

Министерство
образования
и науки
Российской
Федерации

Федеральное
государственное
автономное
образовательное
учреждение
высшего
образования
Московский
физико-
технический
институт
(государственный
университет)



60

60-я
НАУЧНАЯ
КОНФЕРЕНЦИЯ
МФТИ

Москва,
Долгопрудный,
Жуковский
2017

ТРУДЫ 60-Й ВСЕРОССИЙСКОЙ НАУЧНОЙ КОНФЕРЕНЦИИ МФТИ

20-26 ноября
2017 года

Биологическая
и медицинская
физика

Министерство образования и науки Российской Федерации
Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего
образования «Московский физико-технический институт
(государственный университет)»

Труды
60-й Всероссийской научной
конференции МФТИ

20 - 26 ноября 2017 года

Биологическая и медицинская физика

Москва Долгопрудный Жуковский
МФТИ
2017

УДК 61:53:57
ББК 51:22.3:28.07
Т78

Т78 Труды 60-й Всероссийской научной конференции МФТИ.
20–26 ноября 2017 г. Биологическая и медицинская физика. -
М.: МФТИ, 2017. - 48 с.
ISBN 978-5-7417-0653-4

Включены результаты оригинальных исследований студентов, аспирантов, преподавателей и научных сотрудников МФТИ и дружественных учебных и научных организаций. Статьи представляют интерес для специалистов, работающих в области биологической и медицинской физики.

УДК 61:53:57
ББК 51:22.3:28.07

ISBN 978-5-7417-0653-4

© Федеральное государственное автономное
образовательное учреждение высшего образования
«Московский физико-технический институт
(государственный университет)», 2017

Оглавление

Программный комитет конференции.....	5
Организационный комитет конференции.....	6
Секция физики живых систем	7
<i>А.Б. Миркасымов, И.В. Зелепукин, М.П. Никитин, П.И. Никитин, С.М. Деев</i>	
Влияние покрытия частиц и их размера на эффективность блокировки системы моноклеарных фагоцитов	7
<i>И.В. Приходько</i>	
Оценка роли стабилизации рецепторных кластеров в активации Т-лимфоцитов	8
<i>И.А. Пономарев, К.Е. Злобина</i>	
Влияние тромбообразования на гемодинамические изменения в разветвленных сосудистых сетях	10
<i>Г.П. Иткин, А.И. Сырбу</i>	
Компьютерная модель для оптимизации управления роторными насосами вспомогательного кровообращения.....	11
<i>П.А. Соловьева, Н.А. Подоплелова</i>	
Взаимодействие фактора свертывания IXa с активированными тромбоцитами с учетом их деления на субпопуляции	12
<i>С.Д. Семенов, А.А. Сорокин, А.С. Воробьев, В.А. Шурхай, Е.Н. Николаев</i>	
Исследование липидного состава мозга методами масс-спектрометрии. Сравнение результатов экстракции и прямой ионизации.....	13
<i>Т.Ю. Иванько, Д.М. Пушин, К.Е. Злобина</i>	
Численное моделирование гидродинамической активации тромбообразования.....	15
<i>С.А. Романов, П.В. Башкиров, К.В. Чекашкина</i>	
Регуляция транспортных характеристик эластичных наноканалов, сформированных из липидного бислоя	16
<i>А.В. Халявкин</i>	
Знание закономерностей статистики смертности помогает понять, почему стареют организмы, состоящие из потенциально нестареющих клеточных линий	17
Секция физико-химической биологии и биотехнологии	20
<i>Е.Н. Мочалова, А.В. Орлов, П.И. Никитин, М.П. Никитин</i>	
Разработка нового формата иммунохроматографического анализа, основанного на использовании высокоспецифичных детектируемых агентов, выполняющих базовые логические операции.....	20
<i>Г.В. Чащина, А.Д. Бениаминов, Д.Н. Калужный</i>	
Направленное окисление структуры G-квадруплекса промотора с-Мус онкогена под действием порфирина	21
<i>А.Г. Кузёмин, П.В. Бондаренко, С.Е. Журавлева</i>	
Эффективность длительного мониторинга окружающей среды урбанотерритории (на примере города Долгопрудного, Московская область)	22
<i>П.А. Котельникова, В.О. Шипунова, М.П. Никитин, С.М. Деев</i>	
Модификации магнитных наночастиц белком магнитотактических бактерий для адресной доставки лекарств к раковым клеткам	24

