

**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**

**20 мая 2020 г.**

## ПРОГРАММА

### НАУЧНОЙ СЕССИИ МОЛОДЫХ УЧЁНЫХ ИБФ СО РАН 2020 ГОДА

Открытие конкурса-конференции 20 мая (среда), платформа ZOOM в 10:00

Вступительное слово:

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

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

- |   |   |                                     |
|---|---|-------------------------------------|
| 1 | <b>Павел Юрьевич Андрущенко</b><br>Использование чешуи в качестве маркера жилых и мигрирующих особей сибирского хариуса на участке нижнего бьефа Красноярской ГЭС | 10 <sup>05</sup> – 10 <sup>20</sup> |
| 2 | <b>Дмитрий Валерьевич Гульнов</b><br>Анализ равновесной денатурации бактериальной люциферазы двух типов   | 10 <sup>20</sup> – 10 <sup>35</sup> |
| 3 | <b>Анастасия Вячеславовна Зуева</b><br>Действие малых доз $\gamma$ -излучения на проростки семян лука <i>Allium cepa</i>  | 10 <sup>35</sup> – 10 <sup>50</sup> |
| 4 | <b>Константин Александрович Кистерский</b><br>Оценка физико-механических и структурных свойств полигидроксиалканоатов для биоинженерии твердых тканей             | 10 <sup>50</sup> – 11 <sup>05</sup> |
| 5 | <b>Валентина Сергеевна Кобзева</b><br>Кинетическое исследование стадийности биолюминесцентной реакции, катализируемой бактериальной люциферазой                   | 11 <sup>05</sup> – 11 <sup>20</sup> |
| 6 | <b>Виктория Ивановна Лоншакова-Мукина</b><br>Температурная инактивация бутирилхолинэстеразы в крахмальном и желатиновом гелях                                     | 11 <sup>20</sup> – 11 <sup>35</sup> |
| 7 | <b>Александр Алексеевич Никифоров</b><br>Анализ структурных характеристик белка, влияющих на время жизни флуоресценции: пример карбоксиангидразы быка             | 11 <sup>35</sup> – 11 <sup>50</sup> |
| 8 | <b>Никита Сергеевич Панамарев</b><br>Получение гибридного белка сурвивин-обелин и исследование его свойств как биоспецифического биолюминесцентного репортера     | 11 <sup>50</sup> – 12 <sup>05</sup> |
| 9 | <b>Екатерина Дмитриевна Посохина</b><br>Получение и изучение каталитических свойств композита на основе нановолокон оксида алюминия и наноалмазов                 | 12 <sup>05</sup> – 12 <sup>20</sup> |

**Кирилл Николаевич Стоянов**

10 Состав и содержание жирных кислот в якутской лошади и её основных кормовых ресурсах 12<sup>20</sup> – 12<sup>35</sup>

**Подведение итогов конференции экспертной комиссией:**

д.б.н. Надежда Николаевна Сущик – Председатель

д.б.н. Денис Юрьевич Рогозин

к.б.н. Дмитрий Владимирович Дементьев

к.б.н. Елена Владимировна Еремеева

к.б.н. Людмила Петровна Буракова

**Заключительное слово:**

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

## **Использование чешуи в качестве маркера жилых и мигрирующих особей сибирского хариуса на участке нижнего бьефа Красноярской ГЭС**

Андрущенко П.<sup>1,2</sup>, Зуев И.<sup>2</sup>, Зотина Т.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Институт Биофизики, Красноярский научный центр СО РАН.

<sup>2</sup>Сибирский Федеральный Университет

Сибирский хариус является одним из наиболее массовых и изученных видов промысловых рыб среднего течения р. Енисей. В большинстве цитируемых работ авторами предполагается, что исследованные особи хариуса являются жилыми. Однако, хариусам, как и большинству видов лососеобразных, свойственны нерестовые миграции в придаточные водотоки [1]. Таким образом, считающаяся единой популяция сибирского хариуса в магистральном водотоке Енисея может быть представлена смесью жилых особей и рыб, рожденных или прошедших часть жизненного цикла в придаточном водотоке.

Прямые исследования миграций хариуса на участке среднего Енисея, в силу своей трудоемкости никогда не проводились, поэтому остается неизвестным соотношение жилых и мигрирующих особей. Разные траектории развития жилых и мигрирующих особей могут приводить к различиям в морфологии их чешуи (количества склеритов в годовых кольцах). Таким образом, задачей данной работы была проверка предположения о возможности использования чешуи сибирского хариуса в качестве маркера, позволяющего идентифицировать особей с разным жизненным циклом. Жилых и мигрирующих рыб мы делили по количеству склеритов во втором годовом кольце. Особей, имевших 15 и более склеритов, считали жилыми, а тех, у которых 14 и менее склеритов, считали мигрирующими. Всех анализируемых хариусов рассматривали в качестве одного вида – *Thymallus arcticus*, несмотря на существующее мнение о таксономическом разнообразии этого рода в бассейне Енисея [2].

Выборка сибирского хариуса была собрана в 2007-2018 гг. на двух участках среднего течения р. Енисей – в районе с. Хлопуново (438 экз.), вблизи устья р. Кан, и в районе с. Овсянка, вблизи устья р. Маны (39 экз.) Кроме основной выборки, использовали архивные материалы кафедры водных и наземных экосистем СФУ по хариусу, отловленному в крупных притоках Енисея: реках Амыл, Кан, Н. Тунгуска, Б. Хета.

