

**Федеральное государственное бюджетное научное учреждение
Федеральный исследовательский центр
КРАСНОЯРСКИЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР СИБИРСКОГО ОТДЕЛЕНИЯ РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК
Обособленное подразделение
ИНСТИТУТ БИОФИЗИКИ СИБИРСКОГО ОТДЕЛЕНИЯ РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК**

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

28 марта 2017 г.

Красноярск

ПРОГРАММА
НАУЧНОЙ СЕССИИ МОЛОДЫХ УЧЁНЫХ
ИБФ СО РАН 2017 ГОДА

Открытие конкурса-конференции 28 марта (вторник), ауд. 1-08 в 10:00

Вступительное слово:

Председатель конкурсной комиссии, д.б.н., Надежда Николаевна Сущик

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

- | | | |
|---|---|--|
| 1 | Марина Дмитриевна Ларионова
Новая психрофильная <i>Metridia</i> люцифераза: получение и свойства | 10⁰⁵ – 10²⁰ |
| 2 | Дарья Андреевна Горбунова
Оптимизация свойств люциферазы <i>Metridia</i> как биолюминесцентного репортера методом случайного мутагенеза | 10²⁰ – 10³⁵ |
| 3 | Наталья Александровна Оськина
Оценка чувствительности покоящихся яиц пресноводного планктонного рачка <i>Moina macrocora</i> к гамма-излучению | 10³⁵ – 10⁵⁰ |
| 4 | Михаил Юрьевич Салтыков
Скачкообразные изменения в уходящей длинноволновой радиации | 10⁵⁰ – 11⁰⁵ |
| 5 | Анастасия Евгеньевна Рудченко
Влияние сезонной динамики и трофического уровня на состав и содержание жирных кислот в четырёх видах рыб из Красноярского водохранилища | 11⁰⁵ – 11²⁰ |
| 6 | Александр Николаевич Кудрявцев
Биолюминесцентный иммуноанализ природных клещей | 11²⁰ – 11³⁵ |
| 7 | Евгения Евгеньевна Башмакова
Выявление однонуклеотидных полиморфизмов гена MC1R, ассоциированных с риском развития меланомы, биолюминесцентным анализом | 11³⁵ – 11⁵⁰ |

Подведение итогов конференции экспертной комиссией:

д.б.н. Надежда Николаевна Сущик – Председатель

д.б.н. Владимир Станиславович Бондарь

к.б.н. Дмитрий Владимирович Дементьев

к.б.н. Егор Сергеевич Задереев

к.б.н. Олеся Николаевна Кормилец

Заключительное слово:

Председатель конкурсной комиссии, д.б.н., Н.Н. Сущик

Новая психрофильная *Metridia* люцифераза: получение и свойства

М.Д. Ларионова, науч. рук. к.б.н. Е.С. Высоцкий
Сибирский федеральный университет, ИФБиТ,
Институт биофизики СО РАН

Копеподные люциферазы, осуществляющие окисление целентеразина с испусканием голубого света ($\lambda=485$ нм), являются перспективными биолюминесцентными репортерами благодаря естественной секреции, небольшой молекулярной массе, высокой ферментативной активности, а также широкому диапазону детекции [1]. При скрининге кДНК-библиотеки, полученной из морской копеподы *Metridia longa*, был идентифицирован ряд генов люциферазных изоформ. В данной работе описано получение новой изоформы – MLuc2 (18.5 кДа), обладающей уникальными свойствами: низким температурным оптимумом биолюминесценции, а также высокой термостабильностью и ферментативной активностью.

Аминокислотная структура представленной психрофильной изоформы характеризуется высокой гомологией с другими люциферазами из *Metridia* – идентичность между изоформами MLuc7 и MLuc2 составляет около 70 %. Все известные копеподные люциферазы являются Cys-богатыми белками (10 остатков), поэтому их получение в бактериальной системе экспрессии затруднено.

В настоящем исследовании при помощи бакуловирусной системы «Vac-to-Vac» и клеток Sf-9 удалось обеспечить высокий уровень продукции нативных белков и подобрать оптимальные условия очистки люцифераз с выходом свыше 6 мг/л.

