using routine techniques. The afferent response modulation to controlled inertial acceleration along the z-axis parallel to the earth's vertical will be examined in both the amplitude and frequency domains at progressive time intervals following landing. A sufficient sample of afferent fibers will be examined in each crayfish (e.g. 20-30 fibers) over a roughly 3 hour period for each recording session. A separate experiment will begin, followed progressively by each crayfish. The recording sessions will then be repeated in each crayfish to provide another sample of afferents at a new time. Tissue will be extracted at the end of the experiment where possible for evaluation of the mechanoreceptor to afferent synaptic junction at both the scanning and transmission electron microscopic levels.

Needs: General supplies associated with crayfish, including crayfish. Currently, there are 2 aquaria in use for the toadfish projects. One could be converted for freshwater crayfish use; however, it is best to obtain a simple, self-contained freshwater system. We will need to do preliminary experiments to identify the recording requirements in this invertebrate to ensure all is appropriate for the recording sessions after M-2 landing. The Russian team should be skilled in the dissection to visualize the statolith nerve in the crayfish. It might be useful to spend a week with them early on to finalize the dissection procedures and data collection procedures. At Ames we can perform the necessary control experiments before and after the launch to establish the required benchmarks upon which to correlate the results obtained from the space crayfish.

Equipment Issues: The electrophysiological equipment and data acquisition system run under 120V (60Hz). The most sensitive instrument is the intracellular amplifier and it can operate on 220 V (50 Hz). It is recommended to have a 220-110 V transformer and preferably a 50-60 Hz converted. All equipment is commercially available worldwide, the lab-defined software is written in C-like language and has no commercial or proprietary value.

FOTON -M2 EXPERIMENT PLAZMIDA

Experiment Design and Proposed Collaboration

Note: The following is a discussion document and proposal which does not represent a commitment by either laboratories or agencies.

Introduction

The experiment will determine spaceflight effects on the stability of plasmid pIJ702 in the bacterium *Streptomyces lividans*. The organism produces conidial fruiting bodies (spores) which can be used to inoculate agar growth medium. The plasmid has two markers: 1) resistance to the antibiotic thiostrepton, and 2) production of melanin. Organisms that have the intact original plasmid will grow on a solid selective medium containing thiostrepton and produce black colonies with darkening of the medium around the colonies. The genetic sequence of the plasmid is prone to mutation, even in the absence of specific stresses that are likely to cause mutation. Mutations may be indicated by the loss of the ability of the organism to grow on thiostrepton selective medium, and/or loss of the dark melanin colony pigmentation. In addition, changes may be detected by molecular biology techniques including RFLP, PCR, and DGGE. Relative translation of the plasmid following growth under different conditions may be compared using Real Time PCR, and protein expression determined by Proteomic analyses.

Flight Samples

Sixteen Petri dishes containing agar will be inoculated for the flight experiment. Half of the plates will be prepared with non-selective medium that does not contain thiostrepton. The other half will be prepared with selective thiostrepton agar. Thus, 8 plates containing selective medium and 8 plates containing non-selective medium will be prepared. Sterile growth medium will be poured aseptically into sterile plastic Petri dishes each with a diameter of 6 cm x 2cm. The plates will be sealed with parafilm to prevent release of volatile metabolic products or contamination by volatile compounds in the ambient environment.

Of each set of 8 plates, 4 will be prepared with rich nutrient medium (ISP agar) and 4 with minimal medium which contains only salts and agar. Half of the plates of each type of medium will be inoculated with a large number of spores using a heavy suspension (heavy inoculum). Typically, growth on these plates should be confluent, forming a lawn of colonies. The other half of the plates will be inoculated with a small number of spores using a diluted suspension (light inoculum). Growth on these plates should be discrete colonies. Each of the 8 medium-inoculum combinations will be prepared in duplicate. One of each duplicate plate will be used by Dr. Voeikova (8 plates) and one of each duplicate plate will be shipped to Montana State University for use by the Pyle Lab.

Selective Thiostrepton Medium				Non-selective Medium			
Rich ISP Agar		Minimal Medium		Rich ISP Agar		Minimal Medium	
Heavy inoculum	Light inoculum	Heavy inoculum	Light Inoculum	Heavy Inoculum	Light Inoculum	Heavy Inoculum	Light Inoculum
2 plates	2 plates	2 plates	2 plates	2 plates	2 plates	2 plates	2 plates

Ground Samples

Multiples of the above numbers of plates may be used for time-delayed-synchronous ground controls, to allow for changes according to temperature data to be provided during the flight. This will allow incubation of sets of plates at various time-points during the experiment to determine the effects of each stage of the flight preparation, orbital conditions, and return. For example, the following points may be used:

- 1) Immediately after inoculation, loading and shipping of the flight samples at 4 °C (Launch -4 days, L-4).
- 2) At time of loading samples into FOTON module (L-3 days)
- 3) At time of launch (L-0 hours), which is F light Day zero (FDO).
- 4) At time of commencing descent (FD16).
- 5) At time of recovery from the module, or Return (R+0).
- 6) At time of return of samples to the Voeikova Laboratory at the Genetics Institute in Moscow, about return plus 12 hours (R+~12h)

In practice, some of these sampling time points may be eliminated, based on the results of prior ground experiments. For plates incubated at L-4, L-3 and FDO, incubation will be done at the nominal temperature of

20 °C for 16 days. For plates incubated at R+0 and R+~12h, incubation will be done according to actual time and temperature data obtained from the flight records. Additional sets of plates may be prepared for incubation at R+0 and R+~12h using the nominal 20 °C for 16 days.

Following incubation of the Ground Sample plates, they will be examined for colony growth and pigmentation. Plates for selected sampling points will be analyzed for comparison with Flight Sample plates.

Examination of Plates and Sample Preparation Following Growth Incubation Voeikova Lab

- 1) Each plate will be examined for colony growth and pigmentation. Where possible, the number of colonies of different types will be counted and recorded. Plates with colonies too numerous to count or confluent growth will be recorded.
- 2) Photos will be taken
- 3) Samples of growth will be prepared for use by the Voeikova Laboratory.
- 4) Flight and Control Petri dishes will be shipped to Pyle Laboratory at 4°C.

Pyle Lab

- 1) Each plate will be examined for colony growth, pigmentation, and differentiation.
- 2) Photos will be taken
- 3) The requirements for sample preparation for each laboratory will be determined by the Principal Investigators. Samples to be shipped to Montana State University will be sub-sampled into separate containers, preserved as appropriate to the analyses to be performed, and frozen.

Analyses to be Performed

- The Voeikova laboratory will determine the numbers of spores and colony types on plates from each growth condition, and will also perform Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) analyses.
- The Pyle laboratory will use a standard assay, e.g. total protein, to quantify the total number of cells or spores and material in each sample. Depending on sample volumes and demonstration of appropriate preservation methods, and if plasmid DNA can be separated from chromosomal DNA, they will perform polymerase chain reaction (PCR) experiments to determine the presence or absence of the original plasmid sequence. If there is sufficient sample, denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) will be performed to detect point mutations on the plasmid, complementing the results of RFLP analyses. Selected protein samples will be subjected to proteomic analyses to detect differences in protein expression. If samples of preserved RNA can be obtained in sufficient quantities, Real Time PCR (RT-PCR) will also be possible.

The analyses to be performed will be established prior to the flight experiment.