Результаты исследования показали существенные различия в строении чешуи хариуса из основного русла среднего Енисея сравнительно с популяциями этого вида из притоков. До 30% от выборки хариусов, отловленных в р. Енисей, имела строение чешуи, аналогичное рыбам из притоков. Этим особям мы относим к мигрирующим. Для подтверждения данной гипотезы было измерено содержание <sup>137</sup>Cs в мышцах жилых и мигрирующих особей хариуса, отловленных в сентябре 2019 г. в р. Енисей вблизи устья р. Кан, с помощью гамма-спектрометра, которое показало, что содержание <sup>137</sup>Cs в мышцах жилых особей хариуса в шесть раз превышает содержание этого техногенного радионуклида в мышцах мигрирующих особей. Таким образом, увеличенное число склеритов во 2-4 годовых кольцах сибирского хариуса может считаться морфологическим маркером, отражающим специфику роста этого вида в среднем течении р. Енисей.

### Литература:

[1]. Kristiansen H., Dølving K. B. // Environmental biology of fishes. 1996. 47 (1): С. 43-50.

[2]. Книжин И.Б. // Журнал Сибирского федерального университета. Серия Биология. 2011. 4 (3): С. 293-300.

## Анализ равновесной денатурации бактериальной люциферазы двух типов

Д.В. Гульнов, Л.А. Суковатый, Е.В. Немцева

Институт фундаментальной биологии и биотехнологии Сибирского федерального университета

Определение зависимости стабильности структуры белков от их аминокислотной последовательности остаётся актуальной научной проблемой современной биофизики. В данной работе было исследовано разворачивание мочевиной люцифераз *Photobacterium leiognathi* и *Vibrio harveyi*, принадлежащих, согласно филогенетическому анализу, к разным подсемействам бактериальных люцифераз [1]. Были использованы оптические методы, включающие абсорбционную спектроскопию кругового дихроизма, стационарную и время-разрешенную флуоресценцию, а так же электроферез в градиенте мочевины. Целью исследования являлось сравнение конформационной стабильности двух типов бактериальных люцифераз при денатурации мочевиной. Экспериментальные результаты были сопоставлены со структурными характеристиками белков, полученными вычислительными методами молекулярной динамики.

Было установлено, что оптическими методами могут быть обнаружены две стадии разворачивания из трех, описанных ранее в литературе [2]. Первый переход, соответствующий образованию неактивного димерного интермедиата люциферазы, происходит при концентрации мочевины <2 М и может быть зарегистрирован по изменению характеристик флуоресценции белка (рис. 1). Второй переход – диссоциация субъединиц люциферазы, определяется только методом электрофереза в градиенте мочевины. Процесс разворачивания субъединиц люциферазы (третья стадия денатурации), происходящий при концентрации мочевины 3-5 М, оказался хорошо виден с помощью всех использованных методов. Сопоставление полученных экспериментальных данных с результатами молекулярного моделирования показало, что разница кривых перехода для двух белков обусловлена их структурой и не является следствием разного количества триптофановых остатков в их составе.

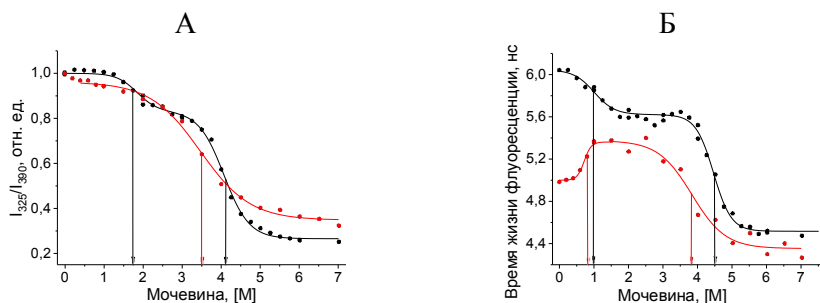


Рис. 1. Зависимость отношения  $I_{325}/I_{390}$  (А) и времени жизни (Б) флуоресценции люциферазы *Photobacterium leiognathi* (черный) и *Vibrio harveyi* (красный) от концентрации мочевины. Стрелками обозначены середины соответствующих переходов.

По результатам исследования был сделан вывод, что пути разворачивания одинаковы для двух белков, но люцифераза *Photobacterium leiognathi* характеризуется большей стабильностью по сравнению с люциферазой *Vibrio harveyi*, поскольку её переходы происходят при более высокой (на ~0,5 М) концентрации мочевины.

## Литература:

- [1] A. A. Deeva, E. A. Temlyakova, A. A. Sorokin, E. V. Nemtseva, V. A. Kratasyuk, Bioinformatics, 32(20), 3053-3057 (2016).  
 [2] J. K. Inlow, T. O. Boldwin, Biochemistry. 41(12), 3906–3915 (2002).