Определено, что новая изоформа, как и ранее описанная MLuc7, демонстрирует высокую активность, а также термостабильность с сохранением до 70 % начальной активности после инкубации при 100°C в течение часа. Однако в данные белки значительно различаются температурными оптимумами – около 5°C для MLuc2 и 15°C для MLuc7. Известно, что белки, обладающие низким оптимумом по сравнению с родственными, характеризуются большей гибкостью структуры за счёт ослабления внутримолекулярных взаимодействий [2]. Экспериментально было показано, что изоформа MLuc2 имеет 2 свободных тиольных группы, свидетельствующих об отсутствии одной S-S-связи. Структурные различия были также подтверждены спектральными исследованиями тушения собственной триптофановой флуоресценции – MLuc2 характеризовался более низкими значениями полузавершённости тепловых переходов (T_m).

Предполагается, что новая психрофильная люцифераза MLuc2, расширяющая спектр возможных биолюминесцентных репортерных белков, может служить эффективным инструментом для исследования холодолюбивых организмов, а также быть применена для изучения психрофильных белков.

Работа выполнена при поддержке РФФИ (грант № 16-44-242099).

Литература:

- [1] M.D. Larionova, S.V. Markova, E.S. Vysotski. The novel extremely psychrophilic luciferase from *Metridia longa*: Properties of a high-purity protein produced in insect cells. BBRC; 483 (1):772-778 (2017)
- [2] Struvay C., Feller G. Optimization to low temperature activity in psychrophilic enzymes. Int J Mol Sci; 13 (9):11643-11665 (2012)

Оптимизация свойств люциферазы *Metridia* как биолюминесцентного репортера методом случайного мутагенеза

Д.А. Горбунова, науч. рук. к.б.н. С.В. Маркова

Институт фундаментальной биологии и биотехнологий СФУ,
Институт биофизики СО РАН

Люцифераза из морских копепод *Metridia longa* – небольшой, секретлируемый белок, представленный несколькими изоформами ~18,4-24,2 кДа, катализирующими реакцию окисления целентеразина, сопровождающуюся излучением голубого света ($\lambda=485$ нм) [1]. Три изоформы были использованы в качестве высокочувствительных биолюминесцентных репортеров в *in vitro* анализе [2] и *in vivo* в клетках млекопитающих [3]. Преимуществами данных секретлируемых люцифераз является их относительно малый размер, простота катализируемой реакции, нетоксичность для живых клеток и возможность проведения множественных анализов без разрушения клеток.

Однако существует ряд ограничений использования данных люцифераз как репортеров для биомедицинских исследований: низкий температурный оптимум активности (~16°C), быстрый вспышкообразный сигнал испускания света, а также эмиссия в голубой области спектра, преимущественно поглощаемая живыми тканями.

Целью данного исследования было получение методом случайного мутагенеза вариантов люциферазы *Metridia* (M_{Luc164}) с улучшенными свойствами для использования в качестве биолюминесцентных репортеров. Анализ экспрессионной библиотеки мутантов проводился по нескольким направлениям: в поиске термостабильных и высокоактивных вариантов люциферазы, а также мутантов со сдвигом спектра биолюминесценции в красную область. Первичный скрининг мутантов при различных условиях был произведён на колониях *E. coli* с использованием имиджинговой камеры «BFI-system» (Нижний Новгород). В результате селекции были обнаружены мутанты люциферазы со сдвигом температурного оптимума биолюминесценции в сторону 37°C, и с небольшим сдвигом спектра в длинноволновую область.

Анализ последовательностей отобранных мутантов показал, что варианты с аминокислотными заменами D180V, M77I, P108R, A142T, A128E, T30S характеризовались значительным повышением биолюминесцентной активности при температуре выше комнатной. Один из мутантных вариантов гена *mluc164*-M77I был успешно использован в качестве биолюминесцентного репортера, стабильно экспрессируемого постоянной клеточной линией меланомы человека.

Литература:

- [1] Маркова С.В., Высоцкий Е.С. Биохимия; 80 (6):845-866 (2015)
- [2] Borisova V.V., Frank L.A., Markova S.V., Burakova L.P., Vysotski E.S. Photochem; Photobiol Sci; 7:1025-3 (2008)
- [3] Markova S.V., Larionova M.D., Burakova L.P., Vysotski E.S. Biochem Biophys Res Commun; 457:77-82 (2015)

Оценка чувствительности покоящихся яиц пресноводного планктонного рачка *Moina macroscopa* к гамма-излучению

Н.А. Оськина, науч. рук. к.б.н. Е.С. Задереев

Институт биофизики СО РАН

В результате работы атомной и военной промышленности в водные экосистемы могут попадать радиоактивные вещества, которые накапливаются в воде и донных отложениях и влияют на гидробионты. Ветвистоусые ракообразные – одна из доминирующих групп зоопланктона, играют ключевую роль в сетях питания водных экосистем. Виды родов дафния и моина используются в токсикологических исследованиях.