<i>Л.Я. Иноземцев, А.А. Минин</i>	
Исследование взаимодействия виментина с митохондриями	25
<i>А.В. Пушкарев, А.В. Орлов, П.И. Никитин, М.П. Никитин</i>	
Реализация конструкций булевой логики на твердой фазе и их исследование методом спектрально-фазовой интерферометрии.....	26
<i>К.К. Малышевская, Н.Г. Гурская, К.А. Лукьянов</i>	
Создание сенсоров каспаз-3/8/9 на основе красных флуоресцентных белков.....	27
<i>А.В.Елизарова, М.С.Чекалина, В.Н. Даниленко</i>	
Эволюционно-структурный анализ гена BLGT_02875 у <i>B. longum subsp. longum</i> GT15 и его ортологов у бифидобактерий	28
<i>М.А. Пашкова, И.А. Алтухов, Д.М. Мошенский</i>	
Оценка качества результатов белковой масс-спектрометрии	30
Секция клеточных и геномных технологий.....	32
<i>Е.С. Чефанова, Н.В. Барыкина, О.М. Субач, Г.Н. Ениколопов, Ф.В. Субач</i>	
Разработка красного кальциевого сенсора, имеющего в качестве новой сенсорной части кальмодулин из грибов <i>S. cerevisiae</i>	32
<i>Е.В. Дейнека, И.А. Остерман, Я.А.Иваненков</i>	
Разработка новых антибактериальных молекул и изучение механизма их действия ...	33
<i>А.Т. Арутюнян, Kumeta Masahiro, Yoshimura Shige H.</i>	
Эффект актин-связывающих бициклических пептидов.....	35
<i>А.И. Кузнецова, Т.С. Краснова, А.С.Орехова, П.М. Рубцов</i>	
Сравнительное изучение мутантных вариантов фактора транскрипции KLF11 при моногенных формах диабета	37
<i>Е.В. Буглакова, Yiming Li, J. Ries</i>	
4Pi микроскоп: метод локализации единичных молекул.....	39
<i>Д.О. Кони́на, М.Ю. Скоблов, А.Ю. Филатова</i>	
Определение структуры и функции длинной некодирующей РНК LINC01420.....	40
<i>А.А. Айгинин, М.Д. Логачева, А.А. Криницына, Г.А. Шипулин, К.Ф. Хафизов, А.С. Сперанская</i>	
Разработка методик для анализа видового состава пищевой продукции растительного происхождения с помощью высокопроизводительного секвенирования	42
<i>В.С. Чернышев, Г.В. Сергей</i>	
Поиск новых биомаркеров онкозаболеваний среди морфологических характеристик экзосом	43
<i>С.С. Енджиевская, А.А. Минин</i>	
Изучение влияния виментина на миграцию клеток	44
<i>Э.Р. Вагапова, П.В. Спирин, В.С. Прасолов</i>	
Роль SCL-комплекса в регуляции экспрессии рецепторной тирозинкиназы <i>C-KIT</i> при лейкозах	45

Программный комитет конференции

Н.Н. Кудрявцев, ректор МФТИ – председатель

В.А. Баган, директор по развитию – заместитель председателя

А.А. Воронов, проректор по учебной работе и довузовской подготовке

А.В. Дворкович, директор ФРКТ

В.В. Киселев, директор ФФПФ

С.С. Негодяев, директор ФАКТ

В.В. Иванов, директор ФЭФМ

А.М. Райгородский, директор ФПМИ

С.В. Леонов, директор ФБМФ

П.К. Кашкаров, директор ИНБИКСТ

Организационный комитет конференции

М.В. Милов, руководитель направления «Образование» ЦУП – председатель

С.О. Русскин, представитель ФРКТ

Е.Ю. Чиркина, представитель ФФПФ

Ю.О. Алексеева, представитель ФАКТ

В.Б. Макарова, представитель ФАКТ

В.А. Яворский, представитель ФЭФМ

С.А. Зайцев, представитель ФЭФМ

Е.Г. Молчанов, представитель ФПМИ

В.Н. Логинов, представитель ФПМИ

К.А. Коньков, представитель ФПМИ

К.И. Агладзе, представитель ФБМФ

В.Г. Орлов, представитель ИНБИКСТ

М.В. Костелева, представитель УНЦ ГСН

А.С. Гунаисова, начальник пресс-службы

Е.Д. Жебрак, директор аналитического центра

Секция физики живых систем

УДК 620.3

Влияние покрытия частиц и их размера на эффективность блокировки системы мононуклеарных фагоцитов

