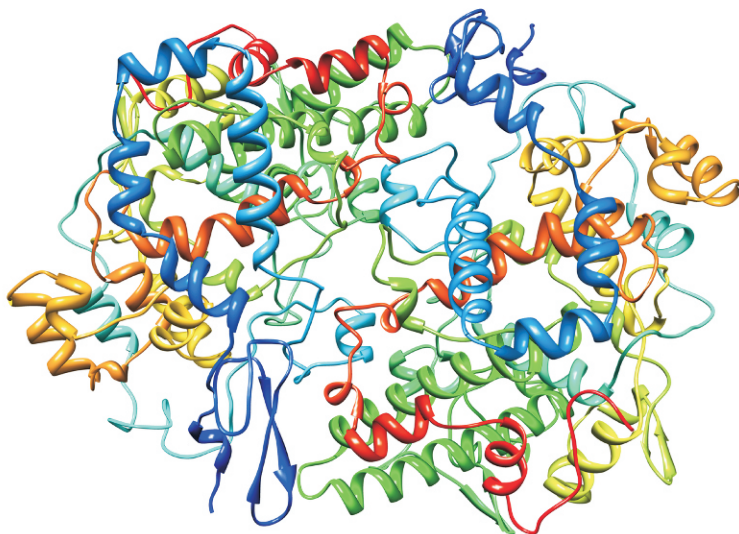


Школа молодых ученых

ПРИМЕНЕНИЕ СИНХРОТРОННОГО ИЗЛУЧЕНИЯ
ДЛЯ РЕШЕНИЯ ЗАДАЧ БИОЛОГИИ



11–13 мая 2022 г.

Новосибирск

МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ РФ
НОВОСИБИРСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
Лаборатория молекулярного дизайна и экологически безопасных
технологий «Институт химических технологий НГУ-ИК СО РАН»

ПРИМЕНЕНИЕ СИНХРОТРОННОГО ИЗЛУЧЕНИЯ ДЛЯ РЕШЕНИЯ ЗАДАЧ БИОЛОГИИ

Школа молодых ученых 11–13 мая 2022 г.
Новосибирск, Россия

Сборник тезисов

Новосибирск
2023

УДК 577.322.63, 544.08, 539.26, 577.323.3

ББК В38.252.8я431+Е0в672я431

П764

Ответственный редактор
канд. хим. наук *С. Г. Архипов*

П764 Применение синхротронного излучения для решения задач биологии. Школа молодых ученых 11–13 мая 2022 г., Новосибирск : Сб. тез. / под ред. С. Г. Архипова ; Новосиб. гос. ун-т. – Новосибирск : ИПЦ НГУ, 2023. – 34 с.

ISBN 978-5-4437-1409-7

Сборник включает тезисы лекций, мастер-классов и стендовых докладов по следующим темам: кристаллизация белков; использование синхротронного излучения для рентгеноструктурного анализа биополимеров и исследования их растворов методом малоуглового рентгеновского рассеяния; организация проведения эксперимента на синхротроне.

Предназначено для студентов, аспирантов и ученых биологических и других специальностей.

УДК 577.322.63, 544.08, 539.26, 577.323.3

ББК В38.252.8я431+Е0в672я431

ISBN 978-5-4437-1409-7

© Новосибирский государственный

DOI 10.25205/978-5-4437-1409-7 университет, 2023

Содержание

ТЕЗИСЫ ЛЕКЦИЙ И МАСТЕР-КЛАССОВ	4
Архипов С. Г.	4
Архипов С. Г., Колыбалов Д. С.	5
Архипов С. Г., Колыбалов Д. С.	6
Бойко К. М.	8
Болдырева Е. В.	9
Дюсенова С. Е., Архипов С. Г.	10
Зубавичус Я. В.	11
Кичкайло А. С., Заблуда В. Н., Морячков Р. В.	12
Наташин П. В., Высоцкий Е. С.	14
Ращенко С. В.	15
Рухлова Е. А.	16
Усачев К. С.	17
ТЕЗИСЫ ДОКЛАДОВ.....	18
Варьгин А. Д., Ворошнина А. А., Говоров Н. М., Горкуша А. С., Дюсенова С. Е., Крупович Е. С., Неустроева А. А., Хайновский М. А., Хомяков Ю. В.	18
Гайдамака А. А., Архипов С. Г., Захаров Б. А., Сереткин Ю. В., Болдырева Е. В.	19
Гордиенко А. М., Можаяев А. А., Дадинова Л. А.	21
Жданова П. В., Черноносков А. А., Коваль В. В.	22
Жуковец А. А.	24
Колыбалов Д. С., Архипов С. Г.	25
Колыбалов Д. С., Дюсенова С. Е., Архипов С. Г., Шевцов М. Б., Щербак Д. Н.	27
Крупович Е. С., Трунова В. А.	28
Морячков Р. В., Заблуда В. Н., Артющенко П. В., Щугорева И. А., Спиридонова В. А., Берлина А. Н., Кичкайло А. С., Соколов А. Э.	30
Неустроева А. А.	31
Унгуриян В. В., Бакулина А. Ю., Колосова Н. П., Даниленко А. В., Рыжиков А. Б.	32

ТЕЗИСЫ ЛЕКЦИЙ И МАСТЕР-КЛАССОВ

УДК 57.088.52, 577.322.63

Подходы к сбору данных РСА на источниках синхротронного излучения

С. Г. Архипов

Новосибирский государственный университет
ЦКП «СКИФ»

arksergey@gmail.com

В докладе отражены основные подходы к сбору первичных дифракционных данных от кристаллов биополимеров, исследуемых методом рентгеноструктурного анализа: метод вращающегося кристалла, метод сбора частичных наборов данных, потоковая кристаллография. Также уделено внимание процессу транспортировки кристаллов макромолекулярных соединений на источник синхротронного излучения и последующей процедуре их монтирования на гониометрическую головку дифрактометра. В докладе обсуждаются подходы к доставке микрокристаллов в пучок рентгеновского излучения при сборе данных методом потоковой кристаллографии с помощью инжекторов и с использованием специальных чипов. Уделяется внимание необходимости наличия микропучков рентгеновского излучения в процессе предварительного эксперимента и во время сбора всего набора данных. Рассматриваются вопросы, связанные с подачей заявок для получения экспериментального времени на источниках синхротронного излучения. Обсуждается возможность участия в коллективных заявках, уделяется внимание преимуществам и недостаткам проведения эксперимента в удаленном режиме.