Для проведения данного исследования использовались покоящиеся яйца пресноводного рачка *Moina macroscopa* полученные в лабораторных условиях. Исследовали чувствительность покоящихся яиц к облучению в широком диапазоне доз (до 200 Гр), а также параметры жизненного цикла и популяционные характеристики особей, вылупившихся из облучённых яиц. Для облучения использовали два источника: ^{137}Cs и промышленный высокоэффективный электронный ускоритель.

Индивидуальные эксперименты. Влияние гамма-радиации на выклев рачков из покоящихся яиц облучённых дозой до 100 Гр было незначимо ($p=0.1$). При облучении яиц дозой 200 Гр наблюдалась 100 % смертность покоящихся яиц *M. macroscopa*. Соматическая скорость роста ювенильных самок, количество отрождённых кладок, доля самцов в потомстве у самок, вылупившихся из покоящихся яиц, облучённых низкими дозами (до 10 Гр), не зависела от дозы облучения. Самки, вылупившиеся из яиц, получивших дозы облучения 80 и 100 Гр, росли медленнее ($P<0.05$) и отродили меньшее количество кладок ($P<0.001$), чем самки получившие более низкие дозы облучения. Чистая скорость воспроизводства зависела от дозы облучения ($p<0.001$). Эффективная доза (доза при которой 50 % особей не размножаются) составила 50 Гр.

Популяционные эксперименты. Контрольные популяции и популяции, полученные из облучённых яиц, развивались схоже. При развитии популяций процент ювенильных самок снижался, партеногенетических увеличивался, а соотношение самцов и самок, образующих покоящиеся яйца, было стабильно. Размер популяции, стартовавшей из покоящихся яиц, облучённых дозой 100 Гр, был меньше, доля самцов – выше, а количество образованных покоящихся яиц меньше, чем в других популяциях.

Впервые определены дозы облучения, вызывающие гибель покоящихся яиц *M. macroscopa* (200 Гр) и негативные репродуктивные эффекты на индивидуальном (50 Гр) и популяционном (100 Гр) уровнях у рачков, которые вылупились из облучённых яиц.

Работа выполнена при поддержке РФФИ (грант № 15-04-05199).

Скачкообразные изменения в глобальных и локальных климатических параметрах

М.Ю. Салтыков

Институт биофизики СО РАН

Уходящая длинноволновая радиация (Outgoing Long-wave Radiation, OLR) является важной величиной, характеризующей климат. Фактически OLR является «кредитом» энергетического баланса Земли. OLR широко используется в современной климатологии [1-3]. Большая часть (70 %) OLR испускается атмосферой и только 17 % – непосредственное излучение земной поверхности [4]. Это является следствием хорошо известного парникового эффекта – поглощения излучения трёхатомными газами в земной атмосфере.

В данной работе представлено изучение динамики OLR по базе данных UMD OLR [5]. Эта база основана на результатах измерений высокочувствительных инфракрасных датчиков HRIS и AHRIS установленных на полярных спутниках серий NOAA и Eumetsat. Исследовались OLR трёх широтных поясов: северного (30° с.ш. – 70° с.ш.), тропического (30° ю.ш. – 30° с.ш.) и южного (30° ю.ш. – 70° ю.ш.). Было продемонстрировано наличие синхронных сдвигов в OLR северного и южного поясов, совпадающих по времени со сдвигами в глобальной температуре обнаруженных ранее в работах нашего коллектива [6, 7].

Работа выполнена при поддержке РФФИ и КФН (грант № 16-45-243088).

Литература:

- [1] Knapp K.R., Ansari S., Bain C.L., Bourassa M.A., Dickinson M.J., Funk C., ... Kossin J.P. Globally gridded satellite observations for climate studies. В Am Meteorol Soc; 92(7):893-907 (2011)
- [2] Davis S.M., Rosenlof K.H. A multidiagnostic intercomparison of tropical-width time series using reanalyses and satellite observations. J Climate; 25(4):1061-1078 (2012)
- [3] Turner E.C., Tett S.F. Using longwave HIRS radiances to test climate models. Clim Dynam; 43(3-4):1103-1127 (2014)
- [4] Kiehl J.T., Trenberth, K.E. Earth's annual global mean energy budget. В Am Meteorol Soc; 78(2):197-208 (1997)
- [5] Lee H.T., Gruber A., Ellingson R.G., Laszlo I. Development of the HIRS outgoing longwave radiation climate dataset. J Atmos Ocean Tech; 24(12):2029-2047 (2007)
- [6] Belolipetsky P., Bartsev S., Ivanova Y., Saltykov M. Hidden staircase signal in recent climate dynamic. Asia-Pacific J Atmos Sci; 51(4):323-330 (2015)
- [7] Bartsev S.I., Belolipetskii P.V., Degermendzhi A.G., Ivanova Y.D., Pochekutov A.A., Saltykov M.Y. Refocusing on the dynamics of the Earth's climate. Her Russ Acad Sci+; 86(2):135-142 (2016)

