открытие конференции

А.П. Савицкий, Wolfgang Becker, представители DWIH

Зал «Рубин»3 октября, 14.00 – 14.20

Anna Savostina, *German House for Research and Innovation (DWIH) in Moscow*

Деятельность DWIH в Москве. Механизмы финансирования и укрепления германо-российского сотрудничества

Флуоресцентный и фосфоресцентный
время-разрешенный имиджинг

Председатели: Ammasi Periasamy, Е.В. Загайнова

Зал «Рубин»3 октября, 14.20 – 16.20

30 мин Wolfgang Becker *Becker&Hickl GmbH, Berlin, Germany*

Флуоресцентный время-разрешенный имиджинг с использованием многомерного коррелированного счета одиночных фотонов (TCSPC): новые методы и применение

30 мин Michael Roberts *University of Queensland, Brisbane, Australia*

*Ex vivo* и *in vivo* имиджинг молекулярных и наносистемных транспортеров

30 мин Klaus Suhling *Kings College, London, UK*

Широкопольный коррелированный счет одиночных фотонов во флуоресцентной микроскопии

30 мин Е.В. Загайнова1, М. Ширманова1, И. Дружкова1, М. Лукина1, В. Дуденкова1,2, В. Щеславский4, В. Белоусов1,3, К. Лукьянов1,3 *1Нижегородская государственная медицинская академия; 2Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского, Нижний Новгород; 3Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, Россия; 4Becker & Hickl GmbH, Берлин, Германия*

Метаболизм опухоли: флуоресцентный имиджинг с автофлюорофорами и генетически кодируемыми сенсорами

16.20 – 16.40 Кофе-брейк

Зал «Рубин»3 октября, 16.40 – 19.50

30 мин Dusan Chorvat, A. Mateasik, A. Marcek Chorvatova *Department of Biophotonics, International Laser Centre, Bratislava, Slovakia*

Современный имиджинг и спектроскопия эндогенных флуорофоров

20 мин М.В. Ширманова1, Л.Е. Шимолина1,2, М.К. Куимова3, Л.Г. Клапшина4, Е.В. Загайнова1 *1Нижегородская государственная медицинская академия; 2Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского, Нижний Новгород, Россия, 3Имперский колледж Лондона, Лондон, Великобритания, 4Институт металлоорганической химии им. Г.А. Разуваева, Нижний Новгород, Россия*

Измерение вязкости опухолевых клеток с использованием молекулярных роторов и FLIM

15 мин Sviatlana Kalinina, J. Breymayer, A. Bisinger, A. Rück *University of Ulm, Core Facility Confocal and Multiphoton Microscopy, Ulm, Germany*

Одновременный контроль NADH методом FLIM и pО2 методом PLIM для визуализации метаболических параметров

30 мин Thomas Gensch *Research Centre Jülich, Jülich, Germany*

Внутриклеточная концентрация ионов в живых клетках и тканях, определяемая методом время-разрешенной флуоресцентной микроскопии (FLIM)

30 мин Michael Börsch *University of Jena, Jena, Germany*

Наблюдение за работой роторных моторов F oF1 -ATP синтетаз используя FRET одиночных молекул

25 мин И.В. Турчин1, М.С. Клешнин1, А.Г. Орлова1, В.И. Плеханов1, М.В. Ширманова2, Е.В. Загайнова2 *1ФИЦ Институт прикладной физики РАН;2НИИ биомедицинских технологий, Нижегородская государственная медицинская академия, Нижний Новгород, Россия*

Флуоресцентная визуализация опухолей лабораторных животных с использованием генетически-кодируемых сенсоров

20 мин Patrick Schaefer *University of Ulm, Ulm, Germany*

Имиджинг митохондриальных функций при болезни Альцгеймера

20 мин А.С. Белова, А.Г. Орлова, И.В. Балалаева, Н.О. Антонова, Н.М. Мишина, Е.В. Загайнова *ФИЦ Институт прикладной физики РАН, Нижний Новгород, Россия*

Флуоресцентное определение изменений уровня пероксида водорода при воздействии цисплатина на опухолевые клетки

Томография, диффузионный оптический
и клинический имиджинг

Председатели: В.В. Тучин, Heidrun Wabnitz

Конгресс-зал4 октября, 8.30 – 11.05

30 мин В.В. Тучин *Научно-образовательный институт оптики и биофотоники, Саратовский национальный исследовательский государственный университет, Саратов, Россия*

Оптическое просветление биологических тканей и клеток как инструмент повышения качества микроскопии и визуализации: от *in vitro* к *in vivo*

30 мин Heidrun Wabnitz *PTB Berlin, Germany*

*In vivo* время-разрешенный диффузионный оптический имиджинг взрослого человеческого мозга

30 мин Karsten Koenig *University of Saarbruecken, Saarbruecken, Germany*

Многофотоная томография астронавтов

20 мин А.Б. Коновалов, В.В. Власов, А.С. Углов *Российский федеральный ядерный центр – ВНИИ технической физики им. Е.И. Забабахина, Снежинск Челябинской обл., Россия*

Аналитическая пертурбационная модель для импульсной диффузионной оптической томографии высокого разрешения в трансмиссионной плоскопараллельной геометрии

20 мин Yoko Miura *University of Lübeck, Lübeck, Germany*

Флуоресцентные времена жизни при патологии клеток ретиналя

20 мин Martin Hammer  *University of Jena, Jena, Germany*

Патологические изменения при клиническом использовании FLIM для изучения глазного дна – уроки использования двухфотонной микроскопии *in vitro*

15 мин I. Ferulova, A. Dzerve, A. Lihachov, J. Spigulis *Institute of Atomic Physics and Spectroscopy, University of Latvia, Riga, Latvia*

Корреляция скорости фото выцветания аутофлуоресценции кожи с временами жизни

11.05 – 11.30 Кофе-брейк

Супер-разрешающАЯ микроскопиЯ

и детекция одиночных молекул

Председатели: Jerker Widengren

Конгресс-зал4 октября, 11.30 – 13.30

30 мин Jerker Widengren *KTH, Royal Institute of Technology, Stockholm, Sweden*

Флуктуации флуоресценции и супер-разрешающие методы – основа изучения биомолекул для дальнейшей клинической диагностики

30 мин Ago Rinken *University of Tartu, Institute of Chemistry, Tartu, Estonia*

Основанные на флуоресценции методы мониторинга кинетики связывания с GPCR рецептором

20 мин Vladislav Shcheslavskiy *Becker & Hickl GmbH, Berlin, Germany*

Сканирующая ближнепольная микроскопия усиленная время-разрешенным флуоресцентным имиджингом

20 мин Herman Fennema *Nikon Instruments Europe B.V., Netherlands*

Современные методы супер-разрешающей микроскопии от Nikon

20 мин Н.В. Клементьева1, О.Е. Фурман1,2, Е.В. Загайнова1, К.А. Лукьянов1,3, А.С. Мишин1,3 *1Нижегородская государственная медицинская академия; 2Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского, Нижний Новгород; 3Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, Россия*

Флуоресцентная микроскопия тонкой структуры актина в опухолевых клетках и тканях

13.20 – 14.30 Обед

Пленарные лекции

Модераторы Vladislav Shcheslavskiy, А.П. Савицкий

Конгресс-зал4 октября, 14.30 – 16.00

45 мин Enrico Gratton *University of California, Irvine, USA*

Метаболические изменения в клетках и тканях, выявляемые FLIM по эндогенной флуоресценции

45 мин Anna Moore *Massachusetts General Hospital, Harvard Medical School, Boston, USA*

Визуально корректируемая персонифицированная наномедицина в терапии рака

ОТКРЫТИЕ ФОРУМА

Конгресс-зал4 октября, 17.00 – 19.40

Председатели:
А.И. Григорьев, Ю.В. Наточин, Р.И. Сепиашвили,
В.Т. Иванов, А.Г. Габибов, А.П. Савицкий,
Arieh Warshel, Christopher Contag,
В.А. Ткачук, М.А. Островский, В.А. Черешнев,
Alain Krol, Michael Blackburn

АКТОВАЯ ЛЕКЦИЯ

45 мин Arieh Warshel

Успехи компьютерного моделирования биохимических процессов
на молекулярном уровне

АКТОВАЯ ЛЕКЦИЯ им. И.П. ПАВЛОВА

45 мин В.А. Ткачук

В.П. Демихов – великий русский хирург, трансплантолог, физиолог

ПЛЕНАРНАЯ ЛЕКЦИЯ

30 мин Christopher Contag

Визуализируя биологию животных и человека

ПРИВЕТСТВЕННЫЙ КОКТЕЙЛЬ

4 октября, 20.00 – 21.30

ХИМИЯ МЕТОК

Председатели: Алексей Богданов, Marcel Leutenneger

Зал «Рубин»5 октября, 8.30 – 10.45

30 мин А.П. Савицкий *ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, Москва, Россия*

SAASOTI – новая метка для супер-разрешающей микроскопии

30 мин К.А. Лукьянов *Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, Нижегородская государственная медицинская академия, Нижний Новгород, Россия*

Имиджинг с высокой фотостабильностью в живых клетках

30 мин Marcel Leutenneger *Max Planck Institute for Biophysical Chemistry, Gottingen, Germany*

Синтетические флуорофоры для GSDIM: скрининг и анализ изображений

30 мин Алексей Богданов *Department of Radiology University of Massachusetts Medical School, Boston, USA*

Метки и сенсоры для ближне-инфракрасного имиджинга ферментативной активности и взаимодействий ДНК с белками

15 мин Д.А. Горбачев, К.С. Саркисян, А.С. Горященко, А.С. Мишин, К.А. Лукьянов *Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН; ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, Москва, Россия*

Зеленые флуоресцентные белки с большим временем жизни флуоресценции

11.15 – 11.30 Кофе-брейк

Конгресс-зал 5 октября, 10.45 – 15.05

пленарные доклады Форума

УЧРЕДИТЕЛЬНОЕ СОБРАНИЕ
Российского общества молекулярного имиджинга

 Зал «Рубин»5 октября, 12.40 - 13.25

13.30 – 14.30 Обед

Зал «Рубин»5 октября, 14.20 – 15.40

30 мин Wolfgang Becker *Becker&Hickl GmbH, Berlin, Germany*

Одновременный фосфоресцентный и флуоресцентный время-разрешенный имиджинг методами мульти-размерного TCSPC и мульти-импульсного возбуждения

20 мин Dmitriy Papkovskiy *University of Cork, Cork, Ireland*

Имиджинг оксигенации и клеточных функций в 3D моделях тканей методом мультиплексного PLIM/FLIM

30 мин Н.Н. Угарова1, М.И. Кокшаров1,2 *1Кафедра химической энзимологии, Химический факультет, МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия; 2Факультет молекулярной биологии, Университет Женевы, Швейцария*

Люцифераза светляков как белковый зонд для имиджинга и мониторинга в живых система

НЕЙРОНАУКИ

Председатели: А.В. Семьянов, К.А. Лукьянов

Зал «Рубин»5 октября, 16.20 – 18.30

30 мин А.В. Семьянов *НИИ нейронаук, ННГУ им Лобачевского, Нижний Новгород, Россия*

 Клеточный и субклеточный оптический имиджинг в нейронауках

30 мин В. Белоусов *Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, Россия*

Термогенетическая стимуляция нейронов на уровне клеточного разрешения

30 мин И.В. Федотов1–3, М.С. Почечуев1, О.И. Ивашкина1,3, М.А. Рощина1,3, А.Б. Федотов1–3, К.В. Анохин1, А.М. Желтиков1–4 *1НИЦ Курчатовский институт, 2Физический факультет, Международный учебно-научный лазерный центр, МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия; 3Российский квантовый центр, Сколково, Московская область, Россия, 4Факультет физики и астрономии, Техасский университет, Остин, США*

Волоконно-оптические нейроинтерфейсы для флуоресцентной визуализации мозга

20 мин О.И. Ивашкина, М.А. Рощина, К.А. Торопова, К.В. Анохин *НИЦ «Курчатовский институт», Москва, Россия*

Кодирование условных сигналов нейронами неокортекса у мышей: исследование методом прижизненной двухфотонной микроскопии

20 мин Franco Klingberg, *Thermo Fisher Scientific, Darmstadt, Germany*

Новые реагенты и технологии для имиджинга живых клеток

Стендовая сессия

Модераторы А.П. Савицкий, Wolfgang Becker

Зал «Рубин»5 октября, 8.30 – 13.00

А. Айбуш, Ф. Гостев, А. Титов, В. Надточенко *Институт химической физики им. Н.Н. Семенова РАН, Москва, Россия*

Визуализация биологических объектов в C-CARS микроскопии

Е.А. Борулева1, В.В. Жердева1, А.П. Савицкий1,2 *1ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН; 2Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия*

Изучение эндогенной флуоресценции живых клеток млекопитающих методом FLIM

В. Дуденкова1,2, В. Елагин2, Е. Губарькова2, К. Бабак1, Н. Гладкова2, Е. Загайнова2 *1Нижегородский университет им. Н.И. Лобачевского; 2Нижегородская медицинская академия, Нижний Новгород, Россия*

Количественные характеристики изменения сигнала ГВГ от коллагена для различных биологических моделей

Н.Г. Гурская1, М.М. Перфилов1,2, Н.В. Клементьева2, А.С. Мишин1,2, К.А. Лукьянов1,2 *1Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва; 2Нижегородская государственная медицинская академия, Нижний Новгород, Россия*

Флуоресцентное мечение белков в живых клетках, опосредованное гетеродимеризацией искусственных альфа-спиралей

Н.И. Казачкина1, В.В. Жердева1, Н.Н. Одинцова1, В.И. Щеславский2, Н.Т. Райхлин3, А.П. Савицкий1 *1Институт биохимии им. А.Н. Баха, ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, Москва, Россия; 2Becker&Hickl Ltd, Берлин, Германия, 3Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина МЗ РФ, Москва, Россия*

Изучение флуоресцентных свойств сенсора каспазы-3 в опухолевых клетках при воздействии противоопухолевых агентов.