Ground Studies and Preparations Prior to Flight

- 1) The Pyle Laboratory will obtain a culture of the organism from a commercial vendor, e.g. the American Type Culture Collection. The specific strain will be recommended by the Voeikova Laboratory. Standard formulations for media and other reagents, and procedures, will be provided by the Voeikova Laboratory. The Pyle Laboratory will grow up the stock culture according to procedures and directions from the Voeikova Laboratory. Growth from these cultures will be used for the development of molecular procedures to be used by the Pyle Laboratory. This will commence immediately upon approval of the collaboration.
- 2) Sequence data for the preparation of genetic primers will be determined by discussion between the laboratories and from the literature.
- 3) The Voeikova Laboratory, with support of IMBP personnel, will arrange for export of culture(s) of the specific strain being used in their laboratory. The Pyle laboratory, with support of NASA personnel, will arrange for import of these cultures to the United States. These cultures will be used to further define the procedures to be used by the Pyle Laboratory. This transfer will be arranged by the Fall of 2004 (November).
- 4) IMBP and the Voeikova Laboratory will arrange for export of flight samples and ground controls from the Voeikova Laboratory. NASA and the Pyle Laboratory will arrange for import of these samples to the US.
- 5) It will be determined by negotiation among the laboratories and agencies if it is necessary to run a verification test of the experiment, including shipping, prior to the flight experiment.

Questions and Discussion Points

- a) Does the Voeikova Lab have information on colony characteristics after growth on the proposed media? Yes. Voeikova Lab will send photos of colonies (on all 4 media types) by mail.
- b) Have any experiments been done using the nominal timeline and conditions for the flight experiment? Nominal conditions such as: 2 days at 4°C has no visible growth, 16 days colonies begin to develop, descent (1 hr) and 12 hr transport. Timeline study has been done for other bacteria but not this one.
- c) Does the Voeikova Laboratory have plasmid sequence data they could provide? Yes. She will provide publication.
- d) What are the formulations of the media, including the concentration of thiostrepton? What is the source of thiostrepton (manufacturer, brand, description and catalogue number)? Yes. She will provide by email. Thiostrepton is a Sigma product.
- e) Are there any specific medium components or growth requirements that work better than others, e.g. sources of materials? Materials, even yeast extract, are from Sigma. She will provide by email. Yeast, malt and peptone in particular. Agar is from Difco.
- f) Are there any special safety hazards associated with this organism, and what is the Biosafety Level number? Biosafety is probably 1. Aseptic handling will be required.
- g) Does Dr. Voeikova have any publications or reports on this organism, particularly with respect to spaceflight experiments? No. Reports but they are not published.
- h) Petri dishes are Sigma cat #? Yes. She will provide.
- i) Copy of lab Protocol? Yes. She will provide

ПЛАН ПРОВЕДЕНИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА "ПЛАЗМИДА" ПО ПРОЕКТУ "ФОТОН"-М-2

1. НАЗВАНИЕ ЭКСПЕРИМЕНТА: "ПЛАЗМИДА"

2. ОТВЕТСТВЕННЫЙ ИСПОЛНИТЕЛЬ:

От России: Д-р Т. А. Воейкова, Государственное унитарное предприятие – Генетический исследовательский центр

От США: Д-р Барри Пайл, Университет штата Монтана, Боузмэн, Монтана

3. ЗАДАЧИ И ГИПОТЕЗЫ:

Стрептомицеты представляют собой актинобактерии, образующие в процессе роста мицелий с ветвящимися нитями или гифами и конидиальные плодовые тела. Ранее их относили к низшим грибам, но теперь рассматривают как грамположительные бактерии. Именно они придают свежескопанной земле характерный запах. Многие стрептомицеты продуцируют антибиотики, например стрептомицин. Штаммы *Streptomyces lividans* могут иметь плазмиду, запрограммированную на продукцию метиленомицина А. Из некоторых штаммов *S. lividans* выделена плазида рIJ702, участвующая в образовании тиострептона, который представляет собой высоко модифицированный мультициклический пептид, хорошо известный как ингибитор белкового синтеза. Тиострептон также является мощным активатором генной экспрессии в *S. lividans*. Основная цель данного исследования – сравнить стабильность и экспрессию плазмидных и хромосомных генов в полетном и наземном материале. Установлено, что продукция антибиотиков у аналогичных микроорганизмов увеличивается в условиях космического полета. Данный эксперимент может помочь понять механизмы указанного явления. Трансгенные *S. lividans* и другие виды стрептомицетов использовались для изучения генной экспрессии у целого ряда других организмов, включая человека. Продукция антибиотиков или других препаратов в космосе или модификация культур на земле с целью получения больших объемов ценных фармакологических препаратов может иметь практическое значение. Задачей нашего исследования будет проведение молекулярного анализа плазмиды рIJ702 *S. lividans* бб, ее сохранения, стабильности и амплификации под действием факторов космического полета. Полученные результаты послужат дополнением к исследованиям, проводимым российскими специалистами.

- 1) Используя праймеры для маркерного гена плазмиды, проводится полимеразная цепная реакция (ПЦР) с тем, чтобы подтвердить присутствие маркера в несущем плазмиду штамме.
- 2) Для определения числа копий плазмиды на клетку, которое может изменяться под действием факторов космического полета и, в первую очередь, невесомости, проводят разделение плазмидной и хромосомной ДНК с применением стандартных методов молекулярного клонирования. Затем проводят количественное определение плазмидной ДНК и проверяют наличие маркера с помощью ПЦР.
- 3) В нашей лаборатории можно провести гель-электрофорез в денатурирующем градиенте (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis -DGGE) с целью выявления точечных мутаций на плазмиде. При наличии хромосомных маркеров их также можно проанализировать на присутствие точечных мутаций с помощью DGGE. Последовательность полосок ДНК в геле определяется с помощью BigDye версия 3.1 (ABI) и анализируется с использованием Программы секвенирования (Sequencer Program). Упомянутые методы анализа являются дополнением к методу рестрикционного анализа (Restriction Fragment Length Polymorphism – RFLP), предложенному российскими исследователями.
- 4) В случае адекватной сохранности биоматериала, мы можем провести детальный анализ белкового комплекса. Кроме того, если удастся получить РНК, то мы сможем сравнить трансляцию плазмиды в полетном и наземном биоматериале методом ПЦР в реальном времени (RT-PCR).

Предлагаемые нами исследования и методики позволят значительно пополнить результаты эксперимента.

4. ПОЛЕТНЫЙ ЭКСПЕРИМЕНТ:

1. Общее описание

1. Используя праймеры для маркерного гена плазмиды, проводится полимеразная цепная реакция (ПЦР) с тем, чтобы подтвердить присутствие маркера в несущем плазмиду штамме.
2. Для определения числа копий плазмиды на клетку, которое может изменяться под действием факторов космического полета и, в первую очередь, невесомости, проводят разделение плазмидной и хромосомной ДНК с применением стандартных методов молекулярного клонирования. Затем проводят количественное определение плазмидной ДНК и проверяют наличие маркера с помощью ПЦР.
3. В нашей лаборатории можно провести гель-электрофорез в денатурирующем градиенте (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis -DGGE) с целью выявления точечных мутаций на плазмиде. При наличии хромосомных маркеров их также можно проанализировать на присутствие точечных мутаций с помощью DGGE. Последовательность полосок ДНК в геле определяется с помощью BigDye версия 3.1 (ABI) и анализируется с использованием Программы секвенирования (Sequencer Program). Упомянутые методы анализа являются дополнением к методу рестрикционного анализа (Restriction Fragment Length Polymorphism - RFLP), предложенному российскими исследователями.
4. В случае адекватной сохранности биоматериала, мы можем провести детальный анализ белкового комплекса. Кроме того, если удастся получить РНК, то мы сможем сравнить трансляцию плазмиды в полетном и наземном биоматериале методом ПЦР в реальном времени (RT-PCR).

2. Требования к биообъектам:

Нам хотелось бы получить 3 образца биоматериала, каждый объемом 1 мл, если его выращивают в жидкой среде. Если биоматериал выращивают на твердом агаре, то требуемый объем будет зависеть от клеточной концентрации. При выращивании на твердой питательной среде собранный биоматериал ресуспендируют в соответствующий буфер или раствор и помещают в криофлаконы. Перед транспортировкой биоматериал замораживают. Нам понадобится, как минимум, один образец (1 мл жидкой культуры или подлежащий согласованию объем культуры на агаре для каждого анализа); однако, одного образца будет недостаточно для повторных определений. В оптимальном варианте хотелось бы получить больший объем биоматериала, что позволит улучшить качество и повысить надежность результатов анализа. Для сравнительного анализа необходимо иметь аналогичное число проб полетного и наземного биоматериала.