**Действие малых доз  $\gamma$ -излучения на проростки семян лука *Allium cepa***

А.В. Зуева, Е.А. Трофимова, Д.В. Дементьев

Институт биофизики СО РАН

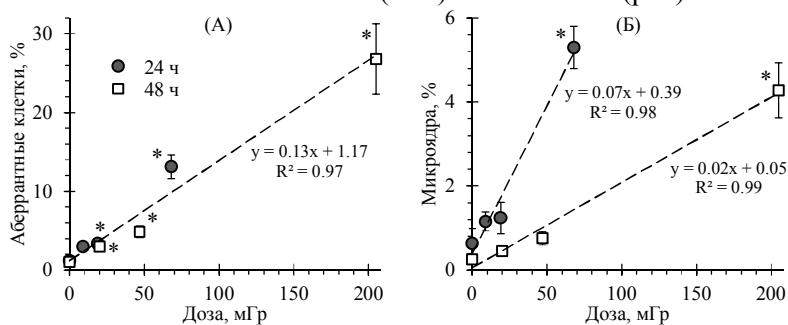
Пойма реки Енисей загрязнена техногенными радионуклидами в следствие многолетней деятельности Горно-химического комбината, что послужило причиной повышения радиоактивного фона в этом районе [1]. Обоснование негативного эффекта малых доз радиации (менее 200 мГр) базируется на беспороговой линейной концепции, которая составляет основу стандартов радиационной защиты, предполагая экстраполяцию биологических эффектов ионизирующего излучения высоких доз на низкие [2]. Цель работы – оценить действие  $\gamma$ -излучения разной длительности в малых дозах на ростовые и цитогенетические показатели корневой меристемы проростков семян лука *Allium cepa*. Результаты эксперимента (таблица) показали, что наиболее чувствительным цитогенетическим параметром является частота встречаемости аберрантных клеток. Достоверные отличия от контроля зарегистрированы при дозе от 20 мГр для 24 и 48 часов облучения соответственно.

Таблица. Значения показателей радиационного повреждения ( $m \pm SE$ )

Время, ч	Доза, мГр	Длина корней, мм	МИ, %	МЯ, %	Аберрантные клетки, %
24	0.01	9.9 $\pm$ 1.7	7.9 $\pm$ 0.7	0.6 $\pm$ 0.4	1.2 $\pm$ 0.3
	10	11.0 $\pm$ 2.3	7.3 $\pm$ 1.0	1.2 $\pm$ 0.2	3.0 $\pm$ 0.5
	20	9.8 $\pm$ 1.9	8.1 $\pm$ 0.8	1.2 $\pm$ 0.4	3.3 $\pm$ 0.6*
	70	9.9 $\pm$ 1.3	9.3 $\pm$ 0.6	5.3 $\pm$ 0.5*	13.1 $\pm$ 1.5*
48	0.01	21.2 $\pm$ 3.2	7.1 $\pm$ 0.9	0.3 $\pm$ 0.1	1.0 $\pm$ 0.3
	20	20.0 $\pm$ 4.0	6.5 $\pm$ 0.7	0.5 $\pm$ 0.1	3.0 $\pm$ 0.4*
	50	20.3 $\pm$ 3.5	7.6 $\pm$ 0.8	0.8 $\pm$ 0.2	4.8 $\pm$ 0.8*
	200	17.6 $\pm$ 3.4*	8.4 $\pm$ 0.9	4.3 $\pm$ 0.7*	26.8 $\pm$ 4.4*

\* – Статистически значимое отличие от контрольного уровня ( $p < 0.05$ ).

Микроядерный индекс (МЯ) показал достоверные различия только для самых больших уровней доз, используемых в эксперименте (70 и 200 мГр). При этом дозовая зависимость частоты клеток с микроядрами и хромосомными нарушениями имела линейный характер (рис). Угнетение роста корней наблюдалось при облучении проростков в течение двух суток при дозе 200 мГр. Подавления митотической активности (МИ) не выявлено (рис).

Рис. Зависимость частоты нарушений на стадии ана-телофазы (А) и частоты микроядер (Б) в клетках от поглощённой дозы при разной длительности  $\gamma$ -облучения.\* – Статистически значимое отличие от контрольного уровня ( $p < 0.05$ ).

Полученные данные могут быть использованы в целях прогнозирования радиэкологического состояния окружающей среды.

## Литература:

[1] A. Bolsunovsky, D. Dementyev, E. Trofimova. J. Environ. Radioact. 211, 106100 (2020). [2] S. I. Zaichkina, O.M. Rozanova, G.F. Aptikaeva et al. Nonlinearity Biol. Toxicol. Med. 2(3), 213221 (2004).

**Оценка физико-механических и структурных свойств полигидроксиалканоатов для биоинженерии твердых тканей.**

*К.А. Кистерский, Е.И. Шишацкая, А.Г. Суковатый, А.Д. Васильев*  
 Институт биофизики, ФИЦ КНЦ СО РАН

3D-принтер, сделали возможным создание объемных изделий по виртуальным моделям. Ежегодно отмечается тенденция введения технологий аддитивного производства в медицинскую биоинженерию, в частности для ортопедии и травматологии. 3D-печать аналогов поврежденных костных органов и хрящей основано на применении биологически совместимых материалов для аддитивных производств. Присутствие биоразрушаемости, как одного из свойств таких биоматериалов, позволяет не только осуществить персонализированное восстановление анатомической целостности органов опорно-двигательной системы, но дает возможность реализовать направленную истинную тканевую регенерацию, являющуюся целью тканевой инженерии.