Sergei Kopanchuk, Santa Veiksina, Ago Rinken *Institute of Chemistry, University of Tartu, Tartu, Estonia*

Аллостерическая модуляция связывания пептидных лигандов с рецептором Y1 нейропептида Y выявляемая методом глобального анализа интегративных флуоресцентных данных

E.И. Кошель1, A.В. Радаев1, П.С. Челушкин2, В.И. Щеславский3, О.О. Чернявський4, A.С. Мельников1, A.Ф. Саифитдинова1, E.Р. Гагинская1, С.П. Туник1 *1Санкт-Петербургский государственный университет; 2Институт высокомолекулярных соединений, РАН, Санкт-Петербург, Россия, 3Becker & Hickl GmbH, Берлин, Германия, 4Институт физиологии, Чешская академия наук, Прага, Чешская Республика*

Новый липофильный фосфоресцентный люминофор для двухфотонного биоимиджинга

Е.И. Кошель1, А.И. Соломатина2, П.С. Челушкин2, В.И. Щеславский3, А.Ф. Саифитдинова1, Е.Р. Гагинская1, С.П. Туник1 *1Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия; 2 Институт высокомолекулярных соединений, Российская академия наук, Санкт-Петербург, Россия; 3 Becker & Hickl GmbH, Берлин, Германия*

Новые фосфоресцентные люминофоры на основе комплексов переходных металлов для фосфоресцентного молекулярного имиджинга (PLIM)

А.Б. Коновалов1, В.В. Власов1, А.С. Углов1, В.В. Любимов2 *1Российский федеральный ядерный центр – ВНИИ технической физики им Е.И. Забабахина, Снежинск, Челябинская обл; 2Институт лазерной физики научно-производственной корпорации – Государственный оптический институт им. С.И. Вавилова, Санкт-Петербург, Россия*

Аналитическая пертурбационная модель для импульсной диффузионной оптической томографии высокого разрешения в трансмиссионной плоскопараллельной геометрии

Р.У. Марданова, В.В. Жердева, А.П. Савицкий *Институт биохимии им. А. Н. Баха, ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, Москва, Россия*

Визуализация каспазного сенсора в трехмерной культуре опухолевых клеток

Н.К. Марынич1, А.С. Горященко2, А.П. Савицкий1,2 *1Химический факультет, МГУ им. М.В. Ломоносова; 2Инсти­тут биохимии им. А.Н. Баха, ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, Москва, Россия*

Выделение, очистка и характеристика свойств сенсоров каспазы-3 тr-m5-к и тr-m6-к

М.П. Самцов1, С.Д. Тарасов1, В.В. Жердева2, И.Г. Меерович2, Л.С. Ляшенко1, Е.С. Воропай1, А.П. Савицкий2
*Институт прикладных физических проблем им. А.Н  Севченко, Белорусский государственный университет, Минск, Беларусь; 2ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, Москва, Россия*

Особенности регистрации флуоресценции индотрикарбоцианиновых красителей в биотканях

Л.А.Шапошников1, А.С. Горященко2, А.П. Савицкий1,2 *1Химический факультет, МГУ им. М.В. Ломоносова; 2Институт биохимии им. А.Н. Баха, ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, Москва, Россия*

Изучение олигомерного состояния fret-сенсоров каспазы-3 tr-м5-k и tr-м6-k

И.Д. Соловьев1,2, Л.М. Винокуров3, Т.В. Ивашина4, А.П. Савицкий1  *1Институт биохимии им. А.Н.Баха, ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН; 2Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Химический факультет, Москва, Россия, 3Филиал института биоорганической химии имени М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова, Пущино Московской обл., Россия, 4Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрябина, Пущино Московской обл., Россия*

Новый быстрофотоконвертируемый белок saasoti

А.Д. Ведяйкин1, И.Е. Вишняков1,2, А.В. Сабанцев1, Н.Е. Морозова1, М.А. Ходорковский1 *1Научно-исследователь­ский комплекс «Нанобиотехнологии», Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого; 2Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия*

Использование флуоресцентной микроскопии сверхвысокого разрешения для изучения бактериального цитоскелета

ферстеровский перенос энергии и

 время-разрешенная флуоресцентная микроскопия

Председатели Enrico Gratton, Claus Seidel

Зал «Рубин»6 октября, 8.30 – 11.20

30 мин Claus Seidel *University of Düsseldorf, Düsseldorf, Germany*

Наблюдение за структурой и динамикой белков и белковых комплексов методом высокоточного *FRET in vitro* и в живых клетках

30 мин Ammasi Periasamy *University of Virginia, Charlottesville, USA*

Изучение рака простаты в живых образцах методом FLIM-FRET микроскопии

30 мин Yves Mely *University of Strasbourg, Strasbourg, France*

Количественные и высокоразрешающие флуоресцентные имиджинговые методы для изучения внутриклеточных взаимодействий и динамики HIV-1 белков

20 мин Piotr Wardega *NanoTemper Technologies RUS LLC, Saint Petersburg.*

Современный количественный бимолекулярный анализ в свободных растворах

15 мин Raul Bukowiecki1,2, Franziska Dinter1, Eileen Schormann1, Vladislav Shcheslavskiy3, Wolfgang Becker3, Erich E. Wanker1 1*Max Delbrueck Center for Molecular Medicine, Berlin, Germany;2 Free University, Berlin, Germany; 3Becker&Hickl GmbH, Berlin, Germany*

Детекция мисфолдинга белков в модельных системах болезни Хаттингтона с использованием чувствительного TR-FRET время разрешенного флуоресцентного имиджинга

15 мин А. Горященко1, М. Хренова1,2, В. Жердева1, Т. Ивашина3, А. Савицкий1,2 *1Институт биохимии им. А.Н. Баха, ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, Москва; 2Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Химический факультет, Москва; 3Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрябина РАН, Пущино, Россия*

Рациональный дизайн полипептидного линкера со структурой буйка для высокоэффективных FRET‑сенсоров

15 мин В.В. Жердева1, Н.И. Казачкина1, В.И. Щеславский2, А.П. Савицкий1 *1ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, Москва, Россия; 2Becker & Hickl GmbH, Берлин, Германия*

FLIM-FRET генетически-кодируемого сенсора каспазы 3 в опухолевых ксенографтах

15 мин Д.В. Смирнова, Н.Н. Угарова *Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Химический факультет, Москва, Россия*

Система биолюминесцентного резонансного переноса энергии на основе люциферазы светляков *L. mingrelica* и ее применение в гомогенном иммуноанализе

11.30 –12.00 Кофе-брейк

Конгресс-зал 6 октября, 10.45 – 16.05

Пленарные доклады форума

СОВРЕМЕННАЯ ФЛУОРЕСЦЕНТНАЯ МИКРОСКОПИЯ

Председатели Karsten Koenig, Ago Rinken

Зал «Рубин»6 октября, 16.15 – 17.20

15 мин Т.Ф. Сергеева1, О.А. Злобовская2, М.В. Ширманова1, В.В. Дуденкова1,3, А.И. Гаврина1,3, Г.С. Перельман1,3, К.А. Лукьянов1,2, Е.В. Загайнова1 *1Нижегородская государственная медицинская академия, Нижний Новгород, Россия, 2Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, Россия, 3Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского, Нижний Новгород, Россия*

Анализ внутриклеточного рH и метаболизма в опухолевых клетках при апоптозе на основе FLIM-FRET имиджинга

20 мин Н.Е. Морозова1, А.В. Сабанцев1, Е.С. Богданова2, Я.В. Фёдорова1,3, А.С. Майкова1,3, А.А. Ширяева1,3, А.Д. Ведяйкин1, А. Родик4, М. Джорджевич4, М.А. Ходорковский1, К.В. Северинов1–3 *1Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого, Санкт-Петербург, Россия; 2Ваксманский институт микробиологии, Ратгерс, США, Университет Нью-Джерси, США; 3Сколковский институт науки и технологии, Сколково, Россия; 4Факультет биологии, Университет Белграда, Белград, Сербия*

Исследование системы рестрикции-модификации Esp1396I в *E. coli* на уровне одиночных клеток с использованием флуоресцентной микроскопии

15 мин А.О. Богородский1, В.А. Половинкин2–5, А.В. Мишин1, Н.С. Ильинский1, В.И. Горделий2–5, В.Г. Черезов6, Г. Бюльдт1,7, Т. Генш8, В.И. Борщевский1,2 *1Московский физико-технологический институт, Лаборатория перспективных исследований мембранных белков, Долгопрудный, Россия; 2ICS-6: Структурная биохимия, Институт комплексных систем (ICS), Исследовательский центр г. Юлих, Германия; 3Университет Гренобля Alpes, Франция, Институт структурной биологии, Гренобль, Франция; 4CNRS, Институт структурной биологии, Гренобль, Франция, 5CEA, Институт структурной биологии, Гренобль, Франция; 6Институт Бридж, Факультет химии, физики и астрономии, Университет Южной Калифорнии, Лос Анджелес, Калифорния, США; 7ICS-5: Молекулярная биофизика, Институт комплексных систем (ICS), Исследовательский центр г. Юлих, Германия; 8ICS-4: Клеточная биофизика, Институт комплексных систем (ICS), Исследовательский центр г. Юлих, Германия*

Изучение *in meso* кристаллизации мембранных белков методами флуоресцентной микроскопии.

Закрытие конференции ADFLIM

15 мин Т.Н. Тихонова1, Е.А. Ширшин 2, Н.Р. Ровнягина 2, А.С. Орехов 3, В.В. Фадеев 2

*1Международный учебно-научный лазерный центр МГУ им. М.В. Ломоносова, 2 Физический факультет МГУ им. М.В. Ломоносова, 3 Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт»*

Исследование различных стадий формирования фибрилл методом флуоресцентной спектроскопии

Зал «Рубин» ЗАКРЫТИЕ КОНФЕРЕНЦИИ6 октября, 17.10 – 17.30

Тезисы докладов

Визуализация биологических объектов в c-CARS микроскопии

А. Айбуш, Ф. Гостев, А. Титов, В. Надточенко

Институт химической физики им. Н.Н. Семенова РАН, Москва, Россия

В последние годы наблюдается большой интерес к получению химически селективных изображений сложных биологических объектов. Широко используются методы, основанные на многофотонной флюоресцентой и рамановской микроскопии. Несмотря на то, что КАРС микроскопия обладает целым рядом достоинств, подобные системы довольно сложны в реализации и в большинстве случаев используют пикосекундные лазерные импульсы. Между тем, сочетание пикосекундных и фемтосекундных импульсов может дать дополнительные возможности, которые основаны на спектральных свойствах лазерных импульсов фемтосекундного диапазона. В этой работе мы изучили двухимпульсную модификацию КАРС (т. н. чирпированный КАРС, c-CARS), а также возможное применение схемы для биологических объектов. Фемтосекундный импульс накачки в нашей c-CARS схеме растягивался до 10–15 пс, в то время как стоксов фемтосекундный импульс мог сканировать частоты импульса накачки при изменении задержки между импульсами. Подобное сканирование частот позволяет реконструировать ИК спектр гораздо быстрее, чем в обычной КАРС микроскопии, что может быть использовано для трехмерных сканирующих систем где быстродействие является важным параметром. Более того, в данной методике возможно быстро покрыть частотный диапазон от “fingerprints” до ~4000 1/см благодаря быстрой перестройке импульса накачки. Для некоторых простых образцов мы исследовали спектральное разрешение системы, а также способы разделения резонансного и нерезонансного сигналов вещества. В работе также продемонстрированы КАРС сканы некоторых биологических объектов: растительной клетки и среза эмбриона мыши. *Работа поддержана грантом РНФ 14-14-00856.*