3. Требования к получаемым данным:

Необходимо получить данные по условиям проведения эксперимента. Для выработки праймера, необходимого при определении плазмидной ДНК с помощью ПЦР, потребуются данные генетического секвенирования плазмиды, которыми могут располагать российские исследователи (подобные данные можно найти и в опубликованной литературе). Те же данные потребуются для выявления точечных мутаций в плазмиде. Для получения праймеров с целью обнаружения специфических точечных мутаций в хромосомной ДНК необходимо иметь данные по хромосомным последовательностям.

4. Требования к научной аппаратуре:

К возможным белковым консервантам относятся: концентрированная РНК-Later (Ambion), коктейль, содержащий ЭДТА, Трис, ФМСФ (фенилметил сульфонил фторид) и дитиотрейтол (ДТТ), или коктейль с ингибитором протеазы (Sigma P8465). Если окажется возможным получить РНК, то мы сможем сравнить трансляцию плазмиды в полетном и наземном биоматериале методом ПЦР в реальном времени (RT-PCR). В этом случае необходимо провести фиксацию биоматериала как можно скорее после посадки концентрированной РНК-Later (Ambion) или РНК-Protect (Qiagen). При наличии данных по генетическому секвенированию мы сможем предоставить все необходимое для таких исследований оборудование, которое имеется в Отделе микробиологии Университета штата Монтана, г. Боузмэн.

5. Предполетные процедуры:

Подлежат согласованию с российским PI.

6. Полетные процедуры: Подлежат согласованию с российским PI.

7. Послеполетные процедуры:

Для проведения большинства предлагаемых нами исследований (ПЦР, молекулярное клонирование и гель-электрофорез) необходимо как можно раньше после окончания полета выполнить стабилизацию ДНК. Исходя из нашего опыта работы с *Pseudomonas aeruginosa*, нам представляется желательным иметь по три пробы полетного и контрольного биоматериала, зафиксированного в подлежащем согласованию растворе. К возможным белковым консервантам относятся: концентрированная РНК-Later (Ambion), коктейль, содержащий ЭДТА, Трис, ФМСФ (фенилметилсульфонил фторид) и дитиотрейтол (ДТТ), или коктейль с ингибитором протеазы (Sigma P8465). Если окажется возможным получить РНК, то мы сможем сравнить трансляцию плазмиды в полетном и наземном биоматериале методом ПЦР в реальном времени (RT-PCR). В этом случае необходимо провести фиксацию биоматериала как можно скорее после посадки концентрированной РНК-Later (Ambion) или РНК-Protect (Qiagen).

Пробы биоматериала следует поместить в небольшие криофлаконы, снабженные пробками и уплотнительными кольцами, исключающими утечку, быстро заморозить, упаковать в транспортный контейнер с сухим азотом и в таком виде отправить в лабораторию PI.

5. КОНТРОЛЬНЫЕ ЭКСПЕРИМЕНТЫ:

Все образцы биоматериала (полетные и контрольные) подвергаются идентичной обработке.

6. ПРЕДПОЛЕТНЫЕ ВЕРИФИКАЦИОННЫЕ ИСПЫТАНИЯ:

1. Американские испытания:

Для испытаний необходимо иметь культуру тест-организма, содержащую плазмиду. Предполетные мероприятия включают отработку процедур, основанных на российских протоколах выращивания культур, а также демонстрацию совместимости полученного биоматериала с нашими методиками молекулярного анализа. Для проведения предполетной подготовки нам необходимо иметь:

- Российские протоколы эксперимента
- Исходную культуру, используемую российскими исследователями
- Культуральную среду и режимы выращивания
- Детальное описание подлежащей изучению плазмиды, включая информацию о последовательности ДНК.

2. Российские испытания:

До полета необходимо, чтобы российские исследователи вырастили культуру, следуя протоколу, который они будут использовать применительно к полетному материалу, провели забор нужных нам образцов и отправили их нам. Это даст нам возможность проверить применимость предлагаемых нами методов анализа (см. ниже).

3. Комплексные испытания и регистрация исходных данных:

Нам необходимо продемонстрировать, что мы можем вырастить в своей лаборатории культуры, пользуясь российскими протоколами, и получить аналогичное количество клеток. Все экспериментальные протоколы необходимо оптимизировать для использования с указанными грамположительными микроорганизмами. В литературе можно найти большое число примеров.

Задачей такой оптимизации является получение максимально возможного объема продукта из небольших образцов. Затем в нашей лаборатории мы будем проводить многократные анализы с тем, чтобы получить надежные результаты.

7. ВЗЯТИЕ БИОМАТЕРИАЛА И СПОСОБЫ МАРКИРОВКИ:

- Фиксатор ДНК, например этанол или коммерческий реактив, подлежит согласованию
- Белковый консервант, например концентрированная РНК-Later (Ambion), коктейль, содержащий ЭДТА, Трис, ФМСФ (фенилметилсульфонил фторид) и дитиотрейтол (ДТТ), или коктейль с ингибитором протеазы (Sigma P8465) - подлежит согласованию
- Фиксатор РНК, например концентрированная РНК-Later (Ambion) или РНК-Protect (Qiagen)
- Криофлаконы объемом 2 мл, снабженные пробками и уплотнительными кольцами, например Fisher 05-669-64.

Эксперимент «Плазмида» (ГНЦ ИМБП РАН совместно с ВНИИ «Генетика») Исследование влияния ФКП на эффективность наследования и структурную стабильность плазмиды pIJ702 у актиномицета *Streptomyces lividans* 66

Обоснование: В настоящее время показано, что воздействие факторов космического полета (ФКП), главным образом микрогравитации на клеточном уровне реализуется при участии биомеханических их строения и нейрогуморальных механизмов адаптации (1). Вместе с тем, в случае с микроорганизмами (бактерии, низшие грибы и др.) при отсутствии у них сложных внутриклеточных комплексов и надклеточных уровней организации, эффекты ФКП обусловлены прямым воздействием этих факторов на метаболизм и генетические процессы.

Одним из перспективных подходов, к изучению молекулярных механизмов действия физических факторов космического полета на живые системы является идентификация генов и изучение их экспрессии.

Расшифровка структуры генома ряда растений и животных, в том числе и человека, приближает исследователей к пониманию механизмов экспрессии генов. В структуре большинства генов уже идентифицированы регуляторные области, контролирующие те или иные аспекты их функционирования (экспрессию или репрессию). Эти процессы контролируются как внутренними, так и внешними факторами.

Изучение экспрессии генов на интенсивно разрабатываемых клеточных моделях, в частности микроорганизмах, может оказаться удобным и весьма эффективным для понимания молекулярных механизмов действия ФКП на живые системы. Эти работы уже начаты в ряде исследовательских центров национальных космических агентств (NASA, ESA, NASDA и др.) Первые результаты этих исследований на различных биологических объектах, в том числе и микроорганизмах, были представлены в работе (2).

Предлагаемые нами в качестве объекта исследования бактерии рода *Streptomyces* имеют высокий уровень нестабильности генома, что выражается образованием всех возможных продуктов спонтанного и индуцированного мутагенеза, которые часто имеют хорошо выраженные (видимые) внешние фенотипические проявления.

Таким образом, состояние генома стрептомицетов в экспериментах по изучению механизмов влияния ФКП, в том числе и микрогравитации, на генетические характеристики, могут служить чувствительным индикатором для оценки степени и потенциальной возможности воздействия на наследственный аппарат живых организмов, экспонированных в условиях космического полета различной продолжительности.

Задача: Изучение частичной передачи и мобилизации плазмид после длительной преинкубации штаммов – доноров, холтеров и реципиентов в условиях космического полета.