**Мастер-класс «Обзор возможностей робота
Mosquito Xtal3 для кристаллизации белков»**

С. Г. Архипов^{1,2}, Д. С. Колыбалов¹

¹Новосибирский государственный университет

²Институт катализа им. Г. К. Борескова СО РАН

d.kolybalov@g.nsu.ru

Задачей мастер-класса было познакомить участников школы с возможностями робота Mosquito Xtal3, который используется для создания капель объемом от 25 нанолитров до 1,2 микролитра. Создание капель такого объема необходимо для кристаллизации соединений, количество которых сильно ограничено, чаще всего такими соединениями являются биополимеры. В рамках мастер-класса участники школы были ознакомлены с основными частями робота: движущимся столом для трех планшетов формата SBS, бобиной со сменными дозирующими наконечниками и управляющим компьютером. Затем был выполнен модельный эксперимент по кристаллизации биополимеров методом диффузии паров в технике «сидячая капля». Для этого при помощи пипетки были заполнены резервуары (96 штук) кристаллизационного планшета, предназначенные для растворов осадителей. Затем при помощи робота на специально отведенные на кристаллизационном планшете места были сформированы 384 капли (объем одной капли – 100 нанолитров). После этого демонстрировалось запечатывание планшета для протекания процесса диффузии паров. Кроме того, были подробно разобраны другие возможности робота для кристаллизации техникой «висячая капля», кристаллизация под слоем масла, добавление затравок для кристаллизации, совместная кристаллизация двух различных соединений.

Мастер-класс по демонстрации сбора данных на монокристалльном дифрактометре

С. Г. Архипов^{1,2}, Д. С. Колыбалов¹

¹Новосибирский государственный университет
²Институт катализа им. Г. К. Борескова СО РАН
arksergey@gmail.com

Мастер-класс начинается с обзора основных рабочих узлов монокристалльного дифрактометра и их назначения: рентгеновской трубки, генератора, гониометра, гониометрической головки, держателя образца, гасителя первичного пучка, детектора, системы охлаждения рентгеновской трубки, интерфейса дифрактометра, систем охлаждения образца (до температуры 100 К и до температуры 15 К), интерфейсов систем охлаждения образца, системы защиты оператора от рентгеновского излучения, управляющей программы, освещения от образца и видеокамеры. Для демонстрации используется дифрактометр модели Gemini R Ultra производства Rigaku Oxford Diffraction с двумя источниками рентгеновского излучения (Cu K α , Mo K α) и CCD-детектором. Обсуждаются режимы работы данного прибора, поскольку на нем реализована возможность сбора данных при низких температурах, а также с монокристаллов, помещенных в ячейку с алмазными наковальнями, которые используются для создания давлений до 10 гигапаскалей и требуют сравнительно большого расстояния «образец – детектор». Обсуждаются критерии выбора длины волны при исследовании кристаллов низкомолекулярных и макромолекулярных соединений, а также необходимость криозаморозки кристаллов биополимеров во время сбора данных. Затем демонстрируется монтирование магнитного держателя кристалла (с тестовым образцом) на гониометрическую головку, проводится процедура центрирования монокристалла и запуск предварительного эксперимента. Обсуждается процедура быстрой заморозки кристаллов

биополимеров на гониометрической головке, а также процедура помещения на гониометрическую головку уже замороженных кристаллов. После этого проводится сравнение типового эксперимента по сбору данных на лабораторном дифрактометре и на дифрактометре, установленном на источнике синхротронного излучения. Проводится визуальное сравнение ранее собранных данных с монокристаллов малых молекул и монокристаллов макромолекулярных соединений. Обсуждаются источники «колец» на дифракционных картинах, полученных от монокристаллов, исследуемых в ячейках высокого давления и при низких температурах.

Для демонстрации использовалось оборудование лаборатории «Молекулярный дизайн и экологически безопасные технологии» НОЦ «Институт химических технологий НГУ-ИК СО РАН». Работа выполнена при поддержке гранта Президента Российской Федерации (грант 075-15-2022-607).

Рентгеноструктурный анализ – первая скрипка в оркестре структурной биологии

К. М. Бойко

Институт биохимии им. А. Н. Баха
Федеральный исследовательский центр
«Фундаментальные основы биотехнологии»

Масштабное изучение мира биологических макромолекул наукой, называемой структурной биологией, началось около 70 лет назад. Только за последнее десятилетие в этой области получены две нобелевские премии, а число установленных структур макромолекул (белков и их комплексов) приближается к 200 тысячам. При этом подавляющее большинство этих структур (более 90%) получены методом рентгеноструктурного анализа, являющегося на сегодня основным методом структурного исследования макромолекул.

В рамках доклада будет кратко изложена история развития структурной биологии, определены ее основные задачи и проведен сравнительный анализ современного инструментария структурного исследователя. Особое внимание будет уделено сложностям практического использования метода рентгеноструктурного анализа, способам обойти эти сложности и некоторым результатам, полученным докладчиком с использованием данного метода. В частности, будут показаны примеры использования рентгеноструктурного анализа при изучении биологических объектов различного размера – от относительно малых белковых молекул (домены архитектурных белков) до бактериофагов.

Демонстрируемые результаты получены при частичной финансовой поддержке Российского научного фонда – грант № 21-74-20135 (исследования флуоресцентных белков), Федерального космического агентства – проект КЭ (ЦР) «Кристаллизатор» (исследования тиоцианатдегидрогеназы) и Министерства науки и высшего образования РФ – грант № 075-15-2021-1354 (исследования архитектурных белков).