Флуоресцентное определение изменений уровня пероксида водорода при воздействии цисплатина на опухолевые клетки

А.С. Белова, А.Г. Орлова, И.В. Балалаева, Н.О. Антонова, Н.М. Мишина, Е.В. Загайнова

ФИЦ Институт прикладной физики РАН, Нижний Новгород, Россия

В нашем исследовании была использована линия клеток HeLa Kyoto, трансФИЦ ированная внутриклеточным сенсором HyPer2 [1], чувствительным к изменениям в уровне пероксида водорода и нечувствительным к изменениям уровней других активных форм кислорода, и контрольная линия клеток, трансФИЦ ированная внутриклеточным нечувствительным к изменениям пероксида водорода сенсором. Клетки обрабатывали противоопухолевым препаратом «цисплатин». Воздействие препаратом производилось в разных дозах и с различной длительностью. Для оценки уровня перекиси водорода при воздействии химиотерапии использовался метод проточной цитометрии одновременно с маркером на апоптоз PE Annexin V и витальным красителем 7-AAD. После экспозиции с препаратом отдельно рассчитывалось количество жизнеспособных клеток, клеток в стадии раннего апоптоза и клеток в позднем апоптозе/некротических клеток. Ответ флуоресцентного сенсора на цитотоксическое воздействие определяли для каждой клеточной популяции [2]. Возрастающие концентрации препарата вызывали постепенное уменьшение количества жизнеспособных клеток и, соответственно, увеличение числа клеток в стадиях раннего апоптоза, позднего апоптоза и некроза в обеих клеточных линиях HeLa Kyoto по сравнению с контролем. Были продемонстрированы дозо-временная зависимость в повышении уровня пероксида водорода раковых клеток при воздействии цисплатина. Принимая во внимание, что реакция сенсора HyPer2 наблюдалась в популяции жизнеспособных, не апоптотических клеток, обнаруженные изменения уровня пероксида водорода не являются следствием клеточной гибели.

*Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 16-34-01112 мол\_a.*

1. K.N. Markvicheva, D.S. Bilan, N.M. Mishina, A.Yu. Gorokhovatsky, L.M. Vinokurov, S. Lukyanov, V.V. Belousov, “A genetically encoded sensor for H2O2 with expanded dynamic range”, Bioorganic & Medicinal Chemistry 19, 1079-1084 (2011).

2. A.S. Belova, А.G. Orlova, I.V. Balalaeva, N.O. Antonova, N.М. Mishina, E.V. Zagaynova. “Hydrogen peroxide detection in viable and apoptotic tumor cells under action of cisplatin and bleomycin”, Photon Laser Med, 1-9 (2016).

Изучение *in meso* кристаллизации мембранных белков методами флуоресцентной микроскопии

А.О. Богородский1, В.А. Половинкин2,3,4,5, А.В. Мишин1, Н.С. Ильинский1, В.И. Горделий2,3,4,5, В.Г. Черезов6, Г. Бюльдт1,7, Т. Генш8, В.И. Борщевский1,2

1Московский физико-технологический институт, Лаборатория перспективных исследований мембранных белков, Долгопрудный, Россия; 2ICS-6: Структурная биохимия, Институт комплексных систем (ICS), Исследовательский центр г. Юлих, Германия; 3Университет Гренобля Alpes, Франция, Институт структурной биологии, Гренобль, Франция; 4CNRS, Институт структурной биологии, Гренобль, Франция, 5CEA, Институт структурной биологии, Гренобль, Франция; 6Институт Бридж, Факультет химии, физики и астрономии, Университет Южной Калифорнии, Лос Анджелес, Калифорния, США; 7ICS-5: Молекулярная биофизика, Институт комплексных систем (ICS), Исследовательский центр г. Юлих, Германия; 8ICS-4: Клеточная биофизика, Институт комплексных систем (ICS), Исследовательский центр г. Юлих, Германия

Появление кристаллизации *in meso* 30 лет назад начало новую эру структурных исследований мембранных белков. С тех пор этот метод связан с такими прорывами, как структурные исследования бактериальных родопсинов и связанных с G-белком рецепторов. В данной работе использовалась флуоресцентная микроскопия для изучения *in meso* кристаллизации бактериородопсина. Нативная флуоресценция бактериородопсина позволяет наблюдать за кристаллизацией немодицированного белка, а кристаллизация в *in meso* фазе предоставляет стабильную среду для продолжительных наблюдений. Нативная флуоресценция и генерация второй гармоники (SHG) в кристаллах дает возможность получить новую информацию о процессе *in meso* кристаллизации. Кристаллизация начинается с образования микрокристаллов, за которым следует рост нескольких кристаллов за счет окружающих их микрокристаллов с образованием обедненной белком зоны вокруг растущего кристалла. Эти наблюдения указывают на механизм созревания Оствальда при *in meso* кристаллизации бактериородопсина. Образование обедненной зоны вокруг растущего кристалла согласуется с ранее предложенной аналогией между ростом кристалла в in meso фазе и в условиях микрогравитации при отсутствии конвекции. *Работа поддержана грантом РНФ 14-14-00995*.

Изучение эндогенной флуоресценции живых клеток млекопитающих методом FLIM

Е.А. Борулева1, В.В. Жердева1, А.П. Савицкий1,2

1ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН; 2Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

Эндогенная флуоресценция в ходе своей трансформации может служить одним из показателей изменения биохимического статуса клеток, что на сегодняшний день продемонстрировано для целого ряда эндогенных флуорофоров. Поэтому изучение автофлуоресценции клеток является важной научной задачей, как для фундаментальных, так и для прикладных биологических исследований. В настоящей работе получено распределение флуоресцентного сигнала в опухолевых клетках методом FLIM при возбуждении в диапазоне возбуждения флавинов и с помощью флуоресцентной микроскопии с использованием сигнала митохондриальной локализации Mitotracker Orange. Выполнен анализ и сопоставление результатов, полученных обоими методами. Флуоресцентный сигнал детектировали на конфокальном флуоресцентном микроскопе с временным разрешением MicroTime 200 (PicoQuant GmbH, Германия). Обработку изображений производили с использованием программного обеспечения PicoHarp и SymPhoTime (PicoQuant GmbH, Германия). Для возбуждения клеток (HELA) использовали твердотельные лазеры с длинами волн возбуждения 405 нм, 473 нм, 532 нм (PicoQuant GmbH, Germany), а для детекции флуоресценции – фильтры 548/10 нм, 580 нм, 605/15 нм (Semrock, США). Спектры флуоресценции из участков кадра получали с использованием камеры Andor (PicoQuant GmbH, Германия). В ходе исследований установлены особенности распределения флуоресцентного сигнала в опухолевых клетках при возбуждении в диапазоне длин волн 405–532 нм. Доказано, что при данных условиях источником флуоресцентного сигнала являются органеллоподобные структуры в цитоплазме, которые определяются как митохондрии при специфическом окрашивании.Также, наблюдалось яркое неконтрастное свечение в месте контактирования клеток и свечение органеллоподобных структур по периферии бесконтактных клеток. Результаты работы могут найти применение при переходе от *in vitro* исследований на клетках к *in vivo* исследованиям на животных, когда изменение уровня эндогенных флуорофоров может являться показателем развития ряда патологических процессов. *Работа выполнена при поддержке гранта РНФ №15-14-30019 от 8.07.2015.*

Использование флуоресцентной микроскопии сверхвысокого разрешения для изучения бактериального цитоскелета

А.Д. Ведяйкин1, И.Е. Вишняков1,2, А.В. Сабанцев1, Н.Е. Морозова1, М.А. Ходорковский1

1Научно-исследовательский комплекс «Нанобиотехнологии», Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого; 2Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия

Характерные размеры бактерий сопоставимы с дифракционным пределом традиционной флуоресцентной микроскопии, поэтому флуоресцентная микроскопия сверхвысокого разрешения (позволяющая преодолеть этот предел) представляется очень привлекательным инструментом для изучения внутренней организации бактерий. Локализационная микроскопия (ЛМ) является мощным методом, основанном на флуоресцентной микроскопии и позволяющим получить пространственное разрешение примерно на порядок лучше дифракционного предела. ЛМ представляется гибким методом и позволяет изучать сложные структуры внутри бактериальных клеток, в том числе организацию белков, входящих в аппарат деления бактерий. Один из этих белков – прокариотический гомолог тубулина белок FtsZ – играет ключевую роль в процессе деления, формируя так называемое Z-кольцо посередине делящейся клетки [[1](#_ENREF_1)]. С использованием ЛМ нам удалось показать, что Z-кольцо утолщается в процессе септации, что невозможно было показать традиционной флуоресцентной микроскопией [[2](#_ENREF_2)]. Кроме того, данный метод был использован для исследования одной из наименьших бактерий – *Acholeplasma laidlawii*, размер которой (около 0,5 мкм) не позволяет разрешить внутренние структуры при помощи традиционной световой микроскопии. Метод ЛМ в сочетании с иммунофлуоресцентным окрашиванием был использован для визуализации в A. laidlawii IbpA (малого белка теплового шока). Использованный метод позволил нам получить изображения, характеризующие распределение IbpA по клетке в различных условиях.

1. D.P. Haeusser, W. Margolin. Splitsville: structural and functional insights into the dynamic bacterial Z ring. // Nat Rev Microbiol, 2016. 14(5): p. 305-19.

2. A.D. Vedyaykin, I.E. Vishnyakov, V.S. Polinovskaya, M.A. Khodorkovskii, A.V. Sabantsev. New insights into FtsZ rearrangements during the cell division of Escherichia coli from single-molecule localization microscopy of fixed cells. // Microbiologyopen, 2016.

Зеленые флуоресцентные белки с большим временем жизни флуоресценции

Д.А. Горбачев1, К.С. Саркисян1, А.С. Горященко2, А.С. Мишин1, К.А. Лукьянов1

1Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН; 2ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, Москва, Россия

Получение флуоресцентных белков с высоким временем жизни флуоресценции является важной задачей для развития методов на основе времяразрешенной флуоресцентной микроскопии (FLIM) и Ферстеровского резонансного переноса энергии (FRET). Время жизни флуоресценции большинства зеленых флуоресцентных белков находится в диапазоне 1.5–3 нс. Исключение составляет недавно полученный в нашем коллективе белок NowGFP с анионным хромофором на основе триптофана, характеризующийся временем жизни около 5 нс. Модельные FRET-пары на основе NowGFP обладают наибольшим Ферсторовским радиусом среди всех опубликованных FRET-пар на основе флуоресцентных белков. Однако NowGFP обладает низкой фотостабильностью из-за эффективной фотоконверсии, сопровождающейся декомпозицией боковой цепи лизина 61 и переходом хромофора в нейтральное состояние. В данном проекте в качестве основы для мутагенеза мы использовали голубой флуоресцентный белок mTurquoise2, характеризующийся очень высоким квантовым выходом флуоресценции (0,93) и высоким временем жизни флуоресценции (4 нс). Для сдвига спектров флуоресценции в зеленую область была введена замена T203Y, которая приводит к батохромному сдвигу за счет стекинга тирозина 203 с хромофором, а не за счет депротонирования последнего. Последующий случайный мутагенез позволил получить улучшенные варианты с временем жизни флуоресценции до 4,8 нс и достаточно высокой фотостабильностью, сопоставимой с таковой белка EGFP. Мы считаем, что полученные флуоресцентные белки могут быть потенциально использованы для многопараметрической FLIM микроскопии в зеленом канале детекции (совместно с другими зелеными флуоресцентными белками с меньшим временем жизни), а также в качестве FRET-доноров для оранжевых и красных флуоресцентных белков для детекции белок-белковых взаимодействий и создания FRET-сенсоров.