Объект исследования: микроорганизмы (актиномицет *Streptomyces lividans* 66)

Характеристика биоматериала: Стрептомицеты относятся к медленно растущим микроорганизмам и обладают четко выраженными стадиями жизненного цикла: субстратный мицелий - воздушный мицелий – споры. В процессе дифференциации у них происходит сегрегация генетического материала (геномной, плазмидной и др. видов сателлитных ДНК), обеспечивающая передачу наследственного материала элементам вегетативного размножения – спорам.

Распределение плазмидной (цитоплазматической) ДНК в спорах - процесс, зависящий не только от природных свойств плазмидного репликаона и свойств микроорганизма – хозяина, но внешних факторов, оказывающих влияние на два первых, в частности, от ФКП. Действие этих факторов на ДНК может привести к увеличению структурной нестабильности и возникновению мутаций в самой плазмиде. Определить частоту возникновения таких мутаций можно отслеживая экспрессию фенотипа маркерных генов, локализованных в плазмидной ДНК. Плазмида pIJ702 имеет маркерный ген образования темного пигмента клетками микроорганизма хозяина. Его повреждение должно приводить к обесцвечиванию колоний, несущих плазмидную ДНК.

Условия проведения эксперимента и аппаратура: Чашки Петри с культурами безплазмидного и плазмидного штаммов актиномицета *Streptomyces lividans* 66 (доноров, холтеров и реципиентов) на агаровой среде будут размещены в специальной укладке помещенной в контейнер ББ-2 М. Опытный и контрольный варианты. Оптимальная температура 20-25°C, влажность 60%. Перед началом полетного эксперимента и после приземления КА оба варианта (контрольный и полетный) хранятся при t-4°C. Для контрольного варианта воспроизводится временной и режим идентичный полетному. **Послеполетный анализ биоматериала** будет выполнен в ИМБП РАН и во ВНИИ «Генетика». Будут изучены частота мобилизации и механизм передачи плазмидной

(цитоплазматической) ДНК между различных штаммов. Исследования будут проведены с использованием современных микробиологических, популяционно-генетических и молекулярных методов.

Практическая значимость и ожидаемые результаты: Полученные данные позволят выявить особенности и динамику передачи плазмидной ДНК в процессах межродовой конъюгации в условиях микрогравитации. Кроме того, эти данные дадут возможность оценить вероятность и особенности протекания инфекционных заболеваний у космонавтов.

Эксперимент «Плазида»

Промежуточный отчет по первому этапу подготовительной работы

Содержание работ первого этапа:

1. Активация плазмидного штамма *Streptomyces lividans* 66 (pIJ702) (выведение из лиофильновысушенного состояния).
2. Отбор плазмидсодержащего моноклона с выраженной экспрессией плазмидного гена пигментообразования – mel.
3. Анализ стабильности наследования плазмидной ДНК pIJ702 в популяции спор отобранного клона *S. lividans* 66 (pIJ702) с использованием фенотипа устойчивости к тиострептону, определяемым маркерным геном – tsr.

Основная часть:

Во вскрытую ампулу, содержащую лиофильновысушенный материал коллекционного штамма ВКПМ *S. lividans* 66 (pIJ702) было добавлено 0.5 мл физиологического раствора. Биоматериал ресуспендировали встряхиванием и через 5 мин инкубации при комнатной температуре полученную суспензию высевали по 0.1 мл на чашки агаризованной среды ISP, содержащую 50 мкг/мл плазмидселективного агента – антибиотика тиострептона. Засеянные чашки инкубировали в течение 7 дней при 28°C до завершения спорообразования газона микроорганизма.

С полученного газона производили сбор спорового материала с использованием метода споровой фильтрации. Полученную суспензию спор рассеивали в разведениях 10^{-4} ; 10^{-5} ; 10^{-6} ; 10^{-7} на чашки агаризованной среды ISP, содержащую 50 мкг/мл тиострептона для получения единичных клонов *S. lividans* 66 (pIJ702). Таким образом, через 7 дней инкубации было отобрано 15 гомоморфных тиострептонустойчивых клонов, демонстрирующих хороший рост и спорообразование на селективной среде ISP и обладающие выраженным фенотипом пигментообразования (Mel⁺). Отобранные клоны были размножены путем секторального пассажа на среде ISP, содержащую 50 мкг/мл тиострептона.

Был проведен анализ стабильности наследования плазмидной ДНК pIJ702 в популяции спор отобранных клонов с целью определения процентного отношения спор несущих плазмидную ДНК. С этой целью, суспензии спор анализируемых клонов параллельно рассеивали на среду ISP, содержащую и не содержащую тиострептон. Через 7 дней подсчитывали количество колоний выросших в селективных и неселективных условиях и определяли их процентное отношение. Уровень стабильности наследования плазмиды pIJ702 для всех 10 проанализированных клонов варьировал в незначительных пределах: от 96% до 99% (см. Табл.).

Таблица. Фенотипические характеристики отобранных плазмидных клонов *S. lividans* 66 (pIJ702).

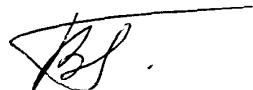
Клон №	Стабильность наследования pIJ702 (%)	Метод репликации (%)	Морфологическая изменчивость (%)	Экспрессия Mel ⁺
1	97.5	98	5	+
2	98.4	99	3	+
3	96.7	99	3	+
4	98	100	2	+
5	97.2	98	4	+
6	96.2	99	3	+
7	98.4	100	4	+
8	99	100	3	+
9	96.8	98	3	+
10	97.5	99	4	+

По результатам проведенного анализа из 10 первоначально отобранных клонов для дальнейшей работы было выбрано 3, имеющих максимальный уровень стабильности плазмиды в популяции

споровых клонов при репликации, коррелирующим с высоким уровнем стабильности в рассевах (не ниже 98%).

Суспензии спор, отобранных по результатам первичной проверки клонов N4; 7; 8, консервировали в физиологическом растворе с использованием 15% раствора глицерина и помещали на хранение при -20°C для дальнейшей работы.

Исполнитель: старший научный сотрудник лаборатории генетики актиномицетов (ГосНИИГенетика), кандидат биологических наук



Табаков В.Ю./

ФОТОН-М-2

ПЛАН ПРОВЕДЕНИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА

1. НАЗВАНИЕ ЭКСПЕРИМЕНТА:

Краткое - «ПЛАЗМИДА»

Полное – Изучение влияния факторов космического полета на эффективность наследования и структурную стабильность плазмиды pIJ702 у актиномицета *Streptomyces lividans* 66

2. ОТВЕТСТВЕННЫЙ ИСПОЛНИТЕЛЬ:

От России: Воейкова Татьяна Александровна, к.б.н., зав., лабораторией генетики актиномицетов, ГУП ГосНИИгенетика

3. СОИСПОЛНИТЕЛИ: От России: Нет

4. ОСНОВНЫЕ ЦЕЛИ ЭКСПЕРИМЕНТА:

1. Выявить влияние ФКП на генетические структуры микроорганизма;
2. Определить характер и предполагаемый механизм изменений генетических структур;
3. Попытаться связать выявленные изменения с воздействием определенных ФКП.

5. ОБОСНОВАНИЕ ЭКСПЕРИМЕНТА/ГИПОТЕЗЫ:

Предлагаемые в качестве объекта исследования бактерии рода *Streptomyces* имеют высокий уровень нестабильности генома, что выражается образованием всех возможных продуктов спонтанного и индуцированного мутагенеза, которые часто имеют хорошо видимые внешние фенотипические проявления.

Таким образом, состояние генома стрептомицетов в экспериментах по изучению влияния ФКП на генетические свойства организмов может служить чувствительным индикатором для оценки потенциального воздействия на генетический аппарат организмов, находящихся на борту КЛА.