Влияние сезонной динамики и трофического уровня на состав и содержание жирных кислот в четырёх видах рыб из Красноярского водохранилища

*А.Е. Рудченко, науч. рук. д.б.н., проф. Н.Н. Сущик
Сибирский федеральный университет*

Важной частью рациона современного человека является рыба, которая представляет собой главный источник полиненасыщенных жирных кислот, таких как эйкозапентаеновая (20: 5n-3, ЭПК) и докозагексаеновая кислоты (22: 6n-3, ДГК), содержание которых в мышечной ткани разных видов рыб может отличаться более чем на два порядка [1]. Так, например, состав жирных кислот может быть разным у растительноядных, всеядных и рыбоядных видов [2]. Мы изучили четыре промысловых вида рыб из мезотрофного Красноярского водохранилища. В работе мы проверяли гипотезу о том, что различия в трофических уровнях рыбоядных и всеядных видов рыб могут влиять на уровни и содержание отдельных жирных кислот, в том числе условно незаменимых ЭПК и ДГК. В дополнение к анализу жирных кислот мы также использовали анализ содержимого желудка и содержания стабильных изотопов углерода и азота в мышцах рыб. Различия в составе жирных кислот и соотношения стабильных изотопов позволили выделить всеядные (плотва и лещ) и рыбоядные (речной окунь и щука) виды рыб. Мы обнаружили, что рыбоядные рыбы содержали значительно больше ДГК, по сравнению с всеядными видами рыб. Этот факт, вероятно, означает более высокую эффективность трофического переноса ДГК. Кроме того, было выявлено влияние сезонности на состав жирных кислот у двух рыб, окуня и плотвы. Это воздействие, вероятно, было вызвано прямым и косвенным воздействием температуры воды и сезонными изменениями в кормовой базе рыб. Суммарное содержание ЭПК + ДГК на единицу массы мышечной ткани (показатель питательной ценности для человека) было наиболее высоким у щуки. Таким образом, щука имела наибольшую питательную ценность среди изученных видов рыб.

Работа выполнена при поддержке РФФИ (грант № 16-04-00995а).

Литература:

- [1] Gladyshev M.I., Sushchik N.N., Makhutova O.N. Prostaglandins Other Lipid Mediat; 107:117-126 (2013)
- [2] Vasconi M., Caprino F., Bellagamba F., Busetto M.L., Bernardi C., Puzzi C., Moretti V.M. Lipids; 50:283-302 (2015)

БиOLUMИнесцентный иммуноанализ природных клещей

А.Н. Кудрявцев, науч. рук. д.б.н., проф. Л.А. Франк

Институт биофизики СО РАН

Вирус клещевого энцефалита (ВКЭ) является возбудителем одного из самых тяжёлых человеческих нейроинфекций. Этот вирус передаётся иксодиевыми клещами и широко распространён на евразийском континенте. Тысячи случаев заражения клещевым энцефалитом возникают каждый год, причём более половины из них регистрируется в России. ВКЭ передаётся из слюны инфицированных клещей в течение нескольких минут после укуса клеща, но в среднем только 5-10 % клещей являются передающими ВКЭ-агентами. Своевременное обнаружение заражения ВКЭ позволит обеспечить эффективную терапию заболевания.

Мы разработали иммуноанализ на основе биOLUMИнесцентного гибридного белка 14D5a-Rm7 в качестве зонда для обнаружения ВКЭ. Этот белок состоит из модифицированной люциферазы *Renilla muelleri* в качестве репортера и одноцепочечный вариабельный фрагмент мышинового иммуноглобулина к ВКЭ в качестве биоспецифической части молекулы. Высокая чувствительность гибридной метки в биOLUMИнесцентном твердофазном иммуноанализе ВКЭ была показана в модельном анализе природного гликопротеина E и экстрактов инфицированных лабораторных клещей [1].