Как молекула становится лекарством?

Е. В. Болдырева

Институт катализа им. Г. К. Борескова СО РАН
Новосибирский государственный университет
eboldyreva@yahoo.com

Проблема лекарственной независимости и лекарственной безопасности – одна из наиболее важных для любого государства. Не составляет исключения и Россия, в которой проблема импортозамещения в области фармацевтической промышленности стоит очень остро. Путь от лекарственного вещества к лекарственной форме непрост, затратен и дорог. На всех этапах этого пути используются различные инструментальные методы исследования, центральное место среди которых занимают дифракционные методы, в том числе с применением синхротронного излучения. В лекции приводятся примеры использования синхротронного излучения для определения молекулярной структуры низко- и макромолекулярных лекарственных веществ; строения комплексов, образуемых лекарственными веществами с мишенями в организме; для контроля полиморфизма, сольватоморфизма, дефектности кристаллических форм, а также структуры и дисперсности некристаллических фаз (аморфных и мезофаз), строения композитов и дисперсий. Особое внимание уделено проблеме неразрушающего контроля лекарственных форм непосредственно в упаковке, необходимого как для контроля образцов продукции на разных этапах производства и хранения, так и для выявления контрафактной продукции. Обсуждаются также возможности воспроизведения на основании таких исследований состава, строения и метода получения препаратов, про которые ничего неизвестно.

Мастер-класс «Работа с дифракционными данными, собранными с использованием источников СИ: расшифровка, уточнение и валидация структур»

С. Е. Дюсенова^{1,2}, С. Г. Архипов^{2,3}

¹Институт катализа имени Борескова СО РАН

²Новосибирский государственный университет

³ЦКП «СКИФ»

s.diusenova@g.nsu.ru

Мастер-класс посвящен изучению основных инструментов для расшифровки структур макромолекулярных объектов с использованием дифракционных данных, полученных на станциях синхротронного излучения и на лабораторных дифрактометрах. Основная цель мастер-класса заключается в том, чтобы получить практические навыки в индентификации и интегрировании дифракционных картин, в решении структуры и уточнении модели и в проверке качества этой модели по основным валидационным параметрам, которые отображают качество структурной модели в Банке данных пространственных структур белков и нуклеиновых кислот (Protein Data Bank, PDB). Для индентификации и интегрирования слушатели познакомятся с программой XDS, для решения, уточнения и валидации структуры будут использоваться программы Phenix и Coot. Данный мастер-класс будет очень полезен всем, кто планирует или только начал заниматься макромолекулярной кристаллографией.

**Синхротронный источник ЦКП «СКИФ»:
статус и исследовательские возможности**

Я. В. Зубавичус

ЦКП «СКИФ»
ya.v.zubavichus@srf-skif.ru

В докладе представлены основные характеристики синхротронного источника поколения 4+ ЦКП «СКИФ», а также статус реализации проекта. Создание уникальной установки класса мегасайенс ЦКП «СКИФ» – одно из ключевых мероприятий развития исследовательской инфраструктуры в Российской Федерации, реализуемых в рамках национального проекта «Наука и университеты».

Ускорительный комплекс ЦКП «СКИФ» включает линейный ускоритель на 200 мЭВ, кольцевой предускоритель-бустер на полную энергию 3 ГэВ и основной накопитель. Длина орбиты основного накопителя 476 м. Проектное значение эмиттанса основного накопителя ЦКП «СКИФ» составляет 75 нм·рад, что к моменту предполагаемого запуска комплекса в 2024 году будем рекордно низким в мире. Данный факт позволяет отнести ЦКП «СКИФ» к наиболее совершенным источникам синхротронного излучения поколения 4+.

Помимо ускорительного комплекса, к концу 2024 года должен быть запущен комплекс из шести экспериментальных станций первой очереди, на двух из которых предусмотрена возможность проведения исследований методом макромолекулярной кристаллографии в интересах структурной биологии (станции 1-1 «Микрофокус» и 1-2 «Структурная диагностика»).

Применение малоуглового рентгеновского рассеяния в исследованиях ДНК-аптамеров в растворе

А. С. Кичкайло^{1,2}, В. Н. Заблуда^{1,3}, Р. В. Морячков¹

¹Красноярский научный центр СО РАН

²Красноярский государственный медицинский университет

³Институт физики им. Л.В. Киренского СО РАН

annazamay@yandex.ru

Малоугловое рентгеновское рассеяние (МУРР, Small-Angle X-Ray Scattering, SAXS) является на данный момент одним из наиболее востребованных в мире методов изучения строения вещества на молекулярных, субмолекулярных и наноразмерных масштабах [1]. Повышенный интерес обусловлен наличием целого класса фундаментальных и прикладных задач, связанных с исследованием неупорядоченных или слабоупорядоченных систем преимущественно биоорганического происхождения.

МУРР позволяет определить такие структурные параметры, как максимальный размер частицы, радиус инерции, молекулярную массу, объем и пространственную форму. Метод охватывает частицы размерами от 2-3 нм до единиц мкм, массы от 5 кДа до 100 МДа, концентрации раствора от 0,5 до 10 мг/мл, объемы 10–100 мкл. Измерения проводятся напрямую в растворе, в приближенных к нативной среде условиях. Возможно провести восстановление конформации – пространственной структуры биомолекул – на основе данных МУРР с последующей валидацией (построением графика МУРР на основе трехмерной модели молекулы и сравнением с экспериментом), если известны первичная и предполагаемая вторичная структуры биополимеров [2, 3].

