

**ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ
ИНСТИТУТ БИОФИЗИКИ СИБИРСКОГО ОТДЕЛЕНИЯ
РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК**

**ТЕЗИСЫ
КОНКУРСА-КОНФЕРЕНЦИИ
МОЛОДЫХ УЧЁНЫХ И АСПИРАНТОВ**

26 марта 2014 г.

Красноярск

ПРОГРАММА
НАУЧНОЙ СЕССИИ МОЛОДЫХ УЧЁНЫХ И АСПИРАНТОВ
ИБФ СО РАН 2014 ГОДА

Открытие конкурса-конференции 28 марта (четверг), ауд. 1-12 в 10:00

Вступительное слово: Председатель конкурсной комиссии, зам. директора ИБФ СО РАН д.б.н. Татьяна Григорьевна Волова

Доклады молодых учёных и аспирантов (10 мин. доклад + 5 мин. вопросы):

1	Виноградова Ольга Николаевна Микробиологический синтез и свойства многокомпонентных полигидроксиалканоатов	10⁰⁵ – 10²⁰
2	Гончаров Дмитрий Борисович Электростатическое формование нетканых матриксов из ПГА: влияние параметров процесса на структуру и свойства	10²⁰ – 10³⁵
3	Колмакова Олеся Владимировна Изучение биоразнообразия бактериопланктона реки Енисей методом секвенирования следующего поколения	10³⁵ – 10⁵⁰
4	Ларионова Марина Дмитриевна Получение и характеристика секретируемой люциферазы из <i>Metridia longa</i> , экспрессированной в Sf9 клетках	10⁵⁰ – 11⁰⁵
5	Наташин Павел Викторович Кристаллические структуры мутантов Ca ²⁺ -регулируемого фотопротеина обелина. Структурные основы молекулярных механизмов изменения биолюминесцентных свойств фотопротеинов	11⁰⁵ – 11²⁰
6	Алиева Роза Ришатовна Влияние физико-химических факторов на флуоресценцию разряженного фотопротеина обелина	11²⁰ – 11³⁵

Подведение итогов конференции экспертной комиссией

Заключительное слово: Председатель конкурсной комиссии, зам. директора ИБФ СО РАН д.б.н. Т.Г. Волова

Микробиологический синтез и свойства многокомпонентных полигидроксиалканоатов

О.Н. Виноградова, науч. рук. д.б.н., проф. Т.Г. Волова
Институт биофизики СО РАН

Экологической проблемой становится широкое применение синтетических полимеров, что сопровождается загрязнением биосферы. Реальным решением проблемы является придание синтетическим полимерам способности разрушаться в естественных условиях, а также переход на биопластики. Среди полимеров природного происхождения особое место занимают биоразрушаемые полигидроксиалканоаты (ПГА). Эти полимеры синтезируются прокариотами, как правило, в условиях несбалансированного роста в качестве эндогенного источника углерода и энергии. Синтез сополимерных ПГА различного химического строения является особо ценным свойством, так как потенциально делает возможным получение материалов с заданными улучшенными свойствами.

Цель работы - изучение способности штамма *C. eutrophus* В-10646 синтезировать 3-х компонентные ПГА, изучение физико-химических и физико-механических свойств полученных образцов.

Изменение условий углеродного питания, заключающееся в дополнительной подаче в культуру бактерий субстратов-предшественников (пропионата и γ -бутиролактона) обеспечили возможность синтеза семейства трехкомпонентных ПГА [П(ЗГБ/ЗГВ/4ГБ)], в которых идентифицированы макровключения 3-гидроксибутирата (от 26,2 до 59,4 мол.%), 3-гидроксивалерата (от 7,2 до 18,5 мол.%), 4-гидроксibuтирата (от 26,3 до 60,4 мол.%). В результате синтезирована серия сополимерных ПГА, изготовлены образцы полимеров в виде пленок. С применением современных методов анализа в сравнительном аспекте исследованы физико-химические и физико-механические свойства сополимерных ПГА различного химического состава.