В настоящем исследовании экстракты более чем 700 природных клещей были проанализированы с помощью биOLUMИнесцентного иммуноанализа. Из них 171 исследовано с применением целентеразина в качестве субстрата люциферазного домена, а 502 клещевых экстракта – с применением целентеразин-связывающего Ca^{2+} -зависимого белка в качестве стабильной формы субстрата. В качестве дискриминационного фактора использовали отношение сигнал экстракта/сигнал K^- . В качестве отрицательного (K^-) и положительного (K^+) контролей использовали образцы из набора для колориметрического иммуноанализа (Vector-Best D1154). Полученные результаты биOLUMИнесцентного анализа сравнивали с таковыми колориметрического анализа, взятого в качестве стандарта. Чувствительность и специфичность анализа составила 86.7 % (N=15) и 98.6 % (N=487) соответственно при дискриминационном факторе равном 2.0, считая за 100 % показатели колориметрического анализа.

Авторы приносят благодарность сотрудникам ФГУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Красноярском крае» за предоставленные для работы образцы экстрактов клещей с установленным сертифицированными методами наличием/отсутствием ВКЭ.

Литература:

- [1] Burakova L.P., Kudryavtsev A.N., Stepanyuk G.A., Baykov I.K., Morozova V.V., Tikunova N.V., Dubova M.A., Lyapustin V.N., Yakimenko V.V., Frank L.A. Bioluminescent detection probe for tick-borne encephalitis virus immunoassay. Anal Bioanal Chem; 407:5417-5423 (2015)

Выявление однонуклеотидных полиморфизмов гена MC1R, ассоциированных с риском развития меланомы, биолюминесцентным анализом

Е.Е. Башмакова, науч. рук. д.б.н. Л.А. Франк

Институт биофизики СО РАН, Сибирский федеральный университет

В лаборатории фотобиологии ИБФ СО РАН ведутся многолетние исследования по созданию методов высокоэффективного микроанализа на основе биолюминесцентного сигнала целентеразин-зависимых люцифераз. Целью данного исследования была разработка способа выявления однонуклеотидных полиморфизмов в гене меланокортинового рецептора первого типа (MC1R), ассоциированных с развитием меланомы кожи. Способ основан на реакции удлинения специфического праймера (PEXT) с последующим одновременным биолюминесцентным анализом её продуктов. Анализ проводится в микропланшетном формате и занимает около 2 ч (вместе с наработкой матрицы).

Ключевыми универсальными элементами этого анализа являются биоспецифические конъюгаты зелёного и фиолетового вариантов обелина. Для их синтеза разработан способ сайт-специфического конъюгирования, с помощью которого удалось увеличить выход целевых конъюгатов до 70 % (в 10 раз выше, чем для синтеза, разработанного ранее).

Биолюминесцентным твердофазным анализом были исследованы клинические образцы ДНК на наличие трёх полиморфизмов: R151C (rs1805007), R160W (rs1805008) и D294H (rs1805009) гена MC1R, имеющих связь с риском развития меланомы и немеланомного рака кожи (по литературным данным).

Красноярским краевым клиническим онкологическим диспансером были предоставлены образы ДНК 166 пациентов с гистологически подтверждённым диагнозом меланома кожи; кроме того, были исследованы 200 образцов ДНК здоровых доноров. В качестве контроля в работе использовали специально сконструированные плазмидные ДНК, содержащие исследуемый фрагмент ДНК с нормальными и мутантными последовательностями. Все результаты биолюминесцентного анализа подтверждены прямым секвенированием. Были установлены следующие факты:

- 1 наличие полиморфизма R160W ассоциировано с риском развития меланомы (OR 1.7, 95 % CI: 1.03-2.82, $p=0.04$). У пациентов с данным полиморфизмом чаще наблюдались врождённые невусы, чем у пациентов без мутации (OR 2.44 95 % CI: 1.07-5.55, $p=0.03$);
- 2 для полиморфизма R151C ассоциация с риском развития меланомы была статистически незначимой ($p=0.05$);
- 3 полиморфизм D294H встречается крайне редко (0.5 %) и его дальнейшее тестирование для пациентов Красноярского края нецелесообразно.

Таким образом, разработанный нами способ выявления аллельных вариантов гена позволяет быстро и с высокой достоверностью проводить исследования, направленные на определение персональных генетических особенностей пациентов. Современная медицина нуждается в подобных исследованиях для оценки индивидуального риска развития заболевания и выбора наиболее эффективной стратегии терапии.