А.Б. Миркасымов^{1,2}, И.В. Зеленукин^{1,2}, М.П. Никитин^{1,2,3}, П.И. Никитин³, С.М. Деев²

¹Московский физико-технический институт (государственный университет)

²Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и

Ю.А. Овчинникова РАН

³Институт общей физики им. А.М. Прохорова РАН

Наночастицы используются в медицине как для диагностики онкологических заболеваний, так и для их лечения. Однако при применении наночастиц *in vivo* существует проблема их быстрого выведения из кровотока и поглощения клетками системы мононуклеарных фагоцитов (СМФ), что существенно снижает эффективность малых доз наноагентов. Для замедления поглощения частиц клетками СМФ свойства наноагентов оптимизируют, например, изменяют размер частиц и поверхностное покрытие, благодаря чему значительно увеличивают время циркуляции наночастиц в кровотоке. Недостаток данного метода в том, что, снижая поглощение частиц СМФ, он также может уменьшить их аккумуляцию в опухоли, нивелируя положительный эффект от увеличения времени циркуляции [1].

В нашей работе мы для повышения продолжительности циркуляции частиц применили феномен блокировки клеток СМФ. Это явление заключается в уменьшении скорости поглощения агентов макрофагами со временем за счет их насыщения при введении большой дозы частиц.

В качестве модельного агента для исследования влияния размера частиц на эффективность блокировки мы решили использовать частицы, покрытые оксидом кремния. С этой целью соосаждением двух и трехвалентных солей железа были синтезированы суперпарамагнитные наночастицы (МЧ), которые затем были покрыты оксидом кремния в реакции Штобера до достижения необходимого размера: 100, 200, 500 нм в диаметре. Аналогичные, но не обладающие нелинейными магнитными свойствами наночастицы из оксида кремния были получены гидролизом тетраэтоксисилана с последующей его конденсацией. В ходе эксперимента мы вводили высокую дозу немагнитных частиц в кровотоки мыши и добивались частичной блокировки СМФ, после которой вводили МЧ и измеряли их время циркуляции.

Для исследования влияния покрытия частиц на эффективность блокировки в качестве блокатора были использованы 100-нанометровые магнитные частицы, покрытые глюконовой кислотой, хитозаном, карбоксиметилдекстраном и полиакриловой кислотой.

Детекция МЧ в кровотоке проводилась на основе их нелинейного намагничивания в ответ на прикладываемое переменное магнитное поле (MPQ-детекция). Данный метод позволил неинвазивно вести наблюдение за количеством частиц с течением времени [2]. Вследствие их экспоненциального убывания со временем, время циркуляции частиц можно характеризовать временем полувыведения МЧ из кровотока.

В результате блокировки было достигнуто увеличение времени полувыведения частиц более чем в 20 раз. Обнаружено влияние размера блокирующего агента на эффективность блокировки: более крупные агенты могут достигать необходимого результата в сравнительно меньшем молярном количестве. Покрытие частиц на порядок более значительно влияет на эффективность чем их размер.

Блокировка СМФ позволяет повысить продолжительность циркуляции частиц в кровотоке, а значит и их терапевтическую эффективность. Таким образом, можно существенно уменьшить дозу токсического препарата, сохранив действенность процедуры.

Литература

1. *Liu T., Choi H., Zhou R., Chen I.W.* RES blockade: A strategy for boosting efficiency of nanoparticle drug // *Nano Today*. 2015. N 10(1). P. 11–21.
2. *Nikitin M.P., Torno M., Chen H., Rosengart A., Nikitin P.I.* Quantitative real-time in vivo detection of magnetic nanoparticles by their nonlinear magnetization // *Journal of Applied Physics*. 2008. N 103(7). P 07A304.