В качестве простого и хорошо охарактеризованного тест-элемента генома стрептомицета выбрана многокопийная плазида pIJ702. Известно что распределение плазмидных ДНК в споры – случайный процесс, зависящий от природных свойств плазмидного репликаона, биологических свойств микроорганизма-хозяина, а также внешних факторов, оказывающих влияние на два первых. Изменение метаболизма микроорганизма-хозяина наряду с прямым действием этих факторов на ДНК может привести к увеличению структурной нестабильности и возникновением мутаций генов в самой плазмиде. Отследить частоту возникновения таких мутаций, можно отслеживая экспрессию фенотипа маркерных генов, локализованных на плазмидной ДНК. Плазида pIJ702 имеет маркерный ген образования темного пигмента клетками микроорганизма-хозяина. Его повреждение должно приводить к обесцвечиванию колоний, несущих плазмидную ДНК.

6. ПОЛЕТНЫЙ ЭКСПЕРИМЕНТ:

1. Общее описание:

Чашечная закладка биоматериала (растущих микроорганизмов) на агаризованной среде в простой металлический контейнер без термостатирования.

2. Требования к биообъектам:

Прикрепленный рост микроорганизмов на поверхности агаризованной среды при температуре 15 – 35°C. Время генерации при температуре 20°C составляет 14–16 суток.

3. Требования к регистрируемым данным: Нет

4. Требования к научной аппаратуре: Нет

5. Предполетные процедуры:

Рассев биоматериала на агаризованную питательную среду в чашках Петри; закладка чашек в полетный контейнер; помещение контейнера в сумку-холодильник 4 – 10°C; транспортировка контейнера к месту старта; установка контейнера на борту КЛА.

6. Полетные процедуры: Нет

7. Послеполетные процедуры:

Снятие контейнера с борта КЛА; помещение контейнера в сумку-холодильник 4 - 10°C; транспортировка контейнера к месту исследования биоматериала (ГосНИИгенетика).

7. КОНТРОЛЬНЫЕ ЭКСПЕРИМЕНТЫ:

Осуществляются по договоренности и по условиям сообщаемых «Заказчиком» (ИМБП), параллельно с осуществлением полетного эксперимента.

8. ПРЕДПОЛЕТНЫЕ ВЕРИФИКАЦИОННЫЕ ИСПЫТАНИЯ:

Россия:

I. Подготовительный этап

1. Оживление плазмидного штамма *Streptomyces lividans* 66 (pIJ702) из лиофильного состояния;
2. Отбор плазмидсодержащего моноклона штамма с выраженной экспрессией плазмидного гена пигментообразования (mel);
3. Анализ стабильности наследования плазмидной ДНК pIJ702 по фенотипу устойчивости к тиострептону, определяемым маркерным геном *tsr*;
4. Анализ структурной стабильности плазмидной ДНК в плазмидсодержащих клонах по экспрессии маркерного гена пигментообразования (mel).

II. Предполетные испытания

1. Проведение комплексных исследований по изучению стабильности наследования и структурной стабильности плазмиды pIJ702 при выращивании штамма в неселективных условиях (в отсутствии антибиотика);
2. Проведение комплексных исследований по изучению стабильности наследования и структурной стабильности плазмиды pIJ702 при выращивании штамма в селективных условиях (в присутствии антибиотика);
3. Тестовые рассевы спор микроорганизма на селективные и неселективные чашки и анализ результатов эксперимента.

9. ВЗЯТИЕ БИОМАТЕРИАЛА И СПОСОБЫ МАРКИРОВКИ:

Не требуется

10. ПОДГОТОВКА БИООБЪЕКТОВ/МЕТОДЫ ТЕСТИРОВАНИЯ:

Вся подготовка биообъектов осуществляется на базе ГосНИИгенетика; Методы тестирования: генетические; молекулярно-биологические.

11. ФОРМА РЕГИСТРАЦИИ ДАННЫХ:

На электронных носителях информации; печатная документация; фотографии.

12. ТРЕБОВАНИЯ ПО ОБМЕНУ ДАННЫМИ И ИХ АНАЛИЗУ/МЕТОДЫ:

1. Регистрация данных:

По договоренности с «Заказчиком» и другими участниками эксперимента.

2. Анализ данных на месте запуска/посадки: Не требуется

Эксперимент «Плазида»

Итоговый отчет по второму этапу подготовительной работы

Содержание работ второго этапа:

1. Анализ структурной стабильности плазмидной ДНК в популяции спор, отобранных на первом этапе подготовительной работы клонов N4; 7; 8 плазмидного штамма *Streptomyces lividans* 66 (pIJ702), по экспрессии маркерного гена пигментообразования - mel.
2. Анализ структурной стабильности наследования плазмидной ДНК pIJ702, изолированной из клонов N4; 7; 8, методом гель-электрофореза плазмидных рестрикетов в агарозном геле.
3. Окончательный выбор одного плазмидсодержащего моноклона *Streptomyces lividans* 66 (pIJ702), обладающего максимальным уровнем структурной стабильности плазмидной ДНК, по данным генетических и рестрикционных исследований.

Основная часть:

Плазида pIJ702 размером 5.8 т.п.н., содержит 3 основные генетические области:

1. Область, ответственную за репликацию, поддержание и распределение копий плазмиды в мицелии и спорах стрептомицета-хозяина, с общим размером несущего фрагмента ДНК 3.2 т.п.н.;
2. Фрагмент, несущий ген устойчивости к антибиотику тиострептон – tsr , размером 1.09 т.п.н.;
3. Фрагмент ДНК, содержащий ген пигментообразования - mel, общей протяженностью (включая значительный промоторный регион) 1.56 т.п.н.

Фрагменты 1 и 2 существенны для выживания плазмиды в экспериментальных условиях, поскольку их повреждение вызывает ее утрату или гибель несущего организма соответственно. Поэтому, данные области являются малопригодными для изучения природы индуцированных мутационных изменений плазмидной ДНК в ходе экспериментального воздействия. В тоже время, ДНК фрагмента с маркерным геном геном тирозиназы – mel, является материалом подобных исследований.

Для оценки структурной стабильности плазмиды pIJ702 генетическим методом, проводили анализ поддержания признака пигментообразования Mel⁺ в популяции спор клонов N4; 7; 8, отобранных на первом этапе подготовительной работы. С этой целью суспензии спор данных клонов высевали на селективную (с тиострептоном) и неселективную (без тиострептона) среду ISP для получения 20 – 30 колоний каждого клона на чашках Петри. Оценивали количество устойчивых к тиострептон колоний, экспрессирующих признак пигментообразования, на селективной среде. Всего проанализировано 174 колонии клона N4, 187 колоний клона N7 и 208 колоний клона N8. Установлено, что все устойчивые к тиострептон колонии, включая колонии с атипичной морфологией сохраняют признак пигментообразования Mel⁺, т.е. несут структурно неповрежденную плазмидную ДНК. Более того, все колонии выросшие на неселективной среде ISP и способные к последующему пересеву на селективную среду, также экспрессировали фенотип пигментообразования. Исключение составили только колонии неспособные к пересеву на среду с тиострептоном, а потому, утратившие плазмидную ДНК. Полученные данные по результатам генетического исследования фенотипа пигментообразования суммированы в таблице:

Таблица. Характеристика отобранных плазмидных клонов *S. lividans* 66 (pIJ702) по фенотипу пигментообразования Mel⁺

Клон N	Стабильность наследования pIJ702 (%)	Число Mel ⁺ от всех устойчивых к тиострептон колоний (%)
4	98.4	100
7	98.7	100
8	98.6	100

Из всех исследуемых клонов методом щелочного лизиса была изолирована плазмидная ДНК. Полученные образцы были подвергнуты рестрикционному расщеплению и проанализированы методом гель-электрофореза. Установлено, что все исследуемые клоны несут плазмидную ДНК нативного размера (5.8 т.п.н.-PstI фрагмент). Рестриктаза *Bell* расщепляет кольцевую плазмиду в строгом соответствии с количеством и расположением соответствующих сайтов на рестрикционной

карте, образуя хорошо визуализируемый на электрофореграмме набор фрагментов (1.77; 1.56; 1.43 и 1.08 т.п.н.). Фрагмент 1.56 т.п.н. соответствует области плазмиды, несущей ген пигментообразования – mel.