Таблица – Химический состав и свойства ПГА, синтезированных *Cupriavidus eutrophus* В-10646 на глюкозе с добавками субстратов-предшественников: пропионат+ γ -бутиролактон

№ образца	Состав ПГА, мол.%			M _ч , кДа	M _в , кДа	D	T _{пл.} , °C	T _{дегр.} , °C	C _x , %
	ЗГБ	ЗГВ	4ГБ						
ПЗГБ	100	0	0	365	913	2,5	179	285	76
1	55,2	18,5	26,3	176	669	3,8	171	282	21
2	57,6	11,9	30,5	181	724	4,0	168	283	20
3	59,4	7,2	33,4	150	450	3,0	161	275	22
4	47,3	17,7	35,0	138	483	3,5	160	274	9
5	26,2	13,4	60,4	149	507	3,4	158	274	17

Выявлено, что 3-х компонентные ПГА в сравнении с ПЗГБ имеют значительно более низкую степень кристалличности и более низкие значения температуры плавления и термической деградации. Пленки из всех исследованных типов 3-х компонентных ПГА имеют более высокие показатели прочности и эластичности, по сравнению с ПЗГБ.

Электростатическое формование нетканых матриц из ПГА: влияние параметров процесса на структуру и свойства

Д.Б. Гончаров, науч. рук. д.б.н., проф. Т.Г. Волова

Институт биофизики СО РАН

Электроспиннинг является перспективным методом, который может быть использован для изготовления ультратонких волокон и мембран, которые имеют потенциал использования в качестве матриц функционирующих клеток для медицинского применения в хирургии. Полигидроксиалканоаты (ПГА) представляют собой класс полимеров микробного происхождения с различным химическим строением и физико-химическими свойствами. Результаты многочисленных исследований показали, что ПГА являются подходящими материалами для изготовления медицинских устройств и могут быть эффективно использованы в восстановительной медицине.

Целью данного исследования, было получение ультратонких волокон, отличающихся по своим физико-химическим свойствам, с использованием ПГА разной химической структуры и исследование влияния параметров электроспиннинга и химического состава ПГА на морфологию ультратонких волокон, а также физико-механические и биологические свойства волокнистых каркасов.

Чтобы определить оптимальные условия для производства ультратонких волокон и волокнистых мембран, было изучено влияние параметров электроспиннинга на морфологию, физико-механические и биологические свойства. Эксперимент показал, что характеристики процесса, такие как напряжение, рабочее расстояние, скорость подачи и концентрация раствора оказывают существенное влияние на диаметр волокон, а также их механические свойства. Влияние параметров на физико-механические свойства ультратонких волокон можно расположить от сильного до самого слабого следующим образом: ориентация волокон - плотность раствора полимера - химический состав ПГА. Фактор, который имеет самый сильный эффект на диаметр и морфологию волокна - это плотность раствора полимера, в то время как эффект химического состава ПГА является менее значительным. Таким образом, используя различные типы ПГА и коллектора, можно изготовить нетканые мембраны с необходимым учетом прочности и эластичности.

Сферические клетки преобладали на всех типах матриц; наблюдалась клеточная инфильтрация между волокнами. Большие количества белка внеклеточного матрикса были обнаружены на неориентированных образцах. Ни один из волокнистых каркасов, изготовленных методом электроспиннинга из ПГА не вызвал никаких негативных последствий для крепления, роста и жизнеспособности фибробластов мышцы NIH 3T3, таким образом все они пригодны для тканевой инженерии.

Изучение биоразнообразия бактериопланктона реки Енисей методом секвенирования следующего поколения

О.В. Колмакова, науч. рук. М.И. Гладышев

Институт биофизики СО РАН

Сибирский федеральный университет

Целью исследования было изучение биоразнообразия бактериопланктона реки Енисей на участке длиной примерно 1800 км с помощью определения нуклеотидной последовательности гипервариабельных участков V3-V4 генов 16S рибосомальной РНК. Пробы воды отбирались на десяти трансектах, расположенных выше и ниже устьев крупных притоков. На каждой трансекте отбиралось по три интегральных по глубине пробы: в основном течении реки и около каждого из берегов. Определение нуклеотидной последовательности фрагментов генов 16S рРНК проводилось методом секвенирования следующего поколения на платформе MiSeq (Illumina, США). Дальнейший биоинформатический анализ проводился с помощью конвейерного программного обеспечения QIIME версия 1.7.0 [1].

В общей сложности было идентифицировано 3022 операционных таксономических единицы, принадлежащих к 17 типам и нескольким таксономическим группам *incertae sedis* (неопределённого положения). Во всех пробах доминировали Actinobacteria и Proteobacteria. На многих трансектах отмечены значительные различия в составе бактериопланктона между левым и правым берегом Енисея. Наибольшее альфа-разнообразие отмечено в средней части изученного участка реки. Бета-разнообразие бактериопланктона зависело от окружающего ландшафта. Каждому из окружающих реку биомов (горная тайга, равнинная тайга и лесотундра) соответствовало своё бактериопланктонное сообщество, отличающееся по составу от сообществ других биомов. Вопреки теории речного континуума, доля цианобактерий в пробах бактериопланктона не возрастала вниз по течению реки.