Класс полимеров полигидроксиалканоаты (ПГА) относится к активным материалам с полной биосовместимостью, биodeградацией и остеоиндукцией, а широкий диапазон термопластичности [1] позволяет использовать их в качестве филамента для 3D-принтера послойного наплавления материала. При постепенной биodeградации объемных изделий из ПГА позволит новообразованной костной ткани формироваться по напечатанному «шаблону». Была проведена оценка структурных свойств ПГА при нескольких последовательных циклах термического воздействия на материал в процессе печати.

Исследована степень кристалличности используемой полимерной композиции поли-3-гидроксibuтират поли-3-гидроксивалерат (далее – ПГБВ) подвергнутой 4 циклам расплавления-стеклования. Согласно полученным данным оборудования Bruker D8 ADVANCE (Германия) степень кристалличности при этом увеличивается с 55% до 60%, а пики на дифрактограмме фазового состава значимо не изменяются.

Физико-механические свойства изделий из ПГБВ изготовлены согласно ГОСТ 12019-66 (Изготовление образцов для испытания из термопластов.) и изучены с использованием испытательной машины Instron 5665 и программного обеспечения BlueHill. Тестирование образцов на растяжение, изгиб и сжатие проходило согласно ГОСТ 11262-2017 (Пластмассы. Метод испытания на растяжение.), ГОСТ 4648-2014 (Пластмассы. Метод испытания на статический изгиб.), ГОСТ 4651-2014 (Пластмассы. Метод испытания на сжатие.). Проведен сравнительный анализ полученных данных, с использованием литературных данных для кости [2, 3].

*Таблица 1 Сравнение физико-механических свойств ПГБВ и кортикальной ткани.*

	Предельная нагрузка ПГБВ [МПа]	Модуль Юнга ПГБВ [GPa]	Предельная нагрузка кость [МПа]	Модуль Юнга кость [GPa]
Сжатие	41,78	1,17	133,00	16,10
Разрыв	31,35	1,08	193,00	22,27
Изгиб	54,96	2,17	223,80	10,95

Работа выполнена при поддержке ФСИ (грант 13533ГУ/2018), Лаборатории биотехнологии новых материалов СФУ и ЦКП ФИЦ КНЦ СО РАН.

**Литература:**

- [1]. Волова Т. Г. и др. Высокомолекулярные соединения. Серия А. – 2013. – Т. 55. – №. 7. – С. 775-775
- [2]. CARTER D. R., Spengler D. M. Clinical Orthopaedics and Related Research (1976-2007). – 1978. – Т. 135. – С. 192-217.
- [3]. Brown T. D., Ferguson A. B. Acta Orthopaedica Scandinavica. – 1980. – Т. 51. – №. 1-6. – С. 429-437.

## **Кинетическое исследование стадийности биолюминесцентной реакции, катализируемой бактериальной люциферазой**

*В.С. Кобзева*<sup>1</sup>, *А.Е. Лисица*<sup>1,2</sup>, *Е.В. Немцева*<sup>1,2</sup>,

<sup>1</sup> *Сибирский Федеральный Университет,*

<sup>2</sup> *Институт биофизики СО РАН*

Биолюминесцентные реакции – это ферментативные процессы, сопровождающиеся излучением света в видимом диапазоне. Интенсивность биолюминесценции в ходе реакции в нестационарном режиме достигает максимума за ~ 1 с, после чего экспоненциально затухает в течение следующих 6 - 60 с. Ранее было показано, что в ряде случаев наблюдается всплеск свечения, предшествующий основному максимуму интенсивности, на который приходится 1 - 2% от общего излучения света. [1] Это приводит к биэкспоненциальному спаду свечения, что говорит о существовании, помимо основного, дополнительного химического пути испускания света.

Целью работы было выявить механизм возникновения биэкспоненциального спада интенсивности биолюминесценции при нестационарной кинетике реакции, катализируемой бактериальной люциферазой. Кинетику регистрировали методом остановленного потока на анализаторе быстрых реакций SX-20 (Applied Photophysics).

На первом этапе исследования были получены кинетические кривые биолюминесцентной реакции при различных типах смешивания люциферазы *P. leiognathi* с FMNH<sub>2</sub> и додеканалем: люцифераза с FMNH<sub>2</sub> + альдегид, люцифераза с альдегидом + FMNH<sub>2</sub> и люцифераза + альдегид с FMNH<sub>2</sub>. Было показано, что отклонение от моноэкспоненциального затухания света проявляется при любой последовательности смешивания реагентов, а значит, не может являться следствием неупорядоченного связывания ферментом субстратов. На втором этапе была исследована кинетика быстрой и медленной люцифераз [2], *P. leiognathi* и *V. harveyi* соответственно, в реакции с додеканалем и тетрадеканалем в качестве субстрата. При использовании додеканала наблюдали биэкспоненциальный спад свечения, в то время как в случае тетрадеканала – моноэкспоненциальный, независимо от типа люциферазы. На следующем этапе работы была исследована кинетика биолюминесценции при реакции интермедиата С4а-гидропероксифлавина с додеканалем. При этом варьировали время задержки запуска реакции от момента формирования С4а-гидропероксифлавина (23 - 301 с). Было установлено, что биэкспоненциальный спад свечения наблюдается для кинетической кривой, полученной через 23 с после формирования интермедиата, в то время как кривые, измеренные позже (через 32 - 301 с), характеризовались моноэкспоненциальным спадом свечения.