УДК 577.25

Оценка роли стабилизации рецепторных кластеров в активации Т-лимфоцитов

И.В. Приходько

Гематологический научный центр Минздрава РФ
Московский физико-технический институт (государственный университет)

Многоклеточные организмы обладают врожденным иммунитетом. Система врожденного иммунитета реагирует на характерные маркёры патогенов, например, липополисахариды для грамотрицательных бактерий [1]. В развитых иммунных системах, в том числе человеческой, патогены, выявленные врожденной системой, анализируются в лимфоузлах Т-лимфоцитами. Лимфоциты способные распознавать патоген, активируются и запускают волну специфичного иммунного ответа [2].

Механизмы активации Т-лимфоцитов активно изучаются [3]. Белки патогенов, выявленные врожденной иммунной системой, дробятся до эпитопов (9–14 аминокислот), последние закрепляются с помощью главного комплекса гистосовместимости на поверхности антигенпрезентирующих клеток, где могут контактировать с рецепторами Т-лимфоцитов. Помимо патогенных эпитопов, на антигенпрезентирующих клетках находятся эндогенные эпитопы. Недавно выяснилось, что активация Т-лимфоцита происходит, лишь если патогенный эпитоп имеет характерное время диссоциации в четыре раза большее, чем у эндогенных эпитопов [4].

В данной работе проанализирован механизм дискриминации эпитопов, основанный на кластеризации Т-клеточных рецепторов. Современные методы измерения позволяют наблюдать, как свободные или олигомерные рецепторы Т-лимфоцитов, находящихся в невозбужденном состоянии, собираются в кластеры при контакте с антигеном [6]. Кластеру для роста нужен непрерывный контакт хотя бы с одним эпитопом. Рост кластера приводит к увеличению количества эпитопов, способных взаимодействовать с ним, а следовательно, к уменьшению вероятности прекращения контакта, то есть к стабилизации кластера. В основе развиваемого подхода лежит предположение, что стабильный кластер существует на порядки большее время, чем нестабильный, и в следствии этого может эффективно поддерживать процессы необходимые для активации Т-лимфоцита.

Вероятность активации при единичном контакте Т-лимфоцита и антигена презентующей клетки определяется как вероятность стабилизации хотя бы одного кластера за N контактов эпитопов и Т-клеточных рецепторов, размещенных на этих клетках (1). Для оценки последней используется два предположения: радиус кластера растёт линейно, а эпитопы всех видов распределены равномерно по поверхности антиген презентующей клетки. Показатель экспоненты λ в формуле (1) задается выражениями (2) и (3), где α и δ – константы скорости ассоциации и диссоциации соответственно, θ – размерный коэффициент, E – математическое ожидание.

$$P_a = 1 - (1 - e^{-\lambda})^N, \quad (1)$$

$$\eta_{\alpha\delta} = E\left(\frac{\alpha\delta}{\alpha+\delta}\right) \quad \eta_\delta = E\left(\frac{\delta}{\alpha+\delta}\right), \quad (2)$$

$$\lambda = (1 - \ln \eta_\delta) |\ln \eta_\delta|^{-\frac{3}{2}} \sqrt{\frac{\pi \eta_{\alpha\delta}^2}{4\theta}}. \quad (3)$$

Перебор всех возможных эпитопов показал, что один Т-клеточный рецептор активируется при контакте примерно с 1 миллионом эпитопов, в то время как другие 10 миллионов вызывают деполяризацию мембраны, но не активируют Т-лимфоцит [7]. В связи с этим предполагается, что на антигенпрезентирующей клетке с патогенными эпитопами в 10 раз больше эндогенных эпитопов, сильно взаимодействующих с Т-клеточными рецепторами (линии уровня вероятности активации при такой доле патогена изображены на рис. 1). Вероятность активации при контакте с клеткой, содержащей только эндогенные эпитопы, меньше 0.001, а при контакте с клеткой, содержащей патогенные эпитопы, превосходит 0.5. В рамках рассматриваемой модели становится понятным повышенная активация Т-лимфоцитов димерами эндогенных и патогенных эпитопов [8]: кластер имеет наибольшую вероятность разрушения пока не захватывает второй эпитоп, а в описанной ситуации это происходит сразу. В частности, рассмотренная модель показывает зависимость активации не только от характеристик патогенных эпитопов, но и эндогенных, поэтому интересно её применение в области трансплантологии. После пересадки костного мозга в организме сосуществуют две подпопуляции антигенпрезентирующих клеток с разными главными комплексами гистосовместимости, и, следовательно, отличающимися характеристиками эндогенных эпитопов.