Рациональный дизайн полипептидного линкера со структурой буйка для высокоэффективных FRET-сенсоров

А. Горященко1, М. Хренова1,2, В. Жердева1, Т. Ивашина3, А. Савицкий1,2\*

1Институт биохимии им. А.Н. Баха, ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, Москва; 2Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Химический факультет, Москва; 3Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрябина РАН, Пущино, Россия

Эффективность переноса энергии во FRET-сенсорах во многом определяется расстоянием между донором и акцептором. Это расстояние можно уменьшить, если линкер, соединяющий компоненты FRET-пары, находится в схлопнутой конформации, т. е. обладает структурой, схожей с применяемыми в методе молекулярных буйков. В данной работе мы представляем FRET-сенсор TR-M4-K, состоящий из красного флуоресцентного белка TagRFP и хромопротеина KFP. Эффективность переноса энергии и динамический диапазон измерений в данном сенсоре увеличены за счет дополнительных гидрофобных взаимодействий в линкере, что приводит к образованию буйкоподобной структуры. Мы проанализировали структуру сенсора с помощью методов молекулярной динамики, а также протестировали линкеры с различным числом гидрофобных остатков. Было показано, что сенсор TR-M4-K гидролизуется каспазой-3 как *in vitro*, так и в живых опухолевых клетках после индукции апоптоза. Мы также провели варьирование длины гидрофобной части линкера и показали, что оптимальный ее размер составляет 4 пары аминокислот. Наконец, нами был предложен новый метод оценки эффективности гидролиза FRET-сенсоров по изменению амплитуд экспоненциальных компонент, описывающих кинетику затухания флуоресценции, и показано, что сенсор TR-M4-K имеет динамический диапазон измерений 4,56, что превосходит результаты, представленные в литературе. *Работа была выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда, грант № 15-14-30019.*

Флуоресцентное мечение белков в живых клетках, опосредованное гетеродимеризацией искусственных альфа-спиралей

Н.Г. Гурская1, М.М. Перфилов1,2, Н.В. Клементьева2, А.С. Мишин1,2, К.А. Лукьянов1,2

1Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва; 2Нижегородская государственная медицинская академия, Нижний Новгород, Россия

Разработка транзиентных, то есть слабо взаимодействующих с целевыми клеточными структурами, меток для локализационной и сверхразрешающей микроскопии является актуальной задачей, прежде всего, в связи с проблемой недостаточной плотности мечения целевых структур при увеличении разрешения.

В данной работе мы предлагаем новый метод мечения целевых белков в живой клетке с использованием гетеродимеризующихся искуственных спиралей (К/Е-спиралей). Метод основан на ко-экспрессии целевого белка, несущего К-спираль, и флуоресцетного белка, несущего Е-спираль; гетеродимеризация К- и Е-спиралей должна обеспечивать колокализацию флуоресцентного и целевого белков. На сегодняшний день описано несколько вариантов коротких альфа-спиралей, состоящих из гептады аминокислотных остатков (например, KIAALKE для K-спирали и EIAALEK для E-спирали), повторенной от 3 до 5 раз. Константа диссоциации гетеродимерных комплексов таких синтетических пептидов *in vitro* варьирует в широком диапазоне в зависимости от числа повторов и состава аминокислотной последовательности. На первом этапе работы мы получили набор плазмид, кодирующих зеленый и красный флуоресцентные белки с K- или E-спиралями различной длины (3 или 4 повтора) и вариациями аминокислотной последовательности. Взаимодействие К/Е-спиралей оценивали по колокализации флуоресцентных сигналов в парах, где один из флуоресцентных белков имел четко выраженную внутриклеточную локализацию (например, мембрана или хроматин), а другой не имел сигналов локализации. Данная серия экспериментов позволила выбрать пары К/Е-спиралей, обеспечивающих, с одной стороны, хорошо выраженную колокализацию, а, с другой – достаточно быстрый (в секундной шкале) обмен белков в гетеродимерах. Эти пары были успешно использованы для имиджинга белков цитоскелета в различных режимах – конфокальной микроскопии, TIRF микроскопии, микроскопии сверхвысокого разрешения на основе детекции одиночных молекул.

*Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект 16-14-10364).*

Количественные характеристики изменения сигнала ГВГ от коллагена для различных биологических моделей

В. Дуденкова1,2, В. Елагин2, Е. Губарькова2, К. Бабак1, Н. Гладкова2, Е. Загайнова2

1Нижегородский университет им. Н.И. Лобачевского; 2Нижегородская медицинская академия, Нижний Новгород, Россия

Количественные характеристики состояния коллагена являются ключевыми для многих исследовательских направлений, включая изучение различных патологических состояний тканей или их изменения в процессе лечения. Изучение состояния коллагеновых волокон крайне важно, так как этот белок является наиболее распространенным компонентом внеклеточного матрикса у млекопитающих и составляет треть от всех белков организма. Наиболее распространенный подход к оценке состояния коллагена – это применение всевозможных красителей для визуализации, однако, сложный процесс проводки препаратов затрудняет использование данных методик *in vivo*. Использование генерации второй гармоники (ГВГ) от коллагена становится все более часто используемым подходом для визуализации фибриллярной структуры коллагена в тканях *ex vivo* и *in vivo*. В своей работе мы изучали различные образцы нормальной и патологически измененной тканей. Для описания специфических изменений структуры коллагена, таких как плотность укладки, степень анизотропии, набухание или истончение волокон, наличие выделенного направления, организованности либо дезорганизованности пучков, используются различные подходы. Основные подходы для количественной оценки можно разделить на статические методы первого и второго порядков, сегментацию, Фурье преобразование и их всевозможные комбинации, как, например, индекс возрастного изменения кожи (SAAID). В своей работе для количественной характеристики атеросклеротических сосудов нормы и бляшек I, II, III, IV, Va, Vb и Vc стадий мы использовали быстрое Фурье преобразование. Мы анализировали нормальную кожу уха крысы, а так же ее изменение под действием лучевого терапии (ЛТ) в виде фракционного и однократного излучения с помощью, индекс возрастного изменения кожи (SAAID). С помощью статистических методов первого порядка мы оценивали состояние нормальной слизистой и аденокарциномы, а также их изменения при ЛТ. Реакция нормальной слизистой мочевого пузыря на воздействие ЛТ также была оценена с помощью статистических методов первого порядка. Коллаген слизистой защечного мешка сирийского хомяка в норме, при канцерогенезе, а так же во время лечения при ЛТ было оценено с помощью статистических методов первого порядка и SAAID. Таким образом, в работе показано, что для количественной характеристики того или иного изменения состояния коллагеновых волокон в тканях необходимо использовать различные подходы или их комбинации. *Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (№.16-32-00751 и 16-34-00995).*

FLIM-FRET генетически-кодируемого сенсора каспазы 3 в опухолевых ксенографтах

В.В. Жердева1, Н.И. Казачкина1, В.И. Щеславский2, А.П. Савицкий1

1ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, Москва, Россия;2Becker & Hickl GmbH, Берлин, Германия

Неинвазивный мониторинг молекулярных событий *in vivo* является одной из наиболее сложных задач молекулярного флуоресцентного имиджинга. В нашем исследовании продемонстрирована возможность визуализации каспазной активности с использованием сенсора TR23K неинвазивно *in vivo* на подкожных опухолевых ксенографтах в мышах методом FLIM-FRET. Сенсор каспазы 3 TR23K представляет собой FRET-пару на основе красных флуоресцентных белков – ТagRFP (донора) и KFP (акцептора), связанных линкером, содержащим специфичную для расщепления каспазой 3 последовательность DEVD [1]. Визуализацию каспазной активности проводили на ксенографтах опухолей человека, стабильно экспрессировавших сенсор каспазы 3 на мышах линии nude. FLIM ксенографтов осуществляли до и после противоопухолевой терапии на конфокальном сканере DCS-120 (Becker & Hickl GmbH, Германия). Результатом являлся сдвиг в распределении времени жизни с 1,6–1,9 нс до 2,1–2,4 нс в зависимости от типа опухоли.

Оценку эффективности FRET и анализ эффективности противоопухолевого отклика производили с использованием программного обеспечения SPCM (Becker & Hickl GmbH, Германия). Такие факторы как глубина опухолевой инвазии, уровень экспрессии сенсора в опухоли, гетерогенность опухолевого ответа влияли на распределение времени жизни в ксенографте. *Данная работа выполнена при поддержке гранта РНФ 15-14-30019*.

[1] Alexander P. Savitsky, Alexander L. Rusanov, Victoria V. Zherdeva, Tatiana V. Gorodnicheva, Maria G. Khrenova and Alexander V. Nemukhin. FLIM-FRET Imaging of Caspase-3 Activity in Live Cells Using Pair of Red Fluorescent Proteins. Theranostics. 2012, v. 2, №2, pp.215-226. doi:10.7150/thno.3885

Метаболизм опухоли: флуоресцентный имиджинг с автофлюорофорами и генетически кодируемыми сенсорами

Е. Загайнова1, М. Ширманова1, И. Дружкова1, М. Лукина1, В. Дуденкова1,2, В. Щеславский4, В. Белоусов1,3, К. Лукьянов1,3

1Нижегородская государственная медицинская академия; 2Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского, Нижний Новгород; 3Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, Россия; 4Becker & Hickl GmbH, Берлин, Германия

Были изучены параметры метаболизма опухолевых клеток с помощью флуоресцентного имиджинга: однофотонной и двухфотонной микроскопии, FLIM, и флуоресцентной визуализации целого организма. Были выбраны параметры, которые потенциально могут измениться в результате раковой трансформации клеток и на фоне противораковой терапии – внутриклеточный рН (PHI), водородный показатель, метаболический статус. Исследование проводилось на клеточных культурах в монослое, ко-культурах раковых клеток человека и фибробластов, опухолевых сфероидах и ксенотрансплантатах опухолей. Новые генетически кодируемые биосенсоры SypHer2 [1] и HYPER2 [2], созданные на основе флуоресцентного белка cpYFP, были использованы для изучения PHI и пероксида водорода, соответственно. Клеточный метаболизм анализировали с помощью времени жизни флюоресценции НАДН и ФАД и редокс-отношения ФАД/ НАДН. Была разработана методика картирования PHI в опухолевых сфероидах и опухолях животных *in vivo*. Более кислый уровень PHI отмечен в центре опухолевого узла, что может быть следствием гликолитического метаболизма, вызванного гипоксией [3]. Было показано различие в метаболизме раковых и нормальных клеток. В условиях совместного культивирования раковых клеток человека и фибробластов, метаболизм раковых клеток переключался на гликолиз, что было похоже на процессы в реальных опухолях. Также было обнаружено незначительное закисление цитоплазмы раковых клеток, в то время как производство пероксида водорода значительно увеличивалось. Эти данные свидетельствуют о важной роли пероксида водорода в клеточных взаимодействиях и метаболической кооперации раковых клеток и фибробластов для поддержания канцерогенез [4]. Кроме того, мы провели мониторинг ранних и отсроченных изменений метаболизма и уровня PHI в раковых клетках под влиянием химиотерапевтических препаратов с различным механизмом действия: цитотоксического агента цисплатина и цитостатика таксола. После инкубации с цисплатином на ранних этапах отмечено закисление, которое вызывается быстрым торможением Na+/H+ обменник, а затем в выживших клетках наблюдался длительный стабильный период подщелачивания. В первый час после обработки Таксолом наблюдали быстрое подщелачивание цитоплазмы раковых клеток, которое, соответствовало максимуму поглощения таксола. Далее уровень PHI снижался и колебался вблизи начального значения в течение 24 часов. Изменение рекдокс-отношения и времен жизни флюоресценции НАД(P) H свидетельсвовало о сдвиге метаболизма раковых клеток на фоне лечения в сторону окислительного фосфорилирования.

[1] M. Matlashov et al. // BBA General Subjects, 2015 1850(11): 2318-28

[2] K.N. Markvicheva, D.S. Bilan, N.M. Mishina, et al. // Bioorganic & Medicinal Chemistry 19 (2011) 1079–1084

[3] M.V. Shirmanova, I.N. Druzhkova, M.M. Lukina et al. // BBA-General Subjects, 2015, 1905-1911.

[4] Druzhkova, M. Shirmanova, M. Lukina et al. // Cell Cycle 2016; doi: 10.1080/15384101.2016.1160974

**Кодирование условных сигналов нейронами неокортекса у мышей: исследование методом прижизненной двухфотонной микроскопии**

**О.И. Ивашкина, М.А. Рощина, К.А. Торопова, К.В. Анохин**

**НИЦ «Курчатовский Институт», Москва, Россия**

Способность нервной системы к восприятию и ассоциации сложных естественных стимулов и сцен определяется взаимодействием больших популяций нейронов из различных областей коры головного мозга. Экспериментальное исследование закономерностей такой популяционной динамики нейрональной активности в бодрствующем мозге стало возможным лишь в последние годы благодаря разработке методов двухфотонной визуализации активности нейронов коры головного мозга у бодрствующих животных.

Целью данной работы было исследование паттернов активации нейронов париетальной ассоциативной области неокортекса мыши при извлечении комплексной аверсивной памяти.

Работа была выполнена на трансгенных мышах линии Fos-ЕGFP, у которых белок EGFP экспрессируется сопряженно с белком Fos. Перед началом эксперимента мышам проводили операцию по вживлению транскраниального окна для возможности последующей визуализации активности нейронов. Через месяц после операции мышей обучали условно-рефлекторному замиранию на комплексный условный сигнал (КУС; синхронное предъявление звука и света), который 7 раза сочетали с электрокожным раздражением (ЭКР; 1мА). С контрольными мышами (группа «Активный контроль» («АК»)) проводили все те же процедуры, но не наносили ЭКР. Извлечение памяти (тест) о световом, звуковом компонентах и полного КУС проводили на 8, 10 и 12 день после обучения соответственно. Через 120 минут после каждого теста проводили визуализацию нейронов париетальной ассоциативной области неокортекса с помощью метода in vivo двухфотонной микроскопии.