Таким образом, впервые были получены кинетические кривые с биэкспоненциальным спадом свечения для быстрой люциферазы *P. leiognathi*. Наличие всплесков свечения, как для медленных люцифераз *V. campbellii* и *V. harveyi* [1], так и для быстрой люциферазы *P. leiognathi*, заставляет усомниться в высказанной ранее гипотезе о том, что их причиной является примесь «быстрых» ферментов в препаратах «медленных» [1]. Полученные результаты позволяют предположить, что всплеск свечения, приводящий к биэкспоненциальному спаду, может быть обусловлен взаимодействием альдегида с двумя различными формами С4а-гидропероксифлавина, образованными вследствие конформационных перестроек люциферазы. В рамках данной гипотезы можно объяснить моноэкспоненциальный спад свечения, наблюдаемый при использовании тетрадеканала в качестве субстрата, тем, что С4а-гидропероксифлавин не успевает образовать различные формы ввиду высокого родства фермента к данному альдегиду.

### Литература:

1. Suadee C. et al. Luciferase from *Vibrio campbellii* is more thermostable and binds reduced FMN better than its homologues //Journal of biochemistry. – 2007. – Т. 142. – №. 4. – С. 539-552
2. Deeva A. A. et al. Structural distinctions of fast and slow bacterial luciferases revealed by phylogenetic analysis //Bioinformatics. – 2016. – Т. 32. – №. 20. – С. 3053-3057.



## Температурная инактивация бутирилхолинэстеразы в крахмальном и желатиновом гелях

*В.И. Лоншакова-Мукина, Е.Н. Есимбекова, В.А. Кратасюк*

*Сибирский федеральный университет, Институт биофизики СО РАН*

Бутирилхолинэстераза (BChE) – фермент из класса гидролаз, катализирующий реакцию гидролиза бутирилтиохолина до холина и масляной кислоты. BChE, наряду с ацетилхолинэстеразой, активно применяется для мониторинга ингибиторов холинэстераз в воздухе, воде, почве и биологических жидкостях. Недостаточная стабильность BChE при её использовании и хранении ограничивает применение данного фермента. Одним из основных способов получения стабильных ферментных препаратов BChE является её иммобилизация в различные носители, в том числе полимеры природного происхождения крахмал и желатин. Целью настоящей работы является определение механизмов термической инактивации бутирилхолинэстеразы в крахмальном и желатиновом гелях для определения возможности использования данных полимеров в качестве стабилизаторов фермента.

Активность BChE определяли по методу Элмана. Регистрацию оптической плотности раствора проводили при длине волны 412 нм. По изменению оптической плотности во времени вычисляли скорость гидролиза бутирилхолинэстеразой субстрата S-бутирилтиохолина йодистого, по полученным результатам делали вывод об активности фермента.

Проведен анализ температурной инактивации BChE в температурном диапазоне 50-64 °С. Установлено, что кинетика термоинактивации BChE в 3%-ом крахмальном и 1,4 %-ом желатиновом гелях имеет принципиально одинаковый характер на всем диапазоне исследуемых в работе температур. Наблюдается кинетика термоинактивации второго порядка, включающая два различных механизма инактивации BChE, последовательно сменяющих друг друга и протекающих с разными скоростями (быстрой и медленной стадий). Быстрая стадия соответствует процессу диссоциации тетрамерного фермента на мономеры, а медленная стадия – процессу денатурации образовавшихся мономеров.

Используя уравнение Эйринга (1), были рассчитаны активационные параметры процесса температурной инактивации.

$$\ln\left(\frac{k_i}{T}\right) = -\frac{\Delta H^\ddagger}{R} \cdot \frac{1}{T} + \frac{\Delta S^\ddagger}{R} + \ln \frac{k_B}{h}, \quad (1)$$

где  $k_i$  константа скорости,  $k_B$  постоянная Больцмана,  $h$  постоянная Планка,  $T$  абсолютная температура,  $R$  универсальная газовая постоянная.

Для каждой стадии были рассчитаны энтальпия активации  $\Delta H^\ddagger$  и энтропия активации  $\Delta S^\ddagger$ . Энтальпия активации  $\Delta H^\ddagger$  для быстрой и медленной стадий температурной инактивации BChE в крахмальном геле составила 61±3, и 22±2 ккал/моль соответственно, энтропия активации  $\Delta S^\ddagger$  составила 136±12 и -2.03±0.05 кал·К<sup>-1</sup>·моль<sup>-1</sup>, соответственно. Аналогично значения  $\Delta H^\ddagger$  для BChE в желатиновом геле составили 58±6 и 109±11 ккал/моль, и значения  $\Delta S^\ddagger$  составили 149±16 и 262± 21 кал·К<sup>-1</sup>·моль<sup>-1</sup> соответственно для быстрой и медленной стадий температурной инактивации BChE. Таким образом, крахмальный гель оказывает больший стабилизирующий эффект на BChE при длительном воздействии высоких температур по сравнению с желатиновым гелем.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ, Правительства Красноярского края, Красноярского краевого фонда науки, проект № 18-44-242003.