МУРР уступает по разрешению (~1 нм) таким методам, как ядерный магнитный резонанс (ЯМР) и рентгеноструктурный анализ (РСА) (0,2–0,4 нм), но при этом не требует столь большого количе-

ства вещества для проведения измерений (на одно измерение достаточно всего порядка 50 мкг вещества), а также позволяет исследовать не поддающиеся кристаллизации биомолекулы такие, как одноцепочечные олигонуклеотиды, гибкие и неупорядоченные белки [4]. Метод позволяет исследовать изменение конформации молекул при изменении внешних условий для биомолекул в растворе таких, как температура, pH, присутствие различных ионов [5]. При наличии неоднородного состава раствора применяется метод совмещенной жидкостной хроматографии с МУРР [6]. С помощью МУРР можно исследовать образование надмолекулярных комплексов [7], проводить поиск структурных фрагментов, не восстановленных другими методами, уточнение структуры, отслеживание конформационных переходов, определение олигомерных составляющих и т. д. Метод может использоваться как самостоятельно, так и являться вспомогательным, например, при построении полноатомных моделей молекулярных распознающих элементов – ДНК-аптамеров, перспективных агентов персонализированной медицины для терапии и диагностики онкологических заболеваний.

Работа поддержана грантом РНФ № 21-73-20240.

1. Da Vela S., Svergun D. I. // Current research in structural biology. 2020. Т. 2. С. 164–170.
2. Tomilin F. N. et al. // Analytical and bioanalytical chemistry. 2019. Т. 411. – №. 25. – С. 6723–6732.
3. Morozov D. et al. // Molecular Therapy-Nucleic Acids. 2021. Т. 25. С. 316–327.
4. Kikhney A. G., Svergun D. I. // FEBS letters. 2015. Т. 589. №. 19. С. 2570–2577.
5. Moryachkov R. V. et al. // AIP Conference Proceedings. – AIP Publishing LLC, 2020. Т. 2299. №. 1. С. 040002.
6. Jeffries C. M. et al. // Nature protocols. 2016. Т. 11. №. 11. С. 2122–2153.
7. Mironov V. et al. // Chemistry–A European Journal. 2022.

Структурные исследования Ca^{2+} -регулируемых фотопротеинов

П. В. Наташин, Е. С. Высоцкий

Институт биофизики СО РАН

pavelnatashin@mail.ru

Ca^{2+} -регулируемые фотопротеины ответственны за свечение морских кишечнорастных животных. Замена аминокислотных остатков активного центра фотопротеинов, а также использование аналогов природного субстрата – целентеразина – приводят к изменениям различных параметров биолюминесцентной реакции (спектр, кинетика, удельная активность). Сравнение полученных пространственных структур обелина дикого типа, его мутантов и обелина со связанным аналогом целентеразином-*v* позволило выявить и охарактеризовать отличия в строении активного центра белка, влияющие на изменения его биолюминесцентных свойств [1–3].

Работа поддержана грантом РФФИ № 20-04-00085.

1. Natashin P. V., Markova S. V., Lee J., Vysotski E. S., Liu Z. J. *FEBS J.* 2014 Mar; 281(5): 1432–1445.

2. Natashin P. V., Ding W., Ereemeeva E. V., Markova S. V., Lee J., Vysotski E. S., Liu Z. J. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.* 2014 Mar; 70 (Pt 3): 720–32.

3. Larionova M. D., Wu L., Ereemeeva E. V., Natashin P. V., Gulnov D. V., Nemtseva E. V., Liu D., Liu Z. J., Vysotski E. S. *Protein Sci.* 2022 Feb; 31(2): 454–469.

Использование оптических критериев в дифракционном эксперименте

С. В. Ращенко

Новосибирский государственный университет

Исторически в области рентгеновской микроскопии сложился развитый аппарат оценки необходимой для достижения заданного пространственного разрешения дозы излучения, попадающей на образец. Учитывая, что построение изображения образца оптической системой и реконструкция электронной плотности элементарной ячейки по данным дифракции описываются в рамках одного физико-математического формализма, можно транслировать терминологию микроскопии, оперирующей понятиями функции рассеяния точки, контраста и соотношения сигнал/шум в область рентгеновской кристаллографии. В результате минимальная доза, необходимая для уточнения структуры с заданным R -фактором (при условии использования корректной модели), при дифракционном разрешении d может быть оценена как $D = \frac{2\pi\beta hc}{(d/2)^4 r_e^2 \lambda^4 \rho R \rho_e^2 \xi(\phi_0)}$, где β – мнимая часть показателя преломления, ρ – плотность, ρ_e – электронная плотность (средняя), а ξ – множитель, зависящий от угловой апертуры ϕ_0 детектора.

**Мастер-класс «Знакомство с программой
для визуализации структурных биополимеров
и создание иллюстраций»**

Е. А. Рухлова

ГНЦ ВБ «Вектор»
ruhlovalena@mail.ru

Мастер-класс был посвящен знакомству с программой Chimera [1], которая используется для визуализации белковых молекул и их комплексов, а также позволяет проводить различные манипуляции с пространственной структурой выбранного белка. Программа Chimera является бесплатной для некоммерческого использования, проста в работе и имеет хорошее графическое представление, что позволяет создавать высококачественные изображения для подготовки публикаций и докладов. На мастер-классе были показаны различные виды представления молекулы (атомное, вторичные структуры, поверхность) и их вариации. Особое внимание было уделено вкладке «Выбор», которая позволяет выбирать отдельные элементы, цепи, аминокислотные остатки или их категории, а также осуществлять поиск по последовательности. Были изучены различные функции этой программы: измерение расстояний между атомами и углами поворота, измерение поверхностного заряда молекулы и др. Было проведено выравнивание двух и более молекул как по последовательности, так и по структурам. Участники мастер-класса познакомились с работой в командной строке, с созданием подписи отдельных атомов и аминокислотных остатков.

1. Pettersen, Eric F et al. UCSF ChimeraX: Structure visualization for researchers, educators, and developers. // Protein science : a publication of the Protein Society. 2021. V. 30. № 1. P. 70–82.