Автор выражает благодарность Гурия Георгию Теодоровичу за обсуждение и ценные замечания.

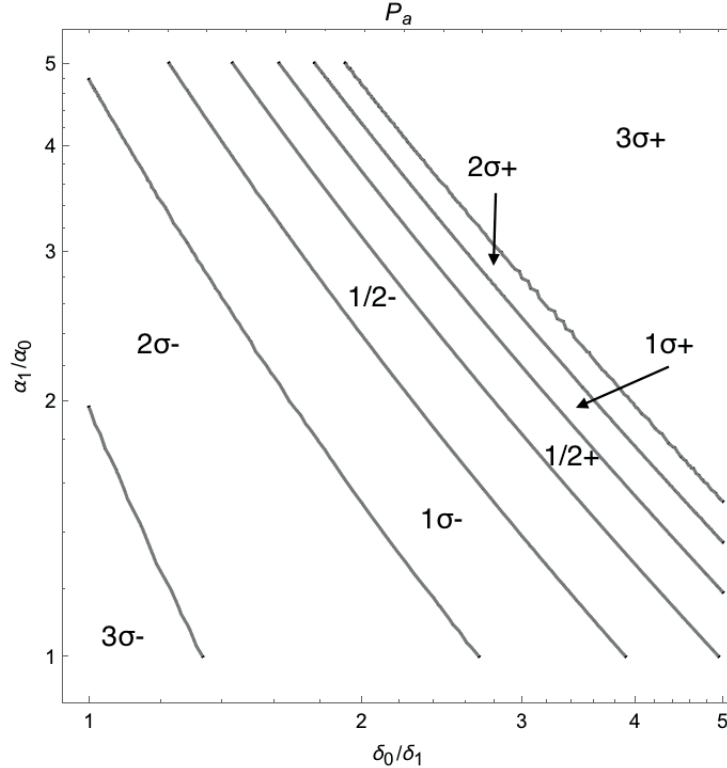


Рис. 1. Линии уровня вероятности активации при контакте с антигенпрезентирующей клеткой в зависимости от параметров взаимодействия с патогенным эпитопом. Параметры: $\theta = 0.009$, $\varphi = 0.1$, $\alpha_0 = 0.25$, $\delta_0 = 1$, $N = 10^6$. Линии проведены на уровнях сигм: 0.001, 0.022, 0.158, 0.5, 0.842, 0.978, 0.999

Литература

1. *Lemaitre B. [et al.]*. The dorsoventral regulatory gene cassette *spätzle/Toll/cactus* controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults // *Cell*. 1996. V. 86, N 6. P. 973–983.
2. *Medzhitov R., Preston-Hurlburt P., Janeway Jr C. A.* A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity // *Nature*. 1997. V. 388, N 6640. P. 394.
3. *Lever M. [et al.]*. Phenotypic models of T cell activation // *Nature reviews. Immunology*. 2014. V. 14, N 9. P. 619.
4. *Aleksic M. [et al.]*. Dependence of T cell antigen recognition on T cell receptor-peptide MHC confinement time // *Immunity*. 2010. V. 32, N 2. P. 163–174.
5. *Feinerman O., Germain R. N., Altan-Bonnet G.* Quantitative challenges in understanding ligand discrimination by $\alpha\beta$ T cells // *Molecular immunology*. 2008. V. 45, N 3. P. 619.
6. *Boyle S. [et al.]*. Quantum dot fluorescence characterizes the nanoscale organization of T cell receptors for antigen // *Biophysical journal*. 2011. V. 101, N 11. P. L57–L59.
7. *Wooldridge L. [et al.]*. A single autoimmune T cell receptor recognizes more than a million different peptides // *Journal of Biological Chemistry*. 2012. V. 287, N 2. P. 1168–1177.
8. *Krogsgaard M. [et al.]*. Agonist/endogenous peptide-MHC heterodimers drive T cell activation and sensitivity // *Nature*. 2005. V. 434, N 7030. P. 238.

УДК 577.359

Влияние тромбообразования на гемодинамические изменения в разветвленных сосудистых сетях.