## **Анализ структурных характеристик белка, влияющих на время жизни флуоресценции: пример карбоксиангидразы быка**

*А.А. Никифоров<sup>а</sup>, Л.А. Суковатый<sup>а</sup>, Е.В. Немцева<sup>а,б</sup>*

<sup>а</sup>*Сибирский федеральный университет*

<sup>б</sup>*Институт биофизики СО РАН*

Среди собственных флуорофоров белка триптофан обладает наибольшей  $\pi$ -системой, что делает его спектры поглощения и испускания сдвинутыми в длинноволновую область и более удобными для регистрации. Известно, что параметры флуоресценции триптофана чрезвычайно чувствительны к его локальному окружению, и существует много факторов, которые оказывают влияние на эти параметры [1].

Объектом данного исследования была карбоксиангидраза Б быка (BCA II). Для дикого типа этого белка и ряда мутантных форм (L222E, A53C/A76C, D188C/K211C) детально изучены характеристики триптофановой флуоресценции, но структурные факторы, определяющие вариацию этих характеристик, до сих пор не установлены [2].

Цель работы – выявление корреляций между структурно-динамическими характеристиками BCA II и значениями времени жизни собственной флуоресценции этого белка. Влияние окружения триптофановых остатков в структуре белка на параметры флуоресценции оценивалось с помощью методов молекулярного моделирования.

Вычисление молекулярной динамики структуры белка карбоксиангидразы (PDB ID: 1v9e) проводили с помощью программного пакета GROMACS 5.1.4 с использованием силового поля CHARMM36. Моделируемая система представляли собой бокс размером 83,26×83,26×83,26 Å с расположенным в центре белком. Все остальное доступное пространно заполняли молекулами воды (17351 шт.). Трёхмерная структура мутантов BCA II была получена путем аминокислотной замены в программном пакете Swiss-Pdb Viewer. Время вычисления молекулярной динамики дикого типа карбоксиангидразы и ее мутантов составило 30 нс. Для оценки стабильности BCA II было рассчитано среднеквадратичное отклонение (RMSD)  $C_{\alpha}$ -атомов. Сравнение подвижности триптофановых в белке дикого типа и мутантах проводили с помощью параметра среднеквадратичной флуктуации (RMSF)  $C_{\alpha}$ -атомов каждого из аминокислотных остатков.

Моделирование показало, что существенных различий в конформации белка и подвижности основной цепи карбоксиангидразы для дикого типа и исследованных мутантных форм не наблюдается. Был сделан вывод, что подвижность триптофанов в диком типе и всех мутантных формах остается постоянной и не влияет на интенсивность и время жизни флуоресценции. Это также косвенно указывает на то, что окружение триптофановых остатков в мутантах и диком типе белка одинаково. Были выявлены потенциальные тушители в ближайшем окружении каждого триптофана дикого типа белка, рассчитана плотность упаковки триптофановых остатков исследованных белков. Корреляции параметров флуоресценции с плотностью упаковки микроокружения триптофанов не наблюдалось. Рассчитана эффективность безызлучательного переноса энергии между ближайшими триптофанами в структуре карбоксиангидразы (W4 и W15). На основе рассчитанного значения можно говорить о паре W4/W15 как о едином флуоресцирующем центре белка. Рассчитана доступность растворителю триптофановых остатков. Установлено, что наблюдается корреляция между временем жизни флуоресценции триптофана и его доступностью растворителю.

### Литература

[1] P. R. Callis, J. of Mol. Structure. 1077. (2014)

[2] E. V. Nemtseva, M. A. Gerasimova, T. N. Melnik, and B. S. Melnik, PloS one, 14(1) (2019).

## Получение гибридного белка сурвивин-обелин и исследование его свойств как биоспецифического биолюминесцентного репортера

Н.С. Панамарев, Е.Е. Баймакова, Л.А. Франк

Сибирский Федеральный Университет

Институт биофизики, ФИЦ КНЦ СО РАН

Сурвивин - наименьший белок в группе белков-ингибиторов апоптоза (16,5 kDa), который также принимает участие в регулировании деления клеток и способствует ангиогенезу. Сурвивин почти отсутствует в нормальных тканях взрослого человека, но при этом сверхэкспрессируется практически во всех злокачественных опухолях человека. В связи с этим, сурвивин рассматривается как потенциальный биомаркер для выявления раковых заболеваний [1]. В Институте биофизики СО РАН в течение более 30 лет разрабатывают методы высокочувствительной диагностики на основе биолюминесцентных белков-репортеров, одним из которых является  $Ca^{2+}$ -регулируемый фотопротеин обелин. Целью нашего исследования было получение и исследование свойств гибридного белка, содержащего домены сурвивина и обелина (Surv-OL). В результате была получена генетическая конструкция, кодирующая гибридный белок сурвивин-обелин и получен его высокоочищенный препарат с помощью экспрессии в рекомбинантных клетках *E.coli*. Показано, что в полученном гибриде оба составляющих домена обладают свойствами исходных белков:  $Ca^{2+}$ -зависимой биолюминесценцией обелина и аффинностью сурвивина к соответствующим антителам (anti-Surv Ab). Таким образом, полученный белок может быть использован в качестве репортера для выявления сурвивина в конкурентном биолюминесцентном микроанализе.