Все мыши были успешно обучены и демонстрировали усиление поведения замирания при каждом извлечении памяти.

Геномная активность была зарегистрирована в 1098 нейронов у 6 мышей группы «Обучение» и в 743 нейронов у мышей «АК». У мышей обеих групп были найдены нейроны, которые специфически активируются при предъявлении отдельных компонентов КУС. Было показано, что у группы «Обучение» доля нейронов, активных во время извлечения памяти отдельными компонентами, но не самим КУС, больше, чем у группы «АК».

Полученные данные согласуются с гипотезой о том, что нейроны париетальной ассоциативной области неокортекса могут принимать участие в формировании ассоциации между стимулами разных сенсорных модальностей, в то числе и при ассоциативном обучении.

Изучение флуоресцентных свойств сенсора каспазы-3 в опухолевых клетках при воздействии противоопухолевых агентов.

Н.И. Казачкина1, В.В. Жердева1, Н.Н. Одинцова1, В.И. Щеславский2, Н.Т. Райхлин3, А.П. Савицкий1

1 Институт биохимии им. А.Н. Баха, ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, Москва, Россия; 2Becker&Hickl Ltd, Берлин, Германия, 3Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина МЗ РФ, Москва, Россия

Каспаза-3 играет важную роль в регуляции жизнедеятельности клеток млекопитающих. Настоящая работа посвящена изучению флуоресцентных свойств сенсора каспазы 3 – TR23K *in vitro* и *in viv*o под воздействием противоопухолевых препаратов. Работа проведена с использованием клеток Нер-2, экспрессирующих TR23K (Нер-2/TR23K) или TagRFP (Нер-2/TagRFP), которые были получены с помощью трансфекции лентивирусными конструкциями pLVTR23K или pLVTagFRP, соответственно. В качестве цитототоксических агентов применяли цис-дихлор-диаминоплатину (II) (ДДП) и этопозид. Показано, что клетки Hep-2/TRK проявляли чувствительность к цитостатикам *in vitro*. ИК50 ДДП при инкубации 24 ч и 48 ч составляла 4,5 мкг/мл и 1,3 мкг/мл, соответственно, ИК50 этопозида при инкубации 24 ч и 48 ч составляла 8,9 и 2,6 мкг/мл, соответственно. Через 24 ч инкубации с цитостатиками наблюдалось разрезание сенсора TR23K и увеличение времени жизни флуоресценции клеток с 1,8 до 2,5 нс. Для экспериментов *in vivo* опухоли получали путем подкожной имплантации 5 млн клеток прививки Hep-2/TR23K или Нер-2/TagRFP. ДДП использовали самостоятельно в/в в дозе 7,5 мг/кг или в комбинации с этопозидом по схеме: ДДП в/в 5 мг/кг, сразу после этого – этопозид в/в 5 мг/кг. Химиотерапию (ХТ) проводили однократно на 44-ый день роста опухоли. Флуоресцентные исследования были проведены за 1 сутки до и на 1, 3 и 6 дни после ХТ. После последнего измерения опухоли подвергались гистологическому исследованию. Установлено, что под влиянием цитостатиков в опухоли наблюдалось увеличение интенсивности флуоресценции и времени ее жизни с 1,67±0,07 до 2,02±0,04 нс. При этом в опухолях, подвергавшихся ХТ, наблюдались очаги распада, площадь которых была больше, чем в контроле. Полученные данные позволяют предположить, что изменения флуоресцентных свойств опухолевых клеток под влиянием цитотоксических агентов обусловлены действием каспазы-3.

*Работа поддержана РФФИ (грант № 14-08-01017 А).*

Одновременный контроль NADH методом FLIM и pО2 методом PLIM для визуализирования метаболических параметров

С. Калинина, J. Breymayer, A. Bisinger, A. Rück

University of Ulm, Core Facility Confocal and Multiphoton Microscopy, Ulm, Germany

Микроскопия визуализации времени жизни флуоресценции (fluorescence-lifetime imaging microscopy, FLIM) успешно применяется для контроля состояния коферментов в живых клетках и тканях. В этом контексте особенно интересна концепция визуализирования с высоким разрешением внутриклеточных концентраций восстановленной формы никотинамидаденин динуклеотида (nicotinamide adenine dinucleotide, NADH). Время жизни флуоресценции этого кофермента зависит от его состояния, соотношение же концентраций свободной и связанной с протеином форм позволяет судить о метаболическом статусе клеток. С другой стороны метаболические реакции сильно зависят от уровня внутриклеточного кислорода. Поэтому при изучении многих нарушений на уровне клетки желателен мониторинг кислорода одновременно с контролем других параметров. Многообещающий оптический метод детекции кислорода в биологических образцах – микроскопия времени жизни фосфоресценции (phosphorescence lifetime imaging microscopy, PLIM), когда эффект кислородо-зависимого тушения фосфоресценции некоторых соединений используется для измерения парциального давления кислорода (pO2). Мы представляем результаты одновременного контроля внутриклеточного NADH методом FLIM и pO2 методом PLIM, с использованием, например, трис-(2,2’-бипиридил)дихлорида рутениума (ruthenium tris-(2,2’-bipyridyl) dichloride, Ru(BPY)3) в качестве кислородного сенсора. Установка комбинирует двуфотонную микроскопию и метод мультимерного коррелированного счета одиночных фотонов (time-correlated single-photon-counting, TCSPC). Двуканальная FLIM/PLIM система позволяет визуализировать одновременно pO2 и другие метаболические параметры в живых клетках.

Флуоресцентная микроскопия тонкой структуры актина в опухолевых клетках и тканях

Н.В. Клементьева1, О.Е. Фурман1,2, Е.В. Загайнова1, К.А. Лукьянов1,3, А.С. Мишин1,3

1Нижегородская государственная медицинская академия; 2Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского, Нижний Новгород; 3Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, Россия

Актин, один из самых распространенных и высококонсервативных белков, участвует во многих клеточных процессах в норме и при патологии. Адгезия, миграция и инвазия клеток, сопряженные с перестройками актина, играют важную роль в онкогенезе. Актин может служить показателем метастатического потенциала раковых клеток и их чувствительности к терапии. Однако, вопрос о тонкой структуре микрофиламентов и их организации в опухолевой ткани остается открытым. Технологии высокоразрешающей флуоресцентной микроскопии, преодолевающие дифракционный предел, позволяют более полно понять устройство актиновой сети. В данной работе мы предложили простой способ визуализации эндогенного актина в опухолевых клетках и тканях посредством высокоразрешающего имиджинга с применением нового красителя SiR-actin. Были подобраны условия, необходимые для мигания флуорофора, и с помощью локализационной микроскопии одиночных молекул оценены перестройки актинового цитоскелета в раковых клетках в ответ на действие химиопрепаратов. Так, после инкубации клеток с таксолом было выявлено выраженное увеличение размеров фокальных контактов, их сближение, а также укорочение стресс-фибрилл. В случае с цитохалазином D в клетках детектировались короткие фибриллы наряду с точечными структурами размером меньше дифракционного предела. Для анализа опухолевой ткани были созданы мышиные модели карциномы толстой кишки и легкого. Мы показали, что структура актина в ткани значительно отличается от таковой *in vitro*. В тканях опухолей наблюдалась разнонаправленная актиновая сеть, построенная из изогнутых стресс-фибрилл-подобных волокон. Любопытно, что сходства между актином в опухолях и в нормальных тканях близкого происхождения обнаружено не было. Таким образом, был разработан протокол визуализации актина, эффективный для проведения локализационной микроскопии одиночных молекул на основе красителя SiR-actin. Это позволило отслеживать перестройки актина в клетках в ходе химиотерапии. Также мы впервые показали, что для опухолевой ткани характерна сложная сеть цитоскелета, состоящая из толстых изогнутых пучков актина. Предложенный нами метод потенциально может быть применен для оценки тонкой структуры актина в клинических образцах.

*Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект №14-25-00129).*

Аналитическая пертурбационная модель для импульсной диффузионной оптической томографии высокого разрешения в трансмиссионной плоскопараллельной геометрии

А.Б. Коновалов1, В.В. Власов1, А.С. Углов1, В.В. Любимов2

1Российский федеральный ядерный центр – ВНИИ технической физики им Е.И. Забабахина, Снежинск, Челябинская обл; 2Институт лазерной физики научно-производственной корпорации – Государственный оптический институт им. С.И. Вавилова, Санкт-Петербург, Россия

В докладе представлена пертурбационная модель для импульсной диффузионной оптической томографии в трансмиссионной геометрии плоского слоя. В качестве измерительных данных используются т.н. времяразрешенные оптические проекции (Konovalov A.B. et al. Proc. SPIE 80880T, 2011). Они определяются для отдельных отсчетов временной функции рассеяния точки и представляют собой относительные возмущения потоков фотонов, вызванные присутствием оптических неоднородностей. Посредством минимизации времени регистрации сигнала открывается возможность предельно сузить банановидные распределения траекторий фотонов и минимизировать пространственное разрешение. Для вывода аналитических выражений весовых функций, отвечающих за визуализацию, мы применяем диффузионное приближение уравнения переноса и теорию малых возмущений Борна. Сначала, используя функцию Грина нестационарного уравнения диффузии, мы выводим аналитические соотношения для случая рассеивающего полупространства, затем применяем оригинальный метод эквивалентного инверсного источника, чтобы получить формулы для трансмиссионной плоскопараллельной геометрии (Коновалов А.Б., Власов В.В. Квантовая электроника 44, 719, 2014). Эффективность модели подтверждается численным экспериментом, где прямоугольные рассеивающие фантомы с оптическими неоднородностями реконструируются с помощью модиФИЦ ированного алгебраического алгоритма реконструкции (Коновалов А.Б. и соавт. Квантовая электроника 38, 588, 2008). Неоднородности образуют периодические пространственные структуры для оценки пространственного разрешения метода. Исследована зависимость предела разрешения от толщины фантома. Показано, что поперечное разрешение составляет около 2,5 мм внутри 8-сантиметрового фантома и близко к значению 1,0 мм, если толщина фантома рана 2 см. Продольное разрешение принимает значения 3,5 и 1,5 мм соответственно. По мнению авторов, аналогичная модель реконструкции может быть построена также для времяразрешенной флуоресцентной молекулярной томографии. В этом случае аналогом времяразрешенной оптической проекции может служить отношение потока флуоресценции к потоку возбуждающего излучения, измеренных для отдельных отсчетов диффузионных временных откликов.

Новый липофильный фосфоресцентный люминофор для двухфотонного биоимиджинга

E.И. Кошель1, A.В. Радаев1, П.С. Челушкин2, В.И. Щеславский3, О.О. Чернявський4, A.С. Мельников1, A.Ф. Саифитдинова1, E.Р. Гагинская1,С.П. Туник1

1Санкт-Петербургский государственный университет; 2Институт высокомолекулярных соединений, РАН, Санкт-Петербург, Россия, 3Becker & Hickl GmbH, Берлин, Германия, 4Институт физиологии, Чешская академия наук, Прага, Чешская Республика

Металл-органические фосфоресцентные люминофоры активно используются в биоимиджинге, в том числе, в двухфотонной микроскопии. Нами был изучен новый фосфоресцентный гомолептический алкинильный кластер золота (I) (AuC2R)10 (R – 2,6-dimethyl-4-heptanol) (Koshevoy et al., 2012), который показал специфичность к нейтральным липидам в различных тканях и клетках человека и животных. У люминофора обнаружены высокий квантовый выход (0,66) и типичное для кластеров золота время затухания фосфоресценции в дихлорметане (0,91 мкс). Установлено, что тип возбуждения (одно- или двухфотонное на длинах волн 405 нм и 710 нм, соответственно) не влияет на временные и спектральные характеристики фосфоресценции c максимумом излучения на 570 нм. Для микроскопического анализа *ex vivo* были использованы криосрезы фиксированных тканей животных (мышь, курица, голубь) и фиксированные клетки линии HepG2, насыщенные эмульсией нейтральных липидов (Lipoidol Ultra Fluid). Объекты были окрашены раствором люминофора (в изопропаноле) в фосфатном буфере в соотношении 1:1 с рабочей концентрацией метки 1 мг/мл. Конфокальный микроскопический анализ всех исследованных объектов показал селективное окрашивание жировых вакуолей. Для подтверждения специфичности окрашивания мы провели анализ колокализации исследованной метки с Oil Red O и Nile Red, который показал высокие коэфФИЦ иенты Пирсона (>0,77) и перекрытия (>0,84) во всех образцах. Для фосфоресцентного молекулярного имиджинга с временным разрешением (PLIM) был использован микроскоп Leica TCS SP8 MP (Leica Microsystems, Germany), оснащенный титан-сапфировым лазером (Chameleon Ultra I, Coherent Inc., USA) и блоком электроники для временно-коррелированного счета фотонов Simple-Tau 150 TCSPC (Becker&Hickl GmbH, Berlin, Germany). Время затухания фосфоресценции исследованной метки составило 0,8–1,2 мкс. Мы считаем, что комбинация высокого квантового выхода и специфичность к нейтральным липидам исследованного комплекса дают возможность его эффективного использования для одно- и двухфотонного биоимиджинга. *Исследование реализовано при поддержке грантов СПбГУ № 1.37.153.2014 и № 1.50.1043.2014, IPHYS BioImaging facility, IPHYS CAS при поддержке MEYS (LM2015062 Czech-BioImaging), проекта OPPK BrainView CZ.2.16/3.1.00/21544 и центра СПбГУ «Хромас».*