**Интегративная структурная биология – метод
визуализации биохимических реакций
в 3D с атомарным разрешением**

К. С. Усачев

Федеральный исследовательский центр
«Казанский научный центр РАН»

Развитие методов структурной биологии (спектроскопия ЯМР высокого разрешения, рентгеноструктурный анализ и криогенная просвечивающая электронная микроскопия) дало возможность визуализировать процессы, протекающие в биохимических реакциях в 3D с атомарным разрешением. На основе информации о трехмерной структуре биомолекул возможен дизайн новых селективных антибиотиков, связывающихся с уникальными по своему трехмерному строению структурами в молекуле мишени. Мишенями выступают наиболее важные для жизнедеятельности клетки биомолекулы такие, как рибосома, РНК и ДНК-полимераза, белковые факторы и другие [1–3]. Кроме того, структурные данные позволяют объяснять причину устойчивости к антибиотикам различных микроорганизмов и, соответственно, предлагать пути решения данной проблемы.

Исследования выполнены за счет государственного задания ФИЦ «КазНЦ РАН».

1. Golubev A., Fatkhullin B., Khusainov I., Jenner L., Gabdulkhakov A., Validov Sh., Yusupova G., Yusupov M., Usachev K. FEBS Letters. 2020 November. 594:3551-3567.

2. Khusainov I., Fatkhullin B., Pellegrino S., Bikmullin A., Validov Sh., Liu W., Gabdulkhakov A., Al Shebel A., Golubev A., Zeyer D., Trachtmann N., Sprenger G.A., Validov Sh., Usachev K., Yusupova G., Yusupov M. Nature communications. 2020 December. V. 11:1656.

3. Zgadzay Y., Kolosova O., Stetsenko A., Wu Ch., Bruchlen D., Usachev K., Validov Sh., Jenner L., Rogachev A., Yusupova G., Sachs M. S., Guskov A., Yusupov M. Science Advances. 2022 June (in press).

ТЕЗИСЫ ДОКЛАДОВ

УДК 608.4, 535-34

Разработка эскизного проекта станции РСА в рамках курса НГУ «Проектирование станций ЦКП СИ»

А. Д. Варыгин¹, А. А. Ворошнина³, Н. М. Говоров¹,
А. С. Горкуша¹, С. Е. Дюсенова¹, Е. С. Крупович¹,
А. А. Неустроева², М. А. Хайновский¹, Ю. В. Хомяков¹

¹Новосибирский государственный университет

²Институт ядерной физики СО РАН

³Институт химии твердого тела и механохимии СО РАН

a.varygin@g.nsu.ru

Центры коллективного пользования синхротронным излучением (ЦКП СИ) являются сегодня важнейшей составляющей исследовательской инфраструктуры. Ответ на большие вызовы, связанные с развитием источников СИ 4-го поколения, невозможен без квалифицированных кадров, имеющих практические навыки, связанные с проектированием станций СИ. Данная работа является коллективным проектом, выполненным во время прохождения курса кафедры ХТТ ФЕН НГУ «Проектирование станций ЦКП СИ». Задачей настоящей работы является разработка эскизного проекта станции рентгеноструктурного анализа для решения биологических и материаловедческих задач. Эскизный проект содержит варианты принципиальных конструктивных решений, включающих в себя: описание метода исследования и постановку научной задачи; расчет габаритных размеров станции, параметров предлагаемых вставных устройств и элементов рентгеновской оптики; предложения по детекторным, магистральным, вакуумным и защитным системам, системам окружения образца и АСУ; финансово-экономическое обоснование.

Работа выполнена при поддержке программы «Приоритет-2030».

© А. Д. Варыгин, А. А. Ворошнина, Н. М. Говоров, А. С. Горкуша, С. Е. Дюсенова, Е. С. Крупович, А. А. Неустроева, М. А. Хайновский, Ю. В. Хомяков, 2023

**Структурные исследования солей гуанина
и ксантина с щелочными металлами
в широком интервале Т, Р**

А. А. Гайдамака^{1,2}, С. Г. Архипов^{1,2}, Б. А. Захаров^{1,2},
Ю. В. Сереткин^{2,3}, Е. В. Болдырева^{1,2}

¹Институт катализа им. Г. К. Борескова СО РАН

²Новосибирский государственный университет

³Институт геологии и минералогии

им. В. С. Соболева СО РАН

a.gaidamaka@g.nsu.ru

В работе проведены структурные исследования натриевой и калиевой соли гуанина, а также литиевой соли ксантина в широком интервале температур и давлений. Данные соединения представляют интерес в качестве модельных объектов для изучения межмолекулярных взаимодействий между фрагментами пуриновых оснований, катионами щелочных металлов и молекулами воды в структуре нуклеиновых кислот. Кристаллическая структура $2\text{Na}^+ \text{C}_5\text{H}_3\text{N}_5\text{O}^{2-} \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ была исследована в интервале температур 100 К – 298 К и в интервале давлений 1 атм – 2,5 ГПа; $\text{K}^+ \text{C}_5\text{H}_4\text{N}_5\text{O}^- \cdot \text{H}_2\text{O}$ – в интервале температур 100 К – 300 К и в интервале давлений 1 атм – 7,3 ГПа; $\text{Li}^+ \text{C}_5\text{H}_3\text{N}_4\text{O}_2^- (\text{H}_2\text{O})_2$ – в интервале давлений 1 атм – 5,3 ГПа. Рассчитаны коэффициенты тензоров температурного расширения и сжимаемости, для солей гуанина рассчитаны барические эквиваленты термических деформаций [1].

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования РФ совместно Институтом катализа СО РАН (проект АААА-А21-121011390011-4) и НГУ (программа «Приоритет-2030») на оборудовании лаборатории «МДЭБТ» НОЦ «ИНХИТ НГУ-ИК СО РАН».

1. Бубнова Р. С. и др. Программа определения тензора термического расширения и графическое представление его характеристической поверхности (ThetaToTensor-ГТТ) / Физика и химия стекла. – 2013. Т. 39. №. 3. С. 505–509.