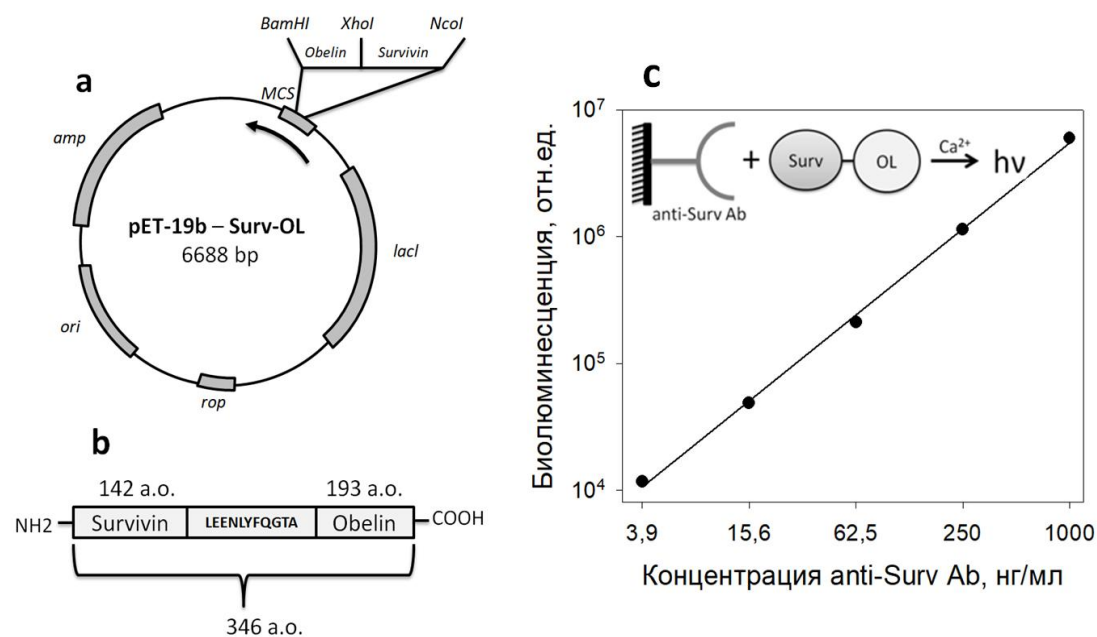


Рис.1. Плазмида, сконструированная для получения гибридного белка (а); состав гибридного белка, показана аминокислотная последовательность линкера между доменами исходных белков (b); зависимость биолюминесценции гибрида Surv-OL от концентрации антител к сурвивину (anti-Surv Ab), сорбированных на поверхности микроплатшета, схема анализа показана вверху(с).

### Литература:

[1] Jaiswal P K, Goel A, Mittal R D. Survivin: A molecular biomarker in cancer. Indian J. Med. Res. 2015;141:389-397

## Получение и изучение каталитических свойств композита на основе нановолокон оксида алюминия и нанодIAMAZOV

Е.Д. Посохина<sup>1,2</sup>, Н.О. Ронжин<sup>1</sup>, И.И. Рыжков<sup>2,3</sup>, В.С. Бондарь<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Институт биофизики ФИЦ КНЦ СО РАН, Красноярск

<sup>2</sup> Сибирский федеральный университет, Красноярск

<sup>3</sup> Институт вычислительного моделирования ФИЦ КНЦ СО РАН, Красноярск

Наличие широкого спектра химически активных групп и микропримесей металлов на поверхности детонационных нанодIAMAZOV открывает возможности их использования в создании систем биомедицинской аналитики [1,2]. В то же время, аналитические системы, в которых сенсорный элемент фиксирован на/в твердой матрице, предпочтительнее при практическом применении. Данное исследование состояло в получении композита из нанодIAMAZOV (сенсорный элемент) и нановолокон оксида алюминия (матрица) и оценке его каталитических свойств при тестировании фенола в водной среде.

В работе сенсорным элементом являлись модифицированные нанодIAMAZOV (МНА) со средним размером кластеров в гидрозолях 55 нм, полученные из детонационных нанодIAMAZOV российского производства (ООО «Реал-Дзержинск», Россия) оригинальным способом [3]. Матрицей являлись нановолокна оксида алюминия (НВОА) диаметром 10–15 нм и длиной до нескольких микрометров (ANF Technology, Эстония).

Композит получали при смешивании водных суспензий НВОА и МНА при весовом соотношении компонентов 5:1 и инкубации смеси при постоянном перемешивании в течение 15 мин при 32 °С [4]. Путем вакуумной фильтрации полученной смеси через фторопластовый фильтр с диаметром пор 0,6 мкм из композита формировали диски. Контрольные диски из НВОА получали аналогично. Для придания дискам структурной стабильности в водных растворах проводили их термообработку при 300 °С.

Показано, что при использованных условиях эксперимента частицы МНА нацело и прочно связываются с НВОА. Из данных СЭМ следует (Рис. 1), что полученный композит имеет сетчатую структуру, в которой кластеры нанодIAMAZOV распределены по поверхности нановолокон оксида алюминия.