Таким образом, из трех отобранных ранее клонов N4; 7; 8, по результатам двух этапов подготовительной работы, в качестве экспериментального объекта для проведения эксперимента «Плазида», выбран клон N4, демонстрирующий минимальный уровень морфологической изменчивости колоний в сочетании с высоким уровнем стабильности наследования плазмидной ДНК.

Исполнитель: старший научный сотрудник лаборатории генетики актиномицетов (ГосНИИГенетика), кандидат биологических наук

/Табакон В.Ю./

ПЛАН ПРОВЕДЕНИЯ ЭКСПЕРИМЕНТОВ ПО ПРОЕКТУ "ФОТОН"-М-2

1. НАЗВАНИЕ ЭКСПЕРИМЕНТА: "ПЛАЗМИДА-Ф2 "

Изучение влияния факторов космического полета на эффективность наследования и структурную стабильность плазмиды pIJ702 у актиномицета *Streptomyces lividans* 66

2. ОТВЕТСТВЕННЫЕ ИСПОЛНИТЕЛИ:

От России: Д-р Татьяна Александровна Воейкова, ГосНИИгенетика

От США: Д-р Барри Пайл, Университет штата Монтана, Боузмэн, Монтана

3. СОИСПОЛНИТЕЛИ:

От России: Д-р Вячеслав Юрьевич Табаков, ГосНИИгенетика,

От США: Аспирант из Университета штата Монтана, Боузмэн, Монтана (подлежит утверждению)

4. ОСНОВНЫЕ ЦЕЛИ ЭКСПЕРИМЕНТА:

1. Выявить влияние факторов космического полета на генетические структуры микроорганизма
2. Определить характер и предполагаемый механизм изменений генетических структур
3. Попытаться связать выявленные изменения с воздействием определенных факторов космического полета.

5. ОБОСНОВАНИЕ ЭКСПЕРИМЕНТА/ГИПОТЕЗЫ:

Стрептомицеты представляют собой актинобактерии, образующие в процессе роста мицелий, из которого впоследствии формируется цепочка спор. Ранее их относили к низшим грибам, но теперь рассматривают как грам-положительные бактерии. Именно они придают свежескопанной земле характерный запах. Многие стрептомицеты продуцируют антибиотики, например стрептомицин. Плазида pIJ702, была сконструирована на основе плазмиды pIJ101, выделенной из штамма *Streptomyces coelicolor*. Ген устойчивости к тиострептон и ген продукции меланина были клонированы в эту плазмиду из хромосом различных штаммов стрептомицетов. Антибиотик тиострептон представляет собой высоко модифицированный мультициклический пептид, хорошо известный как ингибитор белкового синтеза. Тиострептон также является мощным активатором генной экспрессии в *S. lividans*. Основная цель данного исследования – сравнить стабильность и экспрессию плазмидных и хромосомных генов в полетном и наземном материале.

Поскольку обнаружено, что продукция антибиотиков у аналогичных микроорганизмов может изменяться в условиях космического полета, то данный эксперимент может помочь понять механизмы этого явления. Рекомбинантные *S. lividans* и другие виды стрептомицетов использовались для изучения экспрессии генов клонирования из *других* организмов, включая человека. Продукция антибиотиков или других препаратов в космосе или модификация культур на земле с целью получения больших объемов ценных фармакологических препаратов может иметь практическое значение.

Предлагаемые в качестве объекта исследования бактерии рода *Streptomyces* имеют высокий уровень нестабильности генома, что приводит к образованию различных продуктов спонтанного и индуцированного мутагенеза, которые часто имеют хорошо видимые внешние фенотипические проявления. Таким образом, состояние генома стрептомицетов может служить чувствительным индикатором для оценки воздействия факторов космического полета на генетический аппарат биообъектов.

В качестве простого и хорошо охарактеризованного тест-элемента генома стрептомицета выбрана многокопийная плазида pIJ702. Известно, что распределение плазмидных ДНК в спорах – случайный процесс, зависящий от природных свойств плазмидного репликаона, биологических свойств микроорганизма-хозяина, а также внешних факторов, оказывающих влияние на два первых. Изменение метаболизма микроорганизма-хозяина наряду с прямым действием этих факторов на ДНК может привести к увеличению структурной нестабильности и возникновению мутаций генов в самой плазмиде. Отслеживая – экспрессию фенотипа маркерных генов, локализованных на плазмидной ДНК, можно определить частоту возникновения таких мутаций. Плазида pIJ702 имеет маркерный

ген образования темного пигмента меланина клетками микроорганизма-хозяина. Его изменение должно приводить к обесцвечиванию колоний, несущих плазмидную ДНК.

Американские специалисты предлагают использовать следующие аналитические методы, которые позволят увеличить результативность данного эксперимента:

- 1) Используя праймеры для маркерного гена плазмиды, проводится полимеразная цепная реакция (ПЦР) с тем, чтобы подтвердить присутствие маркера в несущем плазмиду штамме.
- 2) Для определения числа копий плазмиды на клетку, которое может изменяться под действием факторов космического полета и, в первую очередь невесомости, проводят разделение плазмидной и хромосомной ДНК с применением стандартных методов молекулярного клонирования. Затем проводят количественное определение плазмидной ДНК и проверяют наличие маркера с помощью ПЦР.
- 3) Предлагается провести гель-электрофорез в денатурирующем градиенте (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis – DGGE) с целью выявления точечных мутаций в плазмиде. При наличии хромосомных маркеров их также можно проанализировать на присутствие точечных мутаций с помощью DGGE. Последовательность полосок ДНК в геле определяется с помощью BigDye версия 3.1 (ABI) и анализируется с использованием Программы секвенирования (Sequencer Program). Упомянутые методы анализа явятся дополнением к методу рестрикционного анализа (Restriction Fragment Length Polymorphism – RFLP), предложенному российскими исследователями.
- 4) Предлагается провести анализ белкового комплекса с использованием двухмерного гель-электрофореза и MALDI-TOF для выявления различий экспрессии белков. Кроме того, если американскими специалистами будет показано, что РНК сохраняет стабильность от времени возвращения на землю до доставки в лабораторию д-ра Пайла, то американские специалисты смогут обработать полетный биоматериал в лаборатории д-ра Воейковой перед отправкой в США и смогут сравнить трансляцию плазмиды в полетном и наземном биоматериале методом ПЦР в реальном времени (RT-PCR) в лаборатории д-ра Пайла.

Американские специалисты хотели бы сконцентрировать усилия на проведении молекулярного анализа плазмиды pJ702 *S. lividans* 66, ее сохранения, стабильности и амплификации под действием факторов космического полета с тем, чтобы дополнить и расширить результаты эксперимента, полученные российскими исследователями.

Хотя исследуемый микроорганизм не является патогенным, предлагаемый эксперимент позволит получить информацию, касающуюся стабильности его генетического материала в бактериях. Если окажется, что в условиях космического полета происходит усиление роста бактерий и/или стимуляция амплификации плазмиды, что приводит к повышению резистентности к тиострептону, тогда можно будет предположить, что аналогичные изменения происходят и с бактериальными патогенами. Результаты данного эксперимента позволят глубже понять потенциальное влияние космического полета на генетические механизмы, лежащие в основе вирулентности патогенных бактерий. Возможные изменения таких патогенов могут представлять риск для здоровья человека, что может иметь важное значение в будущих длительных полетах, в том числе пилотируемых полетов на Луну и Марс.