И.А. Пономарев¹, К.Е. Злобина²

¹Московский физико-технический институт (государственный университет)

²Гематологический научный центр Минздрава РФ

Изменение гидродинамических параметров сосудистой сети является определяющим фактором для кровоснабжения органов и тканей. Известно, что окклюзия сосудов эмболами ведет к повышению гидродинамического сопротивления сосудистой сети, например, при легочной гипертензии [1]. Ранее предпринимались попытки изучения эмболизации легочного кровотока без учета реакций свертывания, например, работа [2]. Ключевым вопросом является не только передвижение эмболов по сети сосудов под действием конвективного массопереноса, но и изменение размеров тромбов с протеканием реакций свертывания крови. В предлагаемой работе развивается подход к построению математической модели, описывающей взаимодействие плазменного звена гемостаза с гидродинамикой в разветвленных сосудистых сетях.

В использованном приближении каждый сосуд сети подразделялся на сегменты, в которых происходят биохимические реакции свертывания крови. В основе описания биохимических процессов лежала система уравнений на концентрации активатора свертывания, ингибитора, фибриногена. Полимеризация фибрина описывалась с помощью техники моментов, развитой ранее [3]. В работе рассматривались сосудистые сети с дихотомической топологией.

В результате проведения численных экспериментов удалось установить закономерности изменения гемодинамического сопротивления сосудистых сетей в зависимости от времени и количества активатора свертывания, введенного в систему.

Литература

1. *Galie N. [et al.]*. Guidelines for the diagnosis and treatment of pulmonary hypertension // *Eur. Heart J.* 2009. V. 30, N 20. P. 2493–2537.
2. *Clark A.R., Burrowes K.S., Tawhai M.H.* The impact of micro-embolism size on haemodynamic changes in the pulmonary micro-circulation // *Respiratory physiology & neurobiology*. 2011. V. 175, N 3. P. 365–374.
3. *Guria G.Th., Herrero M.A., Zlobina K.E.* A mathematical model of blood coagulation induced by activation sources // *Discrete and Continuous Dynamical Systems. Series A*. 2009. N 25(1). P. 175–194.

Компьютерная модель для оптимизации управления роторными насосами вспомогательного кровообращения

Г.П. Иткин¹, А.И. Сырбу²

¹Федеральный научный центр трансплантологии и искусственных органов
им. академика В.И. Шумакова

²Московский физико-технический институт (государственный университет)

В последние годы имплантируемые насосы непulsирующего потока (ННП) находят широкое применение у больных с терминальной сердечной недостаточностью, которым по ряду причин невозможна трансплантация сердца, и таким больным постановка ННП производится на постоянной основе. Одновременно с достаточно оптимистичными прогнозами использования данной технологии обширная клиническая практика выявила ряд недостатков, проявляющихся в основном при длительном применении ННП и нуждающихся в пересмотре стратегии управления ННП.

В отличие от известных компьютерных и стендовых моделей в данной компьютерной модели, описывающих большой круг кровообращения сердечно-сосудистой системы, левый желудочек сердца (ЛЖ) рассматривается как источник импульсов напряжения (равного давлению «холостого хода» или давлению в ЛЖ при пережатой аорте) с внутренним сопротивлением, которое определяет угол наклона кривой давление–расход. [1]. Данный подход, в отличие от известных моделей, позволяет оценить разгрузку левого желудочка сердца при работе вспомогательного насоса, подключенного по схеме «ЛЖ-аорта». При этом внутреннее сопротивление ЛЖ выбрано на основании анализа гемодинамических кривых давление–расход в условиях терминальной степени сердечной недостаточности $R_i = 0,41$ мм рт. ст. · с/мл. Артерии представлены в виде трехэлементной модели с сосредоточенными параметрами, состоящей из периферического сопротивления $R_p = 1.08$ мм рт. ст. · с/мл, ёмкости сосудов $C = 2$ мл/мм рт. ст. и характеристического сопротивления аорты $R_c = 0.1$ мм рт. ст. · с/мл. Коронарные сосуды описываются как спадающиеся сосуды [2]. Для описания давления, действующего на стенки коронарных сосудов со стороны сердца, используется идеальный трансформатор с коэффициентом трансформации $K = 0.4$. Параметры модели подбираются таким образом, чтобы результирующий расход соответствовал физиологическим значениям в норме. По аналогии с ЛЖ ННП в модели представлен также как источник напряжения холостого хода (равному давлению, развиваемому при пережатии выхода насоса постоянной скорости вращения ротора ННП) и с внутренним сопротивлением, которое отражает угол наклона кривой давление–расход. В работе были использованы сопротивления, полученные на основании анализа кривых давление-расход ННП, используемых в клинической практике: HeartMate 2[®], HeartWare[®], Rotaflow[®], ВИШ[®]. Блок-схема модели представлена на рис. 1.