Работа была поддержана грантом Правительства Российской Федерации для государственной поддержки научных исследований, проводимых под руководством ведущих учёных в российских образовательных учреждениях высшего профессионального образования № 11.G34.31.0014, а также проектом Б-15 Сибирского федерального университета, выполняемого в рамках Государственного задания Министерства образования и науки Российской Федерации

Литература:

[1] J.G. Caporaso, J. Kuczynski, J. Stombaugh et al. Nat. Methods 7, 335–336 (2010)

Получение и характеристика секретлируемой люциферазы из *Metridialonga*, экспрессированной в Sf9 клетках

М.Д. Ларионова, науч. рук. к.б.н., с.н.с. *С.В. Маркова*
Институт биофизики СО РАН

В настоящее время в качестве репортерных молекул для визуализации внутриклеточных процессов часто используются биолюминесцентные белки, многие клонированные люциферазы и фотопотеины уже были успешно апробированы на уровне клеточных культур и лабораторных животных.

Ранее в лаборатории фотобиологии ИБФ СО РАН были идентифицированы гены некоторых изоформ секретлируемой целентеразин-зависимой люциферазы из копеподы *Metridialonga*. Две из полученных изоформ [1, 2] были использованы в качестве эффективных биолюминесцентных репортеров как в модельных *invitro* анализах, так и в исследованиях *invivo*.

В данной работе описана экспрессия, очистка и характеристика новой изоформы люциферазы из *Metridialonga*, *MLuc7*, имеющей большую биолюминесцентную активность по сравнению с изоформами, полученными ранее. Люцифераза *MLuc7*, осуществляющая окисление целентеразина с испусканием голубого света ($\lambda_{\max}=480\text{нм}$), является самой малой по размеру из известных на сегодняшний день люцифераз (16,5 кДа), что позволяет считать ее более перспективным биолюминесцентным репортером.

Рекомбинантный белок *MLuc7*, характеризующийся высоким содержанием цистеиновых остатков, в нативной форме был получен с помощью бакуловирусной экспрессионной системы после нескольких безуспешных попыток получить нативную люциферазу *MLuc7* из *E. coli*. При использовании экспрессионной системы «Vac-to-Vac» и клеток из *Spiropterafrugiperda* (Sf9) в качестве продуцентов удалось осуществить высокоэффективную экспрессию и секрецию целевого белка в культуральную среду. Далее была разработана и оптимизирована процедура очистки целевого белка из культуральной жидкости, в результате чего был получен гомогенный белковый препарат с высокой люциферазной активностью. Выход чистого белка составлял до 3 мг/л. На следующем этапе работы были исследованы некоторые физико-химические свойства новой люциферазной изоформы *MLuc7*.

Работа выполнена при поддержке РФФИ (грант № 12-04-00131) и программе РАН «Молекулярная и клеточная биология».

Литература:

- [1] Markova SV, Golz S, Frank LA, Kalthof B, Vysotski ES. Cloning and expression of cDNA for a luciferase from the marine copepod *Metridia longa*. A novel secreted bioluminescent reporter enzyme. *J Biol Chem*. 2004; 279:3212-7.
- [2] Borisova VV, Frank LA, Markova SV, Burakova LP, Vysotski ES. Recombinant *Metridia* luciferase isoforms: expression, refolding and applicability for *in vitro* assay. *Photochem Photobiol Sci*. 2008; 7:1025-31.

Кристаллические структуры мутантов Ca^{2+} -регулируемого фотопротейна обелина. Структурные основы молекулярных механизмов изменения биолюминесцентных свойств фотопротейнов

П.В. Наташин, науч. рук. к.б.н., Е.С. Высоцкий

Институт биофизики СО РАН

Замена аминокислотных остатков субстрат-связывающей полости Ca^{2+} -регулируемых фотопротейнов, расположенных на расстоянии водородной связи от атомов 2-гидропероксицелентеразина приводит к изменению биолюминесцентных свойств белка. Для выяснения молекулярных механизмов, лежащих в основе данных изменений, были решены пространственные структуры двух мутантов обелина с заменами Tyr138 на Phe и Phe88 на Tyr в двух конформационных состояниях: до биолюминесцентной реакции (т.е. белок связан с 2-гидропероксицелентеразином) и после реакции (связан с целентерамидом и ионами кальция). Сравнение данных пространственных структур со структурами обелина дикого типа в соответствующих конформационных состояниях свидетельствует о том, что мутационные замены приводят только к локальным изменениям и практически не отражаются на общей структуре белка.