**Исследование процесса накопления ионов железа
во внутренней полости белка Dps из *Escherichia coli*
методом аномального малоуглового
рентгеновского рассеяния**

А. М. Гордиенко^{1,2}, А. А. Можаяев^{1,3}, Л. А. Дадинова¹

¹ФНИЦ «Кристаллография и фотоника» РАН

²Московский государственный университет
им. М. В. Ломоносова

³Институт биорганической химии РАН
alex.gor99@mail.ru

Синхротронное излучение в настоящее время активно применяется для определения пространственного распределения атомов различных металлов, включенных в биологические макромолекулы [1]. В данной работе методом аномального малоуглового рентгеновского рассеяния исследовался процесс накопления ионов железа в ДНК-связывающем белке Dps (DNA-binding protein from starved cells) при добавлении в раствор белка FeSO_4 в различной концентрации. В ходе исследования определены объемные функции распределения по размерам кластеров железа, образованных внутри белка. Для образцов с различной концентрацией ионов железа определены основные фракции, демонстрирующие, как распределяются ионы железа внутри полости белка Dps.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 18-74-10071.

1. Andrey Yu. Gruzinov, Martin A. Schroer, et al. Anomalous SAXS at P12 beamline EMBL Hamburg: instrumentation and applications // J. Synchrotron Rad. 2021.

Структурно-динамические особенности белка Cas9 и его комплекса с РНК по данным HDX-MS

П. В. Жданова^{1,2}, А. А. Черноносков¹, В. В. Коваль^{1,2}

¹Институт химической биологии и фундаментальной
медицины СО РАН

²Новосибирский государственный университет

Системы CRISPR-Cas вызывают особый интерес со времени их обнаружения. Эта технология позволяет выборочно изменять последовательности ДНК в любом конкретном месте генома с гораздо большей точностью, чем другие известные технологии модификации генома. В базе данных PDB содержится большое количество структур эндонуклеазы Cas9 и ее различных комплексов с направляющей РНК (sgРНК) и ДНК. Однако данные структуры получены с помощью рентгеноструктурного анализа или метода крио-ЭМ, что не позволяет в полной мере понять, как протекают процессы комплексообразования и механизм действия фермента в динамике. Альтернативным подходом в разрешении структурно-динамических особенностей белков и их комплексов является водородно-дейтериевый обмен с последующим масс-спектрометрическим анализом (HDX-MS). Данный метод имеет значительно меньшее количество ограничений, балансируя между пространственным разрешением и производительностью.

Мы провели эксперименты HDX-MS для белка SpCas9 (*Streptococcus pyogenes*) и его комплекса с sgРНК. Комплекс Cas9-sgРНК готовили с 10-кратным молярным избытком направляющей РНК, добавляя последнюю непосредственно перед началом реакции обмена. Все дальнейшие этапы эксперимента проводились одинаково для белка и его комплекса с РНК. H/D-обмен останавливали в интервале времени от 10 с. до 8 ч. добавлением аликвоты реакционной смеси в раствор с pH 2,5; 0 °C. Образцы немедленно заморажи-

вали в жидком азоте и хранили при температуре $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$. Непосредственно перед анализом образцы быстро размораживали и белок расщепляли на колонке с иммобилизованным пепсином. Полученные пептиды задерживались на колонке-ловушке и затем разделялись на аналитической колонке с последующим масс-спектрометрическим анализом. Для анализа данных было использовано программное обеспечение Proteome Discoverer v 2.2 и HDExaminer v. 3.0.3. Сравнение данных HDX с результатами компьютерного моделирования показало, что связывание направляющей RNA вызывает существенные конформационные изменения в некоторых доменах белка.

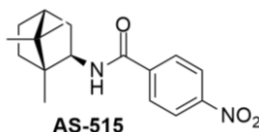
Работа выполнена при поддержке РФФ (20-04-00214).

**Синтез и структурные исследования
4-нитро-N-((1R,2R,4R)-1,7,7-триметилбицикло[2.2.1]
гептан-2-ил) бензамида**

А. А. Жуковец

Новосибирский государственный университет
Институт органической химии
им. Н. Н. Ворожцова СО РАН
a.zhukovets@gsu.nsu.ru

Разработка противовирусных препаратов прямого назначения является актуальной задачей. Сотрудниками НИОХ СО РАН совместно с ГНЦ ВБ «Вектор» было выявлено, что соединение AS-515 и его аналоги проявляют противовирусную активность в отношении различных ортопоксвирусов.



Целью работы является синтез и структурное исследование потенциального антиортопоксвирусного агента с последующим изучением возможности улучшения кажущейся растворимости в воде.

Впервые были получены и охарактеризованы методом РСА монокристаллы AS-515. Кристаллизацию проводили из горячего гексана. Были получены прозрачные кристаллы с формой, напоминающей треугольную призму. Размер исследуемого кристалла AS-515 составлял 0,105 мм×0,156 мм×0,581 мм, пространственная группа симметрии – $P2_1$ и параметры элементарной ячейки $a = 12,7640(5) \text{ \AA}$, $b = 7,1189(3) \text{ \AA}$, $c = 18,3992(7) \text{ \AA}$; $\beta = 96,409(4) \text{ \AA}$.

Выращивание монокристаллов сокристалла L-аскорбиновой кислоты с саркозином

Д. С. Колыбалов¹, С. Г. Архипов^{1,2}

¹Новосибирский государственный университет

²Институт катализа им. Г. К. Борескова СО РАН
d.kolybalov@g.nsu.ru

Впервые сокристаллы L-аскорбиновой кислоты и саркозина были получены в виде монокристаллов путем медленного испарения метанольного раствора в течение 4-х дней [1].

В процессе работы был предложен метод кристаллизации этого соединения из водного раствора по следующему протоколу: в плотно закручивающуюся вials на 2 мл поместили навески саркозина (89 мг, 1 ммоль) и L-аскорбиновой кислоты (176 мг, 1 ммоль), затем их растворили в 300 мкл дистиллированной воды. Полученный таким образом раствор является пересыщенным. Затем 50 мкл раствора переносили на предметное стекло с углублением и сразу же инициировали кристаллизацию при помощи тонкой иглы, проведя ей по поверхности капли. При этом наблюдалось образование кристаллов блочной формы. Быстрая скорость выращивания монокристаллов позволяет избежать окисления L-аскорбиновой кислоты растворенным в воде кислородом. Полученные кристаллы планируется использовать для исследования в широком диапазоне температур и давлений, в том числе с использованием синхротронного излучения.