 7

**Новые фосфоресцентные люминофоры на основе комплексов переходных металлов для фосфоресцентного молекулярного имиджинга (PLIM)**

**Е.И. Кошель1, А.И. Соломатина2, П.С. Челушкин2, В.И. Щеславский3, А.Ф. Саифитдинова1, Е.Р. Гагинская1, С.П. Туник1**

***1 Санкт-Петербургский Государственный Университет, Санкт-Петербург, Россия; 2 Институт Высокомолекулярных соединений, Российская Академия Наук, Санкт-Петербург, Россия; 3 Becker & Hickl GmbH, Берлин, Германия***

Одновременный анализ флуоресценции и фосфоресценции при молекулярном имиджинге с временным разрешением (FLIM и PLIM) дает возможность отследить многие детали гомеостаза живых клеток. Концентрация кислорода в клетках in situ и его влияние на метаболизм могут быть исследованы при использовании металл-органических фосфоресцентных люминофоров и технологии PLIM. В данной работе представлены результаты исследования новых люминофоров на основе комплексов платины и полиядерных золотомедных комплексов, конъюгированных с сывороточным альбумином человека (ЧСА). Два Pt-комплекса: Pt1 ([Pt(C11NH8)(PPh3)Cl]) и Pt2 ([Pt(C11NH8)(C3NH2(C2H4SO3Na)2)(C2PhCOOSu)]) конъюгированы с мономерным ЧСА для обеспечения доставки меток в живые клетки. Агрегаты нековалентных аддуктов алкинил-дифосфинового золотомедного комплекса Au1 [{Au3Cu2(C2C6H5)6}Au3(PPh2C6H4PPh2)3] с ЧСА использованы для контроля проникновения меток в клетки разных линий.

Культуры клеток (HeLa и CHO, 15x104 кл/мл) были инкубированы с метками в концентрации 0,3 мг/мл в течение 24ч. Электропорированные клетки были использованы в качестве положительного контроля проникновения меток. Для FLIM (анализ уровня NAD(P)H) и PLIM (детектирование и анализ времени затухания фосфоресценции меток) был использован микроскоп Nikon TE 2000, оснащенный конфокальным сканером DCS-120, блоком электроники для временно-коррелированного счета фотонов Simple-Tau 150 TCSPC и импульсным диодным лазером с длиной волны 405нм (Becker&Hickl GmbH, Germany). Концентрация кислорода в среде с клетками регулировалась добавлением сульфита натрия Na2SO3.

Обе метки Pt-ЧСА успешно проникали в клетки линий HeLa и CHO, при этом время фосфоресценции в условиях нормоксии составило 6 мкс. Присутствие Au1-ЧСА не было отмечено в интактных клетках обеих линий, однако агрегаты Au1-ЧСА активно проникали в электропорированные клетки, также как и платиновые метки. В условиях слабой гипоксии время затухания фосфоресценции платиновых меток увеличивалось до 8 мкс, что свидетельствует о том, что они могут быть перспективными сенсорами на кислород в живых клетках при использовании технологии PLIM.

*Исследование реализовано при поддержке грантов СПбГУ #1.37.153.2014 и #1.50.1043.2014, а также при использовании оборудования ресурсного центра СПбГУ «Хромас».*

**Имиджинг с высокой фотостабильностью в живых клетках**

**К.А. Лукьянов**

***Институт биоорганической химии, Москва, Россия Нижегородская государственная медицинская академия, Нижний Новгород, Россия***

Существенной проблемой флуоресцентной микроскопии является фотообесцвечивание меток. Многие модальности имиджинга, такие как длительная съемка процессов во времени, 3D-реконструкция, детекция одиночных молекул, микроскопия сверхвысокого разрешения, флуоресцентная корреляционная спектроскопия, страдают от недостаточной фотостабильности флуоресцентных белков. К сожалению, наши знания о молекулярных механизмах фототобесцвечивания флуоресцентных белков остаются фрагментарными. В то же время, высокопроизводительный поиск фотостабильных вариантов является технически сложным. В этом докладе, я представлю нашу работу по увеличению фотостабильности флуоресцентного сигнала в живых клетках. Важным шагом в понимании и преодолении фотообесцвечивания GFP было открытие окислительной фотоконверсии этого белка из зеленой в красную форму, основанную на переносе электрона с хромофора на внутриклеточные акцепторы. Было обнаружено, что этот процесс может представлять основной путь фотообесцвечивания GFP в живых клетках. Мы показали, что супрессия окислительной фотоконверсии путем оптимизации состава клеточной среды является простым и эффективным способом увеличения фотостабильности зеленых флуоресцентных белков. Также, мы провели мутагенез ключевых аминокислотных остатков, предположительно участвующих в переносе электрона с хромофора на внешний акцептор. В результате были получены варианты с улучшенной фотостабильностью. Возможным «окончательным» решением проблемы фотостабильности является быстрая замена обесцвеченной молекулы на новую. Мы разработали новый метод мечения белков, основанный специфическом связывании флуорогенного красителя с мутантными вариантами липокалина бактерий. Благодаря обратимому связыванию красителя в белковом кармане, достигается очень высокая фотостабильность сигнала. Мечение с низкими концентрациями флуорогена позволяет проводить микроскопия сверхвысокого разрешения на основе детекции одиночных молекул.

  *Работа поддержана Российским научным фондам (грант №14-25-00129).*

**Визуализация каспазного сенсора в трехмерной культуре опухолевых клеток**

**Марданова Р.У., Жердева В.В., Савицкий А. П.**

***Институт биохимии им. А. Н. Баха, Федеральный исследовательский центр "Фундаментальные основы биотехнологии" РАН, Москва, Россия***

Для визуализации каспазного сенсора использовали опухолевую клеточную линию аденокарциномы гортани человекуа НеР-2. Трансфекцию генетическими конструкциями Tag RFP и TagRFP/KFP проводили с использованием лентивирусных частиц (Евроген,Россия).   Была подобрана методика создания сфероидов НеР-2 Tag RFP и НеР-2TagRFP/KFP. Через 5 суток сфероиды центрифугировали и снимали флуоресценцию сфероида по слоям с шагом 2 мкм.  Визуализацию каспазной активности проводили методом FLIM-FRET c использованием конфокального микроскопа с временным разрешением Microtime 200 (PicoQuant, Германия). Реконструкцию изображения проводили с использованием программы ImageJ.

   Данная работа была выполнена при финансовой поддержке Российского Научного Фонда, Грант N° 15-14-30019.

Выделение, очистка и характеристика свойств сенсоров каспазы-3 ТR-M5-К и ТR-M6-К

Н.К. Марынич1, А.С. Горященко2, А.П. Савицкий1,2

1Химический факультет, МГУ им. М.В. Ломоносова; 2Институт биохимии им. А.Н. Баха, ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, Москва, Россия

Биосенсоры на каспазу-3 (эффекторную протеазу, ответственную за гидролиз клеточных белков при апоптозе) позволяют оценить эффективность действия противоопухолевых препаратов, направленных на активацию каспаза-зависимого апоптоза. В нашей лаборатории разработан сенсор TR-M4-K, состоящий из белков TagRFP и KFP, соединенных аминокислотным линкером, содержащим сайт распознавания каспазы-3 DEVD. Линкер имеет жесткую структуру, обогащенную гидрофобными аминокислотами. Было показано, что данный сенсор эффективно гидролизуется каспазой-3 *in vitro* и в живых опухолевых клетках, после чего с целью оптимизации длины линкера получены сенсоры ТR-M5-К и ТR-M6-K, отличающиеся добавлением в линкер одной и двух пар гидрофобных аминокислот соответственно. Очистка сенсоров проводилась путем фракционного осаждения с последующей ионообменной хроматографией. Степень чистоты и созревания определяли методом электрофореза в денатурирующих условиях. Олигомерное состояние сенсоров определяли методами динамического светорассеяния и гель-фильтрации. Было показано, что как Tr-M5-K, так и TR-M6-K находятся в растворе в форме высокомолекулярных агрегатов.

*Работа выполнена при финансовой поддержке Российского Научного Фонда, грант № 15-14-30019.*

Исследование системы рестрикции-модификации Esp1396I в *E. coli* на уровне одиночных клеток с использованием флуоресцентной микроскопии

Н.Е. Морозова1, А.В. Сабанцев1, Е.С. Богданова2, Я.В. Фёдорова1,3, А.С. Майкова1,3, А.А. Ширяева1,3, А.Д. Ведяйкин1, А. Родик4, М. Джорджевич4, М.А. Ходорковский1, К.В. Северинов1,2,3

1Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого, Санкт-Петербург, Россия; 2Ваксманский институт микробиологии, Ратгерс США, Университет Нью-Джерси, США; 3Сколковский институт науки и технологии, Сколково, Россия; 4Факультет биологии, Университет Белграда, Белград, Сербия

Системы рестрикции–модификации (РМ) широко используются бактериями для защиты от чужеродной ДНК, которая обусловлена действиями эндонуклеазы рестрикции (ЭР) и метилтрансферазы (МТ). Присутствие в клетках системы РМ снижает эффективность вирусной инфекции в среднем на три порядка. Гены системы РМ находятся в клетках на плазмидах и часто подвергаются горизонтальному переносу. Для изучения работы системы РМ на уровне одиночных клеток, была сконструирована плазмида, несущая систему РМ Esp1396I, регулируемую С белком и содержащую флуоресцентные белки-слияния ЭР: mCherry и MТ:Venus. Было показано, что такая система РМ функциональна, а оба белка-слияния стабильны в клетках *E. coli.* Флуоресцентное мечение белков системы РМ позволяет нам измерять концентрации, а также наблюдать их разброс в одиночных бактериальных клетках. Нам удалось провести наблюдение за динамикой появления и накопления белков системы РМ после трансформации плазмиды со сконструированной нами флуоресцентно-меченной системой РМ в незащищённые бактериальные клетки. Впервые напрямую была показана значительная задержка между появлением МТ и ЭР в клетках, а также различие в динамике их накопления. Методика, разработанная для данных экспериментов, позволяет изучать динамику уровней белков в одиночных бактериальных клетках, а также может быть использована для изучения влияния количества белков системы РМ на вероятность заражения клеток бактериофагом. *Работа поддержана Министерством образования и науки РФ, проект 14.B25.31.0004 [to K.S.].*

Особенности регистрации флуоресценции индотрикарбоцианиновых красителей в биотканях

М.П. Самцов1, С.Д. Тарасов1, В.В. Жердева2, И.Г. Меерович2, Л.С. Ляшенко1, Е.С. Воропай1, А.П. Савицкий2

Институт прикладных физических проблем им. А.Н  Севченко, Белорусский государственный университет, Минск, Беларусь; 2ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, Москва, Россия

Дальнейшее развитие персониФИЦ ированной терапии онкологических заболеваний направлено на создание мультифункциональных препаратов, которые избирательно накапливаются в опухолях, обладают цитотоксическими свойствам и обеспечивают возможность диагностики локализации злокачественных новообразований. Для решения задачи оптической диагностики могут использоваться флуоресцирующие соединения, обладающие заметно отличающимися свойствами в опухолевых тканях по сравнению с нормальными. Перспективными для такого рода исследований представляются полиметиновые красители (ПК), которые имеют полосы поглощения и флуоресценции в спектральной области прозрачности биологических тканей. В этой области наиболее низкий уровень поглощения света тканями при максимальной глубине проникновения излучения. В первую очередь необходимо выяснить, насколько ощутимо различаются спектрально – люминесцентные свойства этих люминофоров в опухолевых и нормальных тканях. Настоящая работа посвящена выяснению такого рода задач в отношении нового индотрикарбоцианинового красителя.