6. ПОЛЕТНЫЙ ЭКСПЕРИМЕНТ:

1. Общее описание:

Предлагаемый эксперимент позволит выявить действие факторов космического полета на структурную стабильность плазмиды pJ702 у бактерии *S. lividans* 66. Эти микроорганизмы образуют споры, которыми можно инокулировать агаризованную среду. Плаزمида несет два маркера, определяющие: 1) устойчивость к тиострептону и 2) продукцию меланина. Микроорганизмы с интактной исходной плазмидой выращивают на твердой селективной среде, содержащей тиострептон; они продуцируют колонии черного цвета и обуславливают потемнение агаризованной среды вокруг колоний. Генетическая последовательность плазмиды подвержена мутациям даже в отсутствие специфических стрессовых воздействий, которые могут вызывать мутации. Утрата микроорганизмами способности роста на селективной среде с тиострептоном и/или исчезновение пигментации колоний с темным меланином может указывать на наличие мутаций. Указанные изменения можно также обнаружить с помощью упомянутых выше молекулярно-биологических методов, включая ПЦР, рестрикционный анализ и гель-электрофорез. Сравнение трансляции плазмиды после выращивания в различных условиях можно провести, используя ПЦР в реальном времени, а белковую экспрессию определить путем анализа всего белкового комплекса.

2. Требования к биообъектам:

Рост микроорганизмов происходит на поверхности агаризованной среды при температуре 15-35 °С. При 20 °С время генерации составляет 14–16 суток. В полете чашки Петри с растущими на агаризованной среде микроорганизмами размещаются в металлическом контейнере (без термостатирования).

Полетный биоматериал

Для полетного эксперимента готовят 16 чашек Петри с агаризованной средой. Половину чашек заполняют неселективной средой, не содержащей тиострептон, а другую половину селективной средой с тиострептоном. Таким образом, полетный эксперимент проводят в 8 чашках с выращиванием штамма в неселективных условиях и в 8 чашках – в селективных условиях в присутствии тиострептона. Стерильный агар разливают в асептических условиях в стерильные чашки Петри диаметром 6 и высотой 2 см.

Половину чашек каждого вида среды (по 4 чашки) засевают большим числом спор, используя густую суспензию (густой инокулят). Обычно на таких пластинках микроорганизмы растут плотным слоем, образуя газон колоний. Остальные чашки засевают небольшим числом спор, используя разведенную суспензию (разведенный инокулят). На таких пластинках микроорганизмы растут, образуя дискретные колонии. Чашки герметизируют парафильмом, что предотвращает выделение летучих продуктов обмена в окружающую среду или контаминацию биоматериала летучими соединениями из окружающей среды.

По 2 чашки из каждой комбинации среда-инокулят (всего 8 чашек) будут использованы в лаборатории д-ра Т.А. Воейковой, а аналогичный комплект (из 8 чашек) будет передан в лабораторию д-ра В. Пайла.

Селективная среда с тиострептоном		Неселективная среда без тиострептона	
Обогащенный агар		Обогащенный агар	
Густой инокулят	Разведенный инокулят	Густой инокулят	Разведенный инокулят
4 чашки	4 чашки	4 чашки	4 чашки

3. Требования к получаемым данным:

Американским специалистам необходимо получить информацию по составу и способу приготовления среды, а также росту и приготовлению микроорганизма для двух типов инокуляции. Эта информация будет использована в преполетных отработочных экспериментах и послеполетных модельных исследованиях. Им также необходимо получить данные по условиям проведения полетного и наземного контрольного экспериментов после их окончания.

4. Требования к научной аппаратуре: Нет

5. Предполетные процедуры:

- Рассев микроорганизмов на агаризованной питательной среде в чашки Петри
- Закладка чашек Петри в полетный контейнер
- Укладка полетного контейнера в сумку-холодильник при 4 ± 2 °С
- Транспортировка контейнера к месту старта
- Установка контейнера на борт КК Фотон-М2.

6. Полетные процедуры: Нет

7. Послеполетные процедуры:

- Снятие контейнера с борта КК Фотон-М2
- Укладка полетного контейнера в сумку-холодильник при $4 + 2$ °С
- Транспортировка контейнера в лабораторию д-ра Воейковой
- Американские специалисты отбирают пробы, фиксируют и замораживают биоматериал из предоставленного им комплекта чашек Петри
- Американские специалисты осуществляют отправку биоматериала в США.

7. КОНТРОЛЬНЫЕ ЭКСПЕРИМЕНТЫ:

Планируется провести два контрольных эксперимента: один – отставленный синхронный и один – лабораторный. Синхронный контрольный эксперимент проводится с отставанием на одни сутки от полетного с воспроизведением бортовой температуры по договоренности с ИМБП и на его базе. Лабораторный контрольный эксперимент проводится в лаборатории д-ра Воейковой при температурах, соответствующих предполагаемой температуре при транспортировке биоматериала и

в ходе полета в соответствии с временной циклограммой полета (от момента передачи биоматериала для отправки на космодром). Это позволит провести анализ чашек Петри на различных этапах эксперимента и определить состояние культуры на каждой стадии ее развития.

8. ПРЕДПОЛЕТНЫЕ ВЕРИФИКАЦИОННЫЕ ИСПЫТАНИЯ:

1. Российские испытания

На подготовительном этапе:

- Выращивание плазмидного штамма *S. lividans* 66 (pIJ702) на агаризованной среде
- Отбор плазмидсодержащего моноклона штамма с выраженной экспрессией плазмидного гена пигментообразования *mel*
- Анализ стабильности наследования плазмидной ДНК pIJ702 по фенотипу устойчивости к тиострептому, определяемой маркерным геном *tsr*
- Анализ структурной стабильности плазмидной ДНК в плазмидсодержащих клонах по экспрессии маркерного гена пигментообразования *mel*

На этапе предполетных испытаний:

- Проведение комплексных исследований по изучению стабильности наследования и структурной стабильности плазмиды pIJ702 при выращивании штамма в неселективных условиях (в отсутствие антибиотика)
- Проведение комплексных исследований по изучению стабильности наследования и структурной стабильности плазмиды pIJ702 при выращивании штамма в селективных условиях (в присутствии антибиотика)
- Тестовые рассевы спор микроорганизма на селективные и неселективные чашки.

Американские специалисты обеспечивают поставку пипеток, цифрового фотоаппарата и цифрового температурного регистратора.

2. Американские испытания

Американские специалисты проводят предполетные отработочные и послеполетные модельные эксперименты, используя штамм *S. lividans* 66 с плазмидой pIJ702, полученный из ВКПМ ГосНИИгенетика, и компоненты сред, аналогичные используемым в лаборатории д-ра Т.А. Воейковой.

3. Совместные российско-американские испытания

Нет

9. ВЗЯТИЕ БИОМАТЕРИАЛА И СПОСОБЫ МАРКИРОВКИ:

Расшифровка обозначений, используемых для маркировки биоматериала, передается в лабораторию д-ра Б. Пайла вместе с чашками Петри, содержащими культуры.

10. ПОДГОТОВКА БИООБЪЕКТОВ/МЕТОДЫ ТЕСТИРОВАНИЯ:

Чашки Петри готовят в лаборатории д-ра Т.А. Воейковой и анализируют с использованием генетических и молекулярно-биологических методов.

Американские специалисты планируют использовать дополнительные генетические и молекулярно-биологические методы с тем, чтобы повысить результативность данного эксперимента. Они имеют или могут получить из разных источников все материалы, необходимые для исследований. Все необходимое для таких исследований оборудование имеется в Отделе микробиологии Университета штата Монтана, г. Боузмэн.

11. ФОРМА РЕГИСТРАЦИИ ДАННЫХ:

На электронных носителях информации, печатная документация, фотографии

12. ТРЕБОВАНИЯ ПО ОБМЕНУ ДАННЫМИ ИХ АНАЛИЗУ/ МЕТОДЫ:

1. Регистрация данных:

Американским специалистам необходимо получить данные по условиям проведения полетного и наземного экспериментов

2. Анализ данных на месте запуска/посадки: Не требуется

13. ФОТО/ДИАГРАММЫ:

Прилагаются к окончательному научному отчету.