Работа выполнена при поддержке гранта Президента Российской Федерации (грант 075-15-2022-607). Для выполнения работы использовалось оборудование лаборатории «Молекулярный дизайн и экологически безопасные технологии» НОЦ «Институт химических технологий НГУ-ИК СО РАН».

1. Kavuru P. et al. Hierarchy of Supramolecular Synthons: Persistent Hydrogen Bonds Between Carboxylates and Weakly Acidic Hydroxyl Moieties in Cocrystals of Zwitterions // *Cryst. Growth Des.* 2010. Vol. 10, № 8. P. 3568–3584.

Рентгеноструктурный анализ химозина марала

Д. С. Колыбалов^{1,2}, С. Е. Дюсенова¹, С. Г. Архипов^{1,2},
М. Б. Шевцов³, Д. Н. Щербаков⁴

¹Новосибирский государственный университет

²ЦКП «СКИФ»

³Московский физико-технический институт

⁴ГНЦ ВБ «Вектор»

d.kolybalov@g.nsu.ru

Химозин является важным ферментом в пищевой промышленности и активно используется в производстве сыра. В последнее время особый интерес вызывает использование рекомбинантного белка. Для достижения наилучшего результата в процессе разработки такого белка важно знать его пространственную структуру [1]. Сотрудниками ГНЦ ВБ «Вектор» был выделен и очищен химозин северного оленя. Далее на базе Центра исследований молекулярных механизмов старения и возрастных заболеваний МФТИ были получены монокристаллы этого белка. Кристаллизация проводилась методом «сидячей капли» с использованием кристаллизационного робота Formulator NT8. Сбор дифракционных данных с полученных монокристаллов проводился на станции синхротронного источника излучения ID23-1 ESRF (Гренобль, Франция) в рамках заявки MX2270. Полученные данные были проинтегрированы и индексированы в программном обеспечении XDS с разрешением 2.1 Å. Структура была решена методом молекулярного замещения и уточнена с помощью функции phenix.refine, которые имплементированы в программном пакете Phenix. Начальная модель для молекулярного замещения была предсказана нейросетью AlphaFold2.

Работа выполнена при поддержке программы «Приоритет-2030».

1. Fox P. F. et al. Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology: Major Cheese Groups. Academic Press, 2004. 476 p.

© Д. С. Колыбалов, С. Е. Дюсенова, С. Г. Архипов, М. Б. Шевцов, Д. Н. Щербаков, 2023

Анализ микроэлементов в тканях рыб озера Байкал методом РФА СИ

Е. С. Крупович¹, В. А. Трунова^{2,1}

¹Новосибирский государственный университет

²Институт неорганической химии

им. А. В. Николаева СО РАН

e.krupovich@ng.su.ru

Впервые нами проведен количественный анализ элементного состава тканей и органов рыб (*Coregonus pidschian*, *Coregonus migratorius*) озера Байкал методом рентгенфлуоресцентного анализа с возбуждением синхротронным излучением.

Определение элементного состава тканей и органов рыб проводится с целью экологического мониторинга загрязнения водоемов, а также для контроля содержания токсических элементов в тканях промысловых рыб. Мы считаем, что по данным элементного состава, определенным методом рентгенофлуоресцентного анализа с использованием синхротронного излучения (РФА СИ), можно детектировать патологии рыб и дать основания биохимикам для установления конкретных нарушений в метаболизме (органов). Данных по элементному составу тканей рыб в литературе было найдено минимальное количество. Систематических исследований и рутинных методик в области определения микроэлементного состава тканей рыб в опубликованных материалах не представлено. Интересна работа авторов Cardoso M. et al. из Бразилии, которые в методе рентгенофлуоресцентного анализа с полным угловым отражением (РФА ПВО) применили синхротронное излучение для определения элементного состава мышц рыб [1]. Задачей данного исследования было определение содержания токсических элементов в мышцах промысловых видов рыб.

Исследования проводятся совместно с Лимнологическим Институтом СО РАН. Уникальность этой работы заключается в систематическом исследовании элементного состава органов рыб озера Байкал,

в том числе эндемиков. Институтом Лимнологии нам были представлены образцы красных и белых мышц (омуль), чешуи, мышц, жабр, сердца, печени, почек, мозга (сиг пыжьян). Для всех образцов была проведена пробоподготовка в виде высушивания под прессом и формирования либо пленок, либо таблеток.

Рентгенофлуоресцентный анализ (РФА) – это быстрый, неразрушающий и безопасный для окружающей среды метод анализа. Метод позволяет определять все элементы от бериллия до урана, находящиеся в порошкообразных, твердых и жидких пробах. Концентрации вплоть до 100% можно анализировать напрямую, без какого-либо разбавления пробы. Применение синхротронного излучения в качестве источника рентгеновского возбуждения позволяет определять элементный состав образцов крайне малой массы (от 100 мг до 0,5 мг). Особенности СИ открывают следующие возможности для рентгенофлуоресцентного анализа:

- а) возможность выбора оптимальной энергии возбуждения;
- б) наличие естественной линейной поляризации пучка СИ, которая снижает фон под спектральным пиком определяемых элементов на порядок величины;
- в) малая угловая расходимость пучка СИ в отличие от рентгеновской трубки.

Определяемые элементы: P, S, Cl, K, Ca, Sc, Ti, V, Cr, Mn, Fe, Co, Ni, Cu, Zn, Ga, As, Se, Br, Rb, Sr, Y, Zr, Nb, Mo, Ba, Pb, Th, U. На данном этапе мы разработали пробоподготовку для исследуемых образцов, провели измерения и подобрали стандартные образцы для анализа.