Оценка возможности визуализации экспериментальных опухолей исследована на мышах линии Nu/Nu с помощью диффузного флуоресцентного томографа FMT 4000 (Perkin Elmer, США) при длине волны возбуждения 680 нм и регистрации на длине волны 770–800 нм. Полученные результаты FMT -исследований сопоставлены данными, полученными путем спектрометрии изолированных органов и тканей с помощью спектрометра с волоконным вводом. Установлено, что для уменьшения влияния собственного свечения биотканей при регистрации флуоресценции в спектральном диапазоне 710–900 нм *in vivo* следует использовать для возбуждения излучение лазерных источников с длиной волны более 676 нм. Показано, что для обеспечения пропорциональности сигнала флуоресценции фотосенсибилизатора его концентрации *in vivo* необходимо контролировать глубину проникновения света и форму спектров флуоресценции при введении нескольких концентраций фотосенсибилизатора. Полученные результаты демонстрируют возможности метода ДФТ для корректной регистрации фармакокинетики накопления и вывода фотосенсибилизатора на основе индотрикарбоцианинового *in vivo*.

**Клеточный и субклеточный оптический имиджинг в нейронауках**

**А.В. Семьянов**

***НИИ нейронаук, ННГУ им Лобачевского, Нижний Новгород***

Современные методы оптического нейроимиджинга существенно увеличили наши возможности в изучении механизмов передачи сигналов и пластичности в головном мозге. Стало возможным одновременно наблюдать активность тысяч нейронов или исследовать кальциевую динамику и изменения мембранного потенциала в отдельных компартментах клеток. В данном докладе я расскажу о нашем опыте использования различных методов оптического имиджинга нейронов и астроцитов. Мы использовали потенциал-чувствительные красители для оценки распространения возбуждения в нейронных сетях с помощью флуоресцентного имиджинга. Мы также провели оценку возможности применения данных красителей для имиджинга второй гармоники в отдельных компартментах нейронов. Однако, наибольший объем данных был нами получен с использованием кальциевого имиджинга (с помощью цифровых камер, конфокального и двух-фотонного), который проводился на клетках, либо загруженных химическим кальциевым индикатором, либо экспрессирующих генетически-кодируемый кальциевый индикатор (GCaMP2). Оптические методы также дают возможность фотостимуляции клеток. В нашей работе мы обычно применяем локальную фотоактивацию (анкейджинг) глутамата, но недавно исследовали возможность использования светочувствительных каналов, например, Channelrhodopsin-2 (ChR2) для субклеточной стимуляции. В докладе я расскажу о преимуществах и недостатках данных методов, а также перспективах развития оптического нейроимиджинга.

Данная работа была поддержана грантом РНФ № 16-14-00201 «Роль внесинаптической передачи, опосредованной глутаматом, в нормальной и патологической нейрофизиологии»

Анализ внутриклеточного рН и метаболизма в опухолевых клетках при апоптозе на основе FLIM-FRET имиджинга

Т.Ф. Сергеева1, О.А. Злобовская2, М.В. Ширманова1, В.В. Дуденкова1,3, А.И. Гаврина1,3, Г.С. Перельман1,3, К.А. Лукьянов1,2, Е.В. Загайнова1

1Нижегородская государственная медицинская академия, Нижний Новгород, Россия, 2Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, Россия, 3Нижегородский государственный
университет им. Н.И. Лобачевского, Нижний Новгород, Россия

Апоптоз – физиологический процесс, принимающий участие в формировании тканей и поддержании гомеостаза. Каспаза-3 играет ключевую роль в двух основных путях индукции апоптоза. Опухолевые клетки способны уходить от апоптоза с помощью различных молекулярных механизмов, включая изменение внутриклеточного рН и энергетического метаболизма. Целью данного исследования явилось изучение метаболизма, внутриклеточного рН и активации каспазы-3 в опухолевых клетках в процессе индукции апоптоза. Были проанализированы особенности энергетического метаболизма опухолевых клеток при апоптозе по изменению интенсивности флуоресценции и времени жизни флуоресценции метаболических ко-факторов НАД(Ф)Н и ФАД. Оценка внутриклеточного рН и активности каспазы-3 была выполнена с помощью генетически кодируемых сенсоров SypHer1 и mKate2-DEVD-iRFP соответственно. В экспериментах были использованы клеточные линии CT26 (мышиная карцинома толстой кишки), стабильно экспрессирующие сенсоры. Апоптоз опухолевых клеток индуцировали добавлением стауроспорина. В опухолевых клетках CT26, стабильно экспрессирующих SypHer1 и mKate2-DEVD-iRFP, было установлено изменение внутриклеточного рН при апоптозе после добавления стауроспорина. При этом было показано, что снижение внутриклеточного рН предшествует активации каспазы-3. Добавление стауроспорина к клеткам CT26, экспрессирующим сенсор mKate2-DEVD-iRFP, приводило к увеличению времени жизни флуоресценции mKate2, что указывает на активацию каспазы-3. Кроме того, наблюдался рост времени жизни флуоресценции связанной формы НАД(Ф)Н, что свидетельствует об изменении энергетического метаболизма опухолевых клеток и активации процесса окислительного фосфорилирования при запуске апоптоза. Таким образом, было показано, что апоптоз представляет собой сложный энергетически-зависимый процесс. При индукции апоптоза происходит изменение внутриклеточного рН и энергетического метаболизма. Понимание молекулярных механизмов, вовлеченных в процессы активации апоптоза в опухолевых клетках, позволит усовершенствовать методы лечения злокачественных новообразований*. Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 14-25-00129).*

Система биолюминесцентного резонансного переноса энергии на основе люциферазы светляков L. mingrelica и ее применение в гомогенном иммуноанализе

Д.В. Смирнова, Н.Н. Угарова

Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Химический факультет, Москва, Россия

Биоаналитические системы на основе биолюминесцентного резонансного переноса энергии (BRET) находят широкое применение в таких фундаментальных биохимических исследованиях как скрининг и анализ биологически активных веществ. На данный момент в качестве донора для BRET наиболее распространено использование люциферазы Renilla. Однако низкий квантовый выход биолюминесцентной реакции и излучение в коротковолновой области спектра (λmax=480–535 nm) затрудняют ее использование для имиджинга в тканях млекопитающих в условиях *in vivo*. Особенности биолюминесцентной системы люциферазы светляков позволяют преодолеть эти ограничения, что открывает большие перспективы для их применения в BRET-системах. Различные варианты BRET-систем на основе люциферазы светляков используют в гомогенном иммуноанализе и для чувствительного определения протеаз. Сконструирована система для наблюдения эффективного BRET. В качестве доноров протестированы различные термостабильные мутанты люциферазы светляков *Luciola mingrelica*, в качестве акцептора использован водорастворимый краситель Alexa Fluor 610х (AF). Выбрана пара донор-акцептор с оптимальными характеристиками. Разработаны методы получения конъюгатов люцифераза-прогестерон (Luc–Pg) и конъюгатов красителя с поликлональными антителами к прогестерону (AF–Ab). Полученные конъюгаты сохраняют свои специфические свойства – способность образовывать высокоаффинный комплекс антиген-антитело, а также позволяют наблюдать эффективный BRET. На основе сконструированной BRET-системы разработан метод гомогенного иммуноанализа низкомолекулярного модельного антигена прогестерона. Оптимизация условий проведения анализа, состава реакционной смеси и концентраций донора и акцептора позволили достичь минимально определяемой концентрации прогестерона 0,5 нг/мл.

Новый быстрофотоконвертируемый белок SAASoti

И.Д. Соловьев1,2, Л.М. Винокуров3, Т.В. Ивашина4, А.П. Савицкий1

1Институт биохимии им. А.Н.Баха, ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН; 2Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Химический факультет, Москва, Россия, 3Филиал института биоорганической химии имени М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова, Пущино Московской обл., Россия, 4Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрябина, Пущино Московской обл., Россия

Фотоконвертируемые белки (ФКБ) используются в локализационной субдифракционной микроскопии. С целью уменьшить дозу светового облучения токсичного для клеток при проведении эксперимента предпочтительно использовать ФКБ с наибольшими скоростям фотопереключения. ФКБ SAASoti, выделенный из коралла *Stylocoeniella armata*, существует в форме тетрамера и склонен к агрегации. Мутантная форма K145E существует только в форме тетрамера. В фотоконверсии ФКБ участвует протонированная форма хромофора, которая имеет полосу поглощения на 400 нм, т. е. скорость фотоконверсии зависит от pK1. Фотопревращение проводили под воздействием светодиода 395 нм и плотности мощности 20 мВ/см2. Константы скорости фотопревращения нормировались по отношению поглощения протонированной 400 нм и депротонированной 509 нм (pH-профиль скорости конверсии и поглощения 400 нм совпадают). Этот процесс можно рассматривать как мономолекулярную последовательную реакцию k1 – фотоконверсия и k2 – фотовыцветание. Определили значения констант для фотоконверсии дикого типа SAASoti (pK1=6.5, k1=0.7 с-1 pK2=5.3 k2=0,1 c-1) и SAASoti\_K145E (pK1=6.5 k1=0.7 с-1 pK2=6.3 k2=0,1 c-1) Чтобы оценить свойства SAASoti для сравнения был выбран широко используемый белок dendra2, для которого (pK1=7.0 k1=0.03с-1), выцветание для dendra2 практически не наблюдается в данных условиях. Как можно заключить из значения констант скорость фотопревращения SAASoti значительно больше dendra2, таким образом, этот белок является перспективным для использования в субдифракционных методах. *Работа выполнялась при поддержке Российского научного фонда (проект 15-14-30019).*

Флуоресцентная визуализация опухолей лабораторных животных с использованием генетически кодируемых сенсоров

И.В. Турчин1, М.С. Клешнин1, А.Г. Орлова1, В.И. Плеханов1, М.В. Ширманова2, Е.В.Загайнова2

1ФИЦ Институт прикладной физики РАН;2НИИ биомедицинских технологий, Нижегородская государственная медицинская академия, Нижний Новгород, Россия

Стабильная трансфекция опухолевых клеток геном флуоресцентного белка (ФБ) открывает широкие возможности для специфического генетического маркирования опухолей. Опухолевые клетки стабильно экспрессируют ФБ в отдельных клеточных компартментах на протяжении всей своей жизни, и эта способность передается от одного поколения клеток другому. Поэтому данный метод генетической маркировки открывает новые возможности для решения различных задач – от фундаментальных исследований процесса канцерогенеза до оценки противоопухолевого действия лекарственных средств в реальном времени. Диффузионная флуоресцентная томография (ДФТ) является наиболее точным методом для визуализации опухолей, меченных ФБ, в мелких лабораторных животных. Однако процедура восстановления пространственного распределения флуорофоров в ДФТ требует, в частности, высокого отношения сигнал-шум из-за некорректности обратной задачи ДФТ. Таким образом, метод ДФТ является малоэффективным для визуализации опухолей небольшого размера или при использовании ФБ с низкой яркостью. В этих случаях размер и положение опухоли в организме животного могут быть оценены из двумерных флуоресцентных изображений, полученных с помощью эпилюминесцентной или просветной (проекционной) визуализации. Нами была разработана экспериментальная установка для флуоресцентной визуализации лабораторных животных, сочетающая в себе данные методы получения изображений. Для реализации эпилюминесцентного метода используется равномерное освещение экспериментального животного, в сочетании с ПЗС-камерой. Для получения проекционных изображений используется механическое растровое сканирование «на просвет» источником лазерного излучения, модулированного по интенсивности на низкой частоте, и охлаждаемого фотоэлектронного умножителя, обеспечивающего высокую чувствительность регистрации флуоресценции. Результаты экспериментов по мониторингу роста ортотопической опухоли, экспрессирующей флуоресцентный белок KillerRed, привитой лабораторным мышам, показали высокую эффективность проекционного метода по сравнению с традиционным эпилюминесцентным методом.