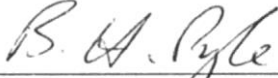
Настоящий документ подписали 11 марта 2005 г.:

От российской стороны:



(Д-р Т. А. Воейкова)

От американской стороны:



(Д-р Барри Пайл)

Эксперимент «Плаزمида» (ГНЦ ИМБП РАН совместно с ВНИИ «Генетика») Исследование влияния ФКП на эффективность наследования и структурную стабильность плазмиды pIJ702 у актиномицета *Streptomyces lividans* 66

Обоснование: В настоящее время показано, что воздействие факторов космического полета (ФКП), главным образом микрогравитации на клеточном уровне реализуется при участии биомеханических их строения и нейрогуморальных механизмов адаптации (1). Вместе с тем, в случае с микроорганизмами (бактерии, низшие грибы и др.) при отсутствии у них сложных внутриклеточных комплексов и надклеточных уровней организации, эффекты ФКП обусловлены прямым воздействием этих факторов на метаболизм и генетические процессы.

Одним из перспективных подходов, к изучению молекулярных механизмов действия физических факторов космического полета на живые системы является идентификация генов и изучение их экспрессии.

Расшифровка структуры генома ряда растений и животных, в том числе и человека, приближает исследователей к пониманию механизмов экспрессии генов. В структуре большинства генов уже идентифицированы регуляторные области, контролирующие те или иные аспекты их функционирования (экспрессию или репрессию). Эти процессы контролируются как внутренними, так и внешними факторами.

Изучение экспрессии генов на интенсивно разрабатываемых клеточных моделях, в частности микроорганизмах, может оказаться удобным и весьма эффективным для понимания молекулярных механизмов действия ФКП на живые системы. Эти работы уже начаты в ряде исследовательских центров национальных космических агентств (NASA, ESA, NASDA и др.) Первые результаты этих исследований на различных биологических объектах, в том числе и микроорганизмах, были представлены в работе (2).

Предлагаемые нами в качестве объекта исследования бактерии рода *Streptomyces* имеют высокий уровень нестабильности генома, что выражается образованием всех возможных продуктов спонтанного и индуцированного мутагенеза, которые часто имеют хорошо выраженные (видимые) внешние фенотипические проявления.

Таким образом, состояние генома стрептомицетов в экспериментах по изучению механизмов влияния ФКП, в том числе и микрогравитации, на генетические характеристики, могут служить чувствительным индикатором для оценки степени и потенциальной возможности воздействия на наследственный аппарат живых организмов, экспонированных в условиях космического полета различной продолжительности.

Задача: Изучение частичной передачи и мобилизации плазмид после длительной преинкубации штаммов – доноров, холтеров и реципиентов в условиях космического полета.

Эксперимент «Плазмида» (совместно с ВНИИ «Генетика»)

Цель: Исследование влияния ФКП на эффективность наследования и структурную стабильность плазмиды pIJ 702 у актиномицета *Streptomyces lividans* 66

Объект исследования: микроорганизмы (актиномицет *Streptomyces lividans* 66)

Задача: Изучение частичной передачи и мобилизации плазмид после длительной преинкубации штаммов – доноров, холтеров и реципиентов в условиях космического полета.

Характеристика биоматериала: Стрептомицеты обладают четко выраженными стадиями жизненного цикла: субстратный мицелий – воздушный мицелий – споры. В процессе дифференциации у них происходит сегрегация генетического материала (геномной, плазмидной и др. видов сателлитных ДНК), обеспечивающая передачу наследственного материала элементам вегетативного размножения – спорам.

Распределение плазмидной (цитоплазматической) ДНК в спорах – процесс, зависящий не только от природных свойств плазмидного репликона и свойств микроорганизма – хозяина, но внешних факторов, оказывающих влияние на два первых, в частности, от ФКП. Действие этих факторов на ДНК может привести к увеличению структурной нестабильности и возникновению мутаций в самой плазмиде. Определить частоту возникновения таких мутаций можно отслеживая экспрессию фенотипа маркерных генов, локализованных в плазмидной ДНК Плазмида pIJ702 имеет маркерный ген образования темного пигмента клетками микроорганизма хозяина. Его повреждение должно приводить к обесцвечиванию колоний, несущих плазмидную ДНК.

Условия проведения эксперимента и аппаратура: Чашки Петри с культурами безплазмидного и плазмидного штаммов актиномицета *Streptomyces lividans* 66 (доноров, холтеров и реципиентов) на

агаровой среде будут размещены в специальной укладке помещенной в контейнер ББ – 2 М. Опытный и контрольный варианты. Оптимальная температура 20-25°C, влажность 60% . Перед началом полетного эксперимента и после приземления КА оба варианта (контрольный и полетный) хранятся при t – 4°C. Для контрольного варианта воспроизводится временной и режим идентичный полетному.

Послеполетный анализ биоматериала будет выполнен в ИМБП РАН и во ВНИИ «Генетика». Будут изучены частота мобилизации и механизм передачи плазмидной (цитоплазматической) ДНК между различных штаммов. Исследования будут проведены с использованием современных микробиологических, популяционно-генетических и молекулярных методов.

Практическая значимость и ожидаемые результаты: Полученные данные позволят выявить особенности и динамику передачи плазмидной ДНК в процессах межродовой конъюгации в условиях микрогравитации. Кроме того, эти данные дадут возможность оценить вероятность и особенности протекания инфекционных заболеваний у космонавтов.

Объект исследования: микроорганизмы (актиномицет *Streptomyces lividans 66*)

Характеристика биоматериала: Стрептомицеты относятся к медленно растущим микроорганизмам и обладают четко выраженными стадиями жизненного цикла: субстратный мицелий - воздушный мицелий - споры. В процессе дифференциации у них происходит сегрегация генетического материала (геномной, плазмидной и др. видов сателлитных ДНК), обеспечивающая передачу наследственного материала элементам вегетативного размножения – спорам.

Распределение плазмидной (цитоплазматической) ДНК в спорах – процесс, зависящий не только от природных свойств плазмидного репликаона и свойств микроорганизма – хозяина, но внешних факторов, оказывающих влияние на два первых, в частности, от ФКП. Действие этих факторов на ДНК может привести к увеличению структурной нестабильности и возникновению мутаций в самой плазмиде. Определить частоту возникновения таких мутаций можно отслеживая экспрессию фенотипа маркерных генов, локализованных в плазмидной ДНК. Плазида **pIJ702** имеет маркерный ген образования темного пигмента клетками микроорганизма хозяина. Его повреждение должно приводить к обесцвечиванию колоний, несущих плазмидную ДНК.

Условия проведения эксперимента и аппаратура: Чашки Петри с культурами безплазмидного и плазмидного штаммов актиномицета *Streptomyces lividans 66* (доноров, холтеров и реципиентов) на агаровой среде будут размещены в специальной укладке помещенной в контейнер ББ-2 М. Опытный и контрольный варианты. Оптимальная температура 20-25°C, влажность 60% . Перед началом полетного эксперимента и после приземления КА оба варианта (контрольный и полетный) хранятся при t–4°C. Для контрольного варианта воспроизводится временной и режим идентичный полетному. **Послеполетный анализ биоматериала** будет выполнен в ИМБП РАН и во ВНИИ «Генетика». Будут изучены частота мобилизации и механизм передачи плазмидной (цитоплазматической) ДНК между различных штаммов. Исследования будут проведены с использованием современных микробиологических, популяционно-генетических и молекулярных методов.

Практическая значимость и ожидаемые результаты: Полученные данные позволят выявить особенности и динамику передачи плазмидной ДНК в процессах межродовой конъюгации в условиях микрогравитации. Кроме того, эти данные дадут возможность оценить вероятность и особенности протекания инфекционных заболеваний у космонавтов.

Зав. лабораторией ГНЦ РФ ИМБП РАН
д.б. н. М. Г. Таирбеков
Ведущий научный сотрудник ВНИИ генетика
к. б.н. В. Ю. Табаков