1. Cardoso M. *et al.* Multielemental composition and consumption risk characterization of three commercial marine fish species // *Environmental Pollution*. 2019. №.252. P. 1026–1034.

**Малоугловое рентгеновское рассеяние в исследовании
ДНК-олигонуклеотидов в растворе**

Р. В. Морячков¹, В. Н. Заблуда^{1,2}, П. В. Артюшенко^{1,3},
И. А. Щугорева^{1,3}, В. А. Спиридонова⁴, А. Н. Берлина⁵,
А. С. Кичкайло^{1,3}, А. Э. Соколов^{1,2}

¹Красноярский научный центр СО РАН

²Институт физики им. Л.В. Киренского СО РАН

³Красноярский государственный
медицинский университет

⁴НИИ ФХБ им. А. Н. Белозерского МГУ

⁵ФИЦ биотехнологии РАН

mrv@iph.krasn.ru

Для решения проблемы определения пространственной структуры биомолекул в растворе опробован метод малоуглового рентгеновского рассеяния (МУРР) [1], который показал свою пригодность в применении к белкам, а также к восстановлению третичной структуры аптамеров на основе ДНК и РНК, создаваемых в качестве точно действующих лекарств [2]. Метод МУРР не требует большого количества образца и необходимости кристаллизации биомолекул. Метод получил активное развитие в последние десятилетия с появлением источников интенсивного рентгеновского излучения, а также с усовершенствованием методов обработки данных эксперимента и развитием вычислительных мощностей.

1. Da Vela S., Svergun D. I. Methods, development and applications of small-angle X-ray scattering to characterize biological macromolecules in solution // Current research in structural biology. 2020. Т. 2. С. 164–170.

2. Tomilin F. N. et al. Four steps for revealing and adjusting the 3D structure of aptamers in solution by small-angle X-ray scattering and computer simulation // Analytical and bioanalytical chemistry. 2019. Т. 411. №. 25. С. 6723–6732.

© Р. В. Морячков, В. Н. Заблуда, П. В. Артюшенко, И. А. Щугорева, В. А. Спиридонова, А. Н. Берлина, А. С. Кичкайло, А. Э. Соколов, 2023

**Создание системы окружения образца
экспериментальной станции источника СИ
для контроля функционала живой клетки**

А. А. Неустроева

Институт ядерной физики СО РАН
chizario@gmail.com

Развитие источников СИ 4-го поколения с учетом постоянного совершенствования рентгеновской оптики сделает возможным получение трехмерных изображений живых объектов с нанометровым разрешением [1]. Тем не менее радиационное повреждение образцов, приводящее к изменениям их функционала, неизбежно серьезно искажает данные, получаемые в ходе синхротронного эксперимента. Для того чтобы иметь возможность анализировать состояние объекта в каждый момент времени, мы предлагаем систему окружения образца для контроля за живой единичной клеткой, а точнее – ее функционалом непосредственно во время синхротронного эксперимента с использованием не повреждающих клетку зондов, оптимизированных для использования на СИ.

На данном этапе работы был проведен анализ литературы по эффектам взаимодействия ионизирующего излучения с биологическими молекулами и радиационной цитологии и зондам для исследования клеточного функционала; изучено современное состояние радиобиологических исследований в области экспериментов на СИ и подтверждена актуальность заданной темы; ведется подготовка к эксперименту на станции «Космос» ВЭПП-3.

1. N. I. Chkhalo et al., "X-ray optical scheme for station "nanoscope" for biological research in the water window", 2020.
Режим доступа: <https://doi.org/10.1063/5.0031702>

Анализ связывания гемагглютининов вируса гриппа с аналогом человеческого рецептора

В. В. Унгурян^{1,2}, А. Ю. Бакулина¹, Н. П. Колосова¹,
А. В. Даниленко¹, А. Б. Рыжиков¹

¹ГНЦ ВБ «Вектор»

²Новосибирский государственный университет

v.unguryan@g.nsu.ru

Гемагглютинин вируса гриппа – это поверхностный белок, играющий ключевую роль в процессе проникновения вируса внутрь клетки. На первом этапе гемагглютинин связывается с мембранным рецептором. Вероятность для вируса проникнуть внутрь клетки зависит от энергетических характеристик белково-рецепторных связей.

Объектами исследования выступали белки гриппа серотипа А(Н3N2): представитель новой группы Бангладеш и международный референсный штамм. Целью работы было сравнить свободную энергию связывания представителя группы Бангладеш и референсного штамма с аналогом человеческого рецептора методом молекулярного докинга.

Начальные структуры белков моделировались в MODELLER по шаблону структуры гемагглютинина, полученной методом PCA, с 95% сходством аминокислотных последовательностей (код PDB – 6bkt). Уточнение структур производилось методом молекулярной динамики в NAMD. Для каждого белка было отобрано 1000 конфигураций для оценки энергии с помощью Autodock Vina. Для выборки из оценок энергии была построена гистограмма, по которой были определены средние значения. Для представителя группы Бангладеш оно оказалось равным –12.7 ккал/моль, для референсного штамма –11.27 ккал/моль. Более низкое значение (на 1,43 ккал/моль) для представителя группы Бангладеш может быть связано с более высокой трансмиссивностью данной группы вирусов.

Научное издание

ПРИМЕНЕНИЕ СИНХРОТРОННОГО ИЗЛУЧЕНИЯ
ДЛЯ РЕШЕНИЯ ЗАДАЧ БИОЛОГИИ

Школа молодых ученых
11–13 мая 2022 г.
Новосибирск, Россия

Сборник тезисов

Корректор *Н. А. Ермакова*
Верстка *Н. А. Ермаковой*
Обложка *Е. В. Неклюдовой*

Подписано в печать 20.01.2023 г.
Формат 60 x 84 1/16. Уч.-изд. л. 2,25. Усл. печ. л. 2,1.
Тираж 26 экз. Заказ № 301
Издательско-полиграфический центр НГУ
630090, Новосибирск, ул. Пирогова, 2.

ISBN 978-5-4437-1409-7



9 785443 714097