После анализа структур мутанта обелина Y138F было сделано заключение о том, что замедление кинетики биолюминесцентной реакции этого мутанта вызвано отсутствием молекулы воды во внутренней полости белка в районе Phe138. Эта молекула воды появляется в полости обелина Y138F через доступное растворителю отверстие, открывающееся на поверхности белка в процессе конформационных изменений после связывания Ca^{2+} . [1]

Замена Phe88 на Tyr в обелине приводит к изменению спектра биолюминесценции, делая его похожим на спектр биолюминесценции акворина. Мы сравнили системы водородных связей, образованных 2-гидропероксицелентеразином и целентерамидом с аминокислотными остатками, формирующими субстрат-связывающую полость в обелине F88Y, обелине дикого типа и акворине. По результатам исследования был сделан вывод, что основной причиной различия спектров биолюминесценции обелина и акворина является различная организация систем водородных связей в районе мутационной замены, в зависимости от присутствия Phe или Tyr. [2]

Литература:

- [1] P.V. Natashin, W. Ding, E.V. Ereemeeva, S.V. Markova, J. Lee, E.S. Vysotski, Z.J. Liu, Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr. 70, 720-732 (2014)
- [2] P.V. Natashin, S.V. Markova, J. Lee, E.S. Vysotski, Z.J. Liu, FEBS J. 281(5), 1432-1445 (2014)

Влияние физико-химических факторов на флуоресценцию разряженного фотопротейна обелина

Р.Р. Алиева, науч. рук. д.ф.-м.н., проф. Н.С. Кудряшева

Институт биофизики СО РАН

Институт фундаментальной биологии и биотехнологии СФУ

Фотопротейн обелин ответствен за биолюминесценцию морского гидройда *Obelia longissima*. Благодаря способности люминесцировать в присутствии ионов кальция, обелин успешно используют для мониторинга содержания внутриклеточного кальция. С другой стороны, разряженный обелин (продукт биолюминесцентной реакции фотопротейна обелина) способен флуоресцировать, в отличие от исходного белка, и может использоваться в качестве флуоресцентной метки в различных биомедицинских исследованиях. Разряженный обелин стабилен и нетоксичен; спектры его флуоресценции являются суперпозицией нескольких компонентов (эммитеров), соответствующих различным флуоресцентным формам целентерамида, вклад которых в суммарный спектр может изменяться при варьировании эффективности протонных взаимодействий в активном центре фотопротейна. Соотношение вкладов компонентов в этих спектрах определяет цвет люминесценции. Варьировать цвет люминесценции обелина можно не только генетическими [1], но и физико-химическими методами.

В работе рассматривается влияние на флуоресценцию разряженного обелина ряда физико-химических факторов – температуры (40°C), экзогенных веществ – спиртов (глицерина и этанола), которые являются распространенными биомедицинскими агентами, а также длины волны возбуждающего света.

Спектры испускания разряженного обелина, полученного при выдерживании 40°C были измерены при длинах волн возбуждения 260-390 нм, а спектры испускания, полученные при различных концентрациях спиртов были измерены при фотовозбуждении 350 нм (область испускания целентерамида) и 280 нм (область поглощения триптофана).

Спектры испускания, полученные при фотовозбуждении 280 нм, были разделены на гауссовы компоненты: ультрафиолетовую, зелено-голубую и красную, соответствующие испусканию соответственно триптофана, целентерамида и гипотетического эксиплекса, который был впервые нами обнаружен в [2]. Воздействие повышенной температуры (40°C) и добавление спиртов увеличивало вклады ультрафиолетовой (триптофан), фиолетовой (протонированная форма целентерамида) и красной (эксиплекс) компонент, в то время как вклад зелено-голубой компоненты (частично депротонированные формы целентерамида) уменьшался. Все изменения в спектрах связаны с варьированием эффективности переноса протона во флуоресцентном состоянии целентерамида под воздействием деструктивных физико-химических факторов.

Литература:

- [1] N.P. Malikova, G.A. Stepanyuk, L.A. Frank, S.V. Markova, E.S. Vysotski, J. Lee, FEBS Lett. 554,184–188 (2003)
- [2] R.R. Alieva, N.V. Belogurova, A.S. Petrova, N.S. Kudryasheva, Anal. Bioanal. Chem. 405, 3351-3358 (2013)