**ОПТИЧЕСКОЕ ПРОСВЕТЛЕНИЕ БИОЛОГИЧЕСКИХ ТКАНЕЙ И КЛЕТОК КАК ИНСТРУМЕНТ ПОВЫШЕНИЯ КАЧЕСТВА МИКРОСКОПИИ И ВИЗУАЛИЗАЦИИ: ОТ IN VITRO IN VIVO**

В. В. Тучин

Научно-образовательный институт оптики и биофотоники, Саратовский национальный исследовательский государственный университет, ул. Астраханская, 83, Саратов 410012, Россия

Лаборатория лазерной диагностики технических и живых систем, Институт точной механики и управления РАН, ул. Рабочая, 24, Саратов 410028, Россия

Междисциплинарная лаборатория по биофотонике, Национальный исследовательский Томский государственный университет, пр. Ленина, 36, Томск 634050, Россия

E-mail: tuchinvv@mail.ru

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: живые ткани, оптическое просветление, ОКТ, многофотонная микроскопия, флуоресцентная микроскопия, фотоакустическая микроскопия, спекл-динамическая визуализация

Будут рассмотрены фундаментальные основы и последние достижения метода оптического просветления (ОП) для повышения качества микроскопических и макроскопических оптических изображений живых тканей и клеток. Технология OП основана на контролируемой и обратимой модификации оптических свойств тканей путем введения экзогенных оптических просветляющих агентов (ОПА) [1-3]. Будет проанализировано влияние различных OПА на транспорт воды в тканях и изменение их оптических свойств во времени. Будет обсуждаться проблема обратимой дегидратации ткани, вызывающей поперечную и продольную усадку ткани при измерениях in vitro и in vivo. Будут представлены результаты исследований специфических особенностей OП фиброзной и рыхлой соединительной ткани, а также эпителиальной ткани, выполненные с помощью ОКТ, конфокальной, фотоакустической, линейной и нелинейной флуоресцентной микроскопии, микроскопии на сигнале генерации второй гармоники (ГВГ) и с помощью метода спекл-динамических изображений. Повышение глубины зондирования и контраста изображения будет продемонстрировано в условиях in vitro, ex vivo и in vivo для различных тканей человека и животных, в том числе кожи, жира, склеры глаза, скелетной мышечной ткани, миокарда, церебральной мембраны, ткани желудочно-кишечного тракта, хряща, костной ткани черепа, кровеносных сосудов и цельной крови. Технологии эффективной доставки ОПА, в том числе путем свободной диффузии, местного нагрева, усиленной проницаемости ткани (сонофорез, лазерная перфорация), инкапсулирования ОПА, а также через кровеносную и лимфатическую сосудистую систему, также будут обсуждаться. Будет проанализировано влияние различных OПА на структуру ткани, баланс свободной и связанной воды и микроциркуляцию крови. Будут представлены результаты экспериментов по диффузии глюкозы, глицерина, ПЭГ, OmnipaqueTM и других биосовместимых просветляющих агентов в нормальных и патологических тканях.

[1] D. Zhu, K. V. Larin, Q. Luo, and V. V. Tuchin, “Recent progress in tissue optical clearing,” Laser Photonics Rev. 7(5), 732–757 (2013).

[2] V.V. Tuchin, “In vivo optical flow cytometry and cell imaging,” Rivista Del Nuovo Cimento, 37(7), 375–416 (2014).

[3] E. A. Genina, A. N. Bashkatov, Yu. P. Sinichkin, I. Yu. Yanina, V.V. Tuchin, “Optical clearing of biological tissues: prospects of application in medical diagnostics and phototherapy [Review],” J. Biomed. Photonics & Eng. 1(1), 22–58, 2015.

Люцифераза светляков как белковый зонд для имиджинга и мониторинга в живых системах

Н.Н.Угарова1, М.И.Кокшаров1,2

1Кафедра химической энзимологии, Химический факультет, МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия; 2Факультет молекулярной биологии, Университет Женевы, Швейцария

Оптические репортеры широко используются в клеточной биологии для неинвазивного мониторинга процессов в живых клетках и интактных животных. Биолюминесцентные репортеры обладают более слабым свечением по сравнению с флуоресцентными, однако их преимущество состоит в том, что они не требуют внешнего источника света и имеют очень низкий фоновый сигнал. Люциферазы как репортеры применяются по двум направлениям: 1) для мониторинга изменений экспрессии генов и белок-белковых взаимодействий во времени; 2) для имиджинга в интактных животных с помощью конкретных типов клеток со стабильной высокой экспрессией люциферазы, чтобы следить за ростом опухолей или распространением патогенов. Можно проводить мониторинг общей интенсивности свечения объекта с помощью фотоумножителя либо проводить 2D-имиджинг с помощью высокочувствительной камеры. Особое преимущество люциферин-люциферазной системы светляков – возможность длительного и непрерывного (до нескольких недель) мониторинга процессов на уровне культуры клеток, либо на уровне целого организма при высоком разрешении (вплоть до отдельных клеток).

Мы получили новые мутанты люциферазы светляков *Photinus pyralis,* превосходящие широко используемые люциферазы Eluc и luc2 по величине сигнала в живых клетках млекопитающих. Некоторые мутанты обеспечивают более быстрый отклик на изменения в транскрипции (превосходя эффективность тага деградации CL1-PEST по уменьшению полупериода жизни люциферазы в клетке), причем более короткий полупериод их жизни обусловлен ингибированием активности люциферазы в ходе наблюдения, но не деградацией самого фермента. По-видимому, их более быстрая реактивность менее зависима от состояния протеасомальной системы. Люциферазы жуков различных видов сильно различаются по полупериодам жизни белка и м-РНК (которые определяются последовательностями их белков и ДНК). Например, мутант LmGTS люциферазы *Luciola mingrelica* демонстрирует более быстрый ответ как индуцируемый репортер по сравнению с коротко живущими вариантами люциферазы *P. pyralis*. Это обусловлено значительно более коротким временем жизни его мРНК и относительно коротким временем жизни белка. Описанные результаты позволяют разрабатывать улучшенные репортеры на основе люцифераз жуков для биолюминесцентного имиджинга и мониторинга в живых системах.

Волоконно-оптические нейроинтерфейсы для флуоресцентной визуализации мозга

И.В. Федотов1,2,3, М.С. Почечуев1, О.И. Ивашкина1,3, М.А. Рощина1,3, А.Б. Федотов1,2,3, К.В. Анохин1, А.М. Желтиков1,2,3,4

1НИЦ Курчатовский институт, 2Физический факультет, Международный учебно-научный лазерный центр, МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия ,3Российский квантовый центр, Сколково, Московская область, Россия, 4Факультет физики и астрономии, Техасский университет Остин, США

Интеграция передовых волоконно-оптических методов регистрации и оптогенетических технологий [1] ведет к революционным изменениям в нейронауках, позволяя подойти к решению фундаментальных вопросов в науках о мозге и обеспечивая уникальными инструментами для изучения вопросов о том, как регистрируемые c высоким пространственным разрешением и клеточной специфичностью сложные пространственно-временные паттерны нейронной активности соотносятся высшими функциями мозга. Было показано, что пучки оптических волокон позволяют проводить визуализацию нейронов головного мозга живых животных [2], *in vivo* визуализацию многоцветной флуоресценции [3] и комбинационного рассеяния [4]. В широко распространенном способе волоконного зондирования [5] оптическое волокно вживляется в мозг живого животного через направляющую канюлю, непосредственно перед экспериментом.

В нашей работе, на основе проведенных экспериментов, было показано, что реализованные в размыкаемом формате пучки оптических волокон, состоящие из нескольких тысяч сердцевин, позволяют передавать высококачественное изображение, предлагая тем самым новую платформу для создания имплантируемых эндоскопов для минимально инвазивной *in vivo* визуализации головного мозга. Концепция демонстрируемого в данной работе размыкаемого эндоскопа развивает идею вживляемого волоконного нейроинтерфейса из одиночного оптического волокна [6] до технологии визуализации через пучок волокон. Представленные в работе эксперименты на различных линиях трансгенных мышей демонстрируют возможности разработанного эндоскопа как мощного инструмента для хронической in vivo нейровизуализации с субклеточным пространственным разрешением генетически кодируемых кальциевых индикаторов, маркеров нейронной активности и специфических белков в глубоких слоях мозга.

*Работа выполнена при поддержке Федеральной целевой программы “Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научнотехнологического комплекса России на 2014–2020 годы” (соглашение о предоставлении субсидии 14.607.21.0092 от 21 ноября 2014, уникальный идентификатор прикладных научных исследований RFMEFI60714X0092)*

Литература

[1] E.S. Boyden, et al. Nature Neuroscience 8, 1263–1268 (2005).

[2] P. Vincent et al. EMBO Rep. 7, 1154–1161 (2006).

[3] L.V. Doronina-Amitonova, et al. Appl. Phys. Lett. 101, 233702 (2012).

[4] L.V. Doronina-Amitonova, et al. Appl. Phys. Lett. 101, 113701 (2012).

[5] A.M. Aravanis, L.-P. et al. J. Neural Eng. 4, S143–S156 (2007).

[6] L. V. Doronina-Amitonova, et al.Sci. Rep. 3, 3265 (2013).

Изучение олигомерного состояния FRET-сенсоров каспазы-3 TR-М5-K и TR-М6-K

Л.А.Шапошников1, А.С. Горященко2, А.П. Савицкий1,2

1Химический факультет, МГУ им. М.В. Ломоносова; 2Институт биохимии им. А.Н. Баха, ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, Москва, Россия

В нашей лаборатории был создан сенсор каспазы-3 TR-M4-K на основе флуоресцентных белков TagRFP и KFP и гибкого полипептидного линкера со структурой «буйка». Было продемонстрировано, что данный сенсор успешно гидролизуется каспазой-3 *in vitro* и в живых опухолевых клетках. Для оптимизации структуры линкера было проведено варьирование длины его гидрофобной части и получены сенсоры TR-M5-K и TR-M6-K, отличающиеся от TR-M4-K добавлением одной или двух пар гидрофобных аминокислотных остатков соответственно. Изучение свойств этих сенсоров показало, что в отличие от TR-M4-K, имеющего структуру тетрамера, эти сенсоры находятся в растворе в форме высокомолекулярных агрегатов. Агрегация препятствует правильному фолдингу, затрудняет доступ фермента к сайту гидролиза и осложняет использование белка в живых системах ввиду больших размеров агрегатов. Для предотвращения агрегации используются различные подходы, не допускающие агрегацию в процессе биосинтеза белка или помогающие разрушить образующиеся олигомеры. Последние предполагают использование ПАВ или хаотропных агентов. Для разрушения белковых агрегатов сенсоров TR-M5-K и TR-M6-K были использованы имидазол (от 0,5 М до 3 М), тритон х-100 (от 0,01% до 1%), изотиоцианат калия (от 1 М до 6 М) и гидрохлорид гуанидина (от 0,5 М до 6 М). Олигомерное состояние определяли методом динамического светорассеяния.

Наилучшие результаты были получены при использовании 0,01% раствора тритона х-100 и сенсора TR-М5-K. В этом случае наряду с высокомолекулярными агрегатами около 80% сенсора присутствует в растворе в октамерной форме. Использование других детергентов в различных концентрациях к снижению олигомерного состояния обоих сенсоров не привело.

Измерение вязкости опухолевых клеток с использованием молекулярных роторов и FLIM

М.В. Ширманова1, Л.Е. Шимолина1,2, М.К. Куимова3, Л.Г. Клапшина4, Е.В. Загайнова1

1Нижегородская государственная медицинская академия; 2Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского, Нижний Новгород, Россия, 3Имперский колледж Лондона, Лондон, Великобритания, 4Институт металлоорганической химии им. Г.А. Разуваева, Нижний Новгород, Россия

Внутриклеточная вязкость – важный параметр, регулирующий проницаемость мембран, транспортные процессы, ферментативную активность, зависящие от диффузии функции, биосинтез, межмолекулярные взаимодействия т. д. Вязкость в раковых клетках и тканях на сегодняшний день изучена очень слабо. В частности, известно, что она отличается у опухолевых и нормальных клеток и изменяется при терапии.

Целью данной работы была разработка метода визуализации микровязкости опухолевых клеток с использованием молекулярных роторов на основе Бодипи и флуоресцентной микроскопии с временным разрешением (FLIM). На клетках колоректального рака мышей CT26 *in vitro* и опухолях CT26 у мышей *in vivo* были протестированы два ротора. Клетки *in vitro* инкубировались с 8.9 мМ раствором роторов. *In vivo* роторы вводили животным внутривенно в дозах 3-7 мг/кг. Для регистрации времени жизни флуоресценции был использован многофотонный томограф (JenLab, Германия), укомплектованный FLIM-модулем (Becker&Hickl Inc., Германия).

Было показано *in vitro*, что молекулярный ротор Бодипи-2 в течение первых 10 мин после добавления в среду культивирования локализован преимущественно на плазматической мембране клеток. Кривая затухания флуоресценции имела моноэкспоненциальный характер с временем жизни ~2.6 нс, что соответствовало вязкости ~ 370 cП.

Фармакокинетическое исследование показало, что концентрация роторов в плазме крови мышей снижается до фонового уровня за 48 ч. Используя флуоресцентный имиджинг in vivo, мы определили, что оба ротора накапливаются в опухоли: Бодипи-2 в течение 1–4 ч, Бодипи С10, растворенный в полимерном носителе, за 6 ч. Двухфотонная флуоресцентная микроскопия показала наличие роторов в опухолевых клетках и соединительной ткани опухоли. Однако в последнем случае ротор демонстрировал нехарактерную кинетику затухания флуоресценции, что ограничивало оценку вязкости. Измерение времени жизни флуоресценции в опухолевой ткани показало перераспределение роторов между цитоплазмой и мембранными структурами в течение 1.5 ч после инъекции. Величины вязкости, измеренные *in vivo*, были схожи с данными, полученными *in vitro*.

Таким образом, мы продемонстрировали возможность анализа вязкости *in vitro* и *in vivo* в живых опухолевых клетках. *Работа поддержана РФФИ (грант №15-02-05189).*