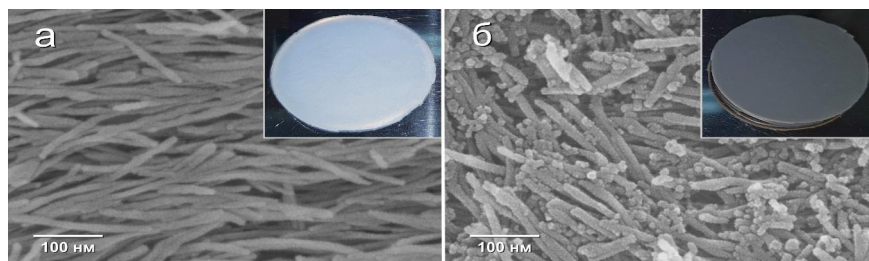


Рис. 1. Внешний вид и СЭМ-изображения структуры дисков из НВОА (а) и из композиционного материала НВОА-МНА (б).

Установлено, что МНА в составе композита обеспечивают его каталитическую активность в реакции окислительного азосочетания (фенол – 4-аминоантипирин – H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) с образованием цветного продукта. Это открывает перспективы для его использования в мониторинге загрязнений водной среды фенолом. В модельных экспериментах показана применимость композита для многократного тестирования фенола в водных образцах.

### Литература:

- [1] N. Ronzhin, A. Baron, A. Puzyr et al., *Modern Clin. Med. Res.* 2, 7 (2018).
- [2] N.O. Ronzhin, A.P. Puzyr, V.S. Bondar, *J Nanosci Nanotechnol.* 18, 5448 (2018).
- [3] A.P. Puzyr, V.S. Bondar, RU Patent No. 2252192. 2005. Bull. No. 14.
- [4] N.O. Ronzhin, E.D. Posokhina, E.V. Mikhлина et al., *Dokl. Chem.* 489, 267 (2019).

## **Состав и содержание жирных кислот в якутской лошади и её основных кормовых ресурсах**

К. А. Петров, Л. В. Дударева, В. В. Нохсоров, К. Н. Стоянов, О. Н. Махутова. Институт биологических проблем криолитозоны СО РАН

Сибирский институт физиологии и биохимии растений СО РАН

ФГАОУ ВО СВФУ имени М.К. Аммосова

ФГАОУ ВС Сибирский федеральный университет

Институт биофизики ФИЦ КНЦ СО РАН

Республика Саха (Якутия) располагается на территории вечной мерзлоты. Для Якутии характерны экстремальные условия: короткий вегетационный период, высокий уровень солнечной радиации, периодические летние заморозки и низкие зимние температуры – всё это оказывает влияние на флору и фауну региона. Якутская лошадь – потомок байкальской лошади, уникальность которой заключается в быстрой скорости адаптации к таким неблагоприятным условиям. Одной из возможных причин адаптации является особенность питания животных - осенняя наживка лошадей происходит на зеленом криокорме. Зелёный криокорм это вторично отросшая после выедания или кошения зелёная масса растений, выросших при низких положительных температурах.

Цель работы: изучить состав и содержание жирных кислот (ЖК) в пище и в тканях якутских лошадей.

Основу рациона лошадей составляют злаки. Нами были исследованы два вида злаков – овес посевной (*Avena sativa*) и костреч безостый (*Bromopsis inermis*). Данные растения выращивались в естественных условиях. Контрольная группа овса посевного была засеяна в мае, а опытная группа – в июле. Опытную группу костреча безостого скашивали после весеннего роста и оставляли отрастать, а контрольную группу оставляли нескошенной. Опытные группы растений вегетировали при низких положительных температурах представляя собой зелёный криокорм. Лошади питались зеленым криокормом в течение 3 месяцев перед сбором тканей (подкожный жир, мышцы, печень). Суммарное содержание липидов в листьях обоих растений увеличивалось на протяжении всего времени роста, как у контрольной, так и у опытной группы. В опытной группе обоих видов растений было обнаружено увеличение суммы липидов: у овса посевного в 1.2 раза и у костреча безостого в 2.4 раза. Основу жирнокислотного состава костреча безостого, составляли три ЖК: 16:0, 18:3n-3, 18:2n-6, суммарное содержание которых достигало 90%. Основными ЖК в тканях лошадей были: 18:1n-9, 18:0, 16:0, 18:2n-6, 18:3n-3. Ткани лошадей накапливали ЖК по-разному, а именно, 18:3n-3 было больше в жировой и мышечной тканях, а 18:2n-6 в печени. Такая вариабельность в накоплении ЖК очевидно объясняется разными функциями этих ЖК в лошадях. Вероятно 18:2n-6 используется как предшественник для синтеза физиологически ценной 20:4n-6, а 18:3n-3 - больше связана с энергетическими потребностями животных. Высокое содержание 18:3n-3 и 18:2n-6, вероятно, помогает якутской лошади успешно существовать в экстремальных условиях Якутии [1].

Данное исследование финансировалось государственным заданием, тема «Биологически активные вещества в экологических, биотехнологических и медицинских системах»; и тема «Биологически активные вещества в трофических цепях водных экосистем как важнейшие компоненты рациона человека и маркеры для сохранения рыбных ресурсов».