В результате моделирования модуляции скорости вращения ротора исследуемых насосов в кардиосинхронизированном режиме сопulsации и выборе соответствующего соотношения амплитуды напряжения насоса в систолу и диастолу было получено, что работа насосов в pulsирующем режиме позволяет добиться большего аортального pulsового давления по сравнению с непulsирующим режимом ННП (табл. 1).

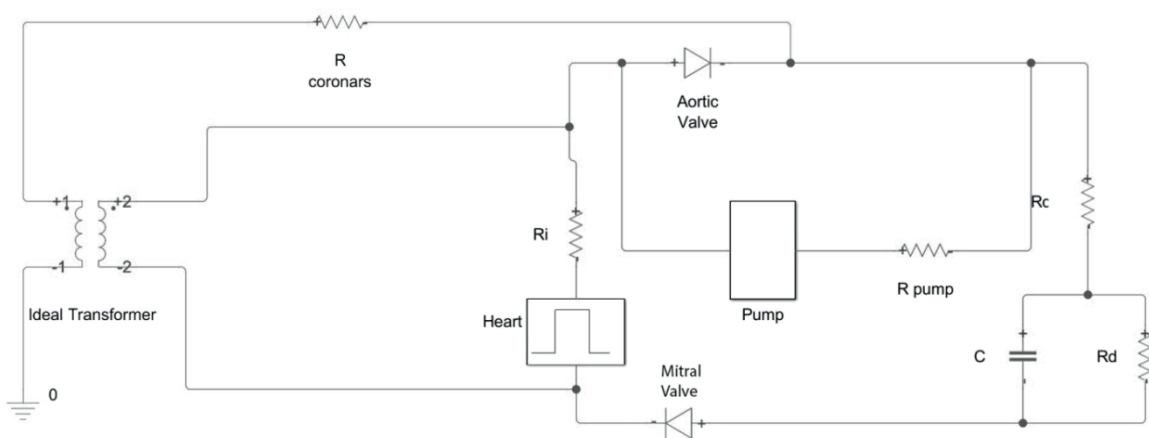


Рис. 1. Принципиальная схема компьютерной модели большого круга кровообращения сердечно-сосудистой системы

Результаты, полученные на модели для различных насосов

Таблица 1

Параметр	Единицы измерения	Пост. Режим	Пульс. Режим	Пост. Режим	Пульс. Режим	Пост. Режим	Пульс. Режим	Пост. Режим	Пульс. Режим
Название насоса	—	HeartMate 2		HeartWare		Rotaflow		ВИШ	
Аортальное давление (систола/диастола (разность))	мм рт.ст.	105/84 (21)	110/80 (30)	111/80(31)	115/77(38)	109/81(28)	113/78(35)	106/85(21)	110/83(27)
Общий кровоток	л/мин	4,73	4,72	4,74	4,72	4,72	4,72	4,72	4,72
Расход насоса (общий (систола/диастола))	л/мин	5 (3,5/1,5)	5 (4,3/0,7)	5(4,4/0,6)	5(4,9/0,1)	5(4/1)	5(4,7/0,3)	5(3,8/1,2)	5(4,4/0,6)
Коронарный кровоток (общий (систола/диастола))	мл/мин	290 (96/194)	287 (108/179)	289(111/178)	287(118/169)	285(102/183)	285(112/173)	287(100/187)	287(110/177)
Давление в желудочке (систола/диастола)	мм рт.ст.	79/-3	66/5	65/5	57/10	75/2	64/9	74/1,8	64/7,8

Литература

1. Шумаков В.И. [и др.]. Моделирование физиологических систем организма. Москва: Медицина, 1971. 352 с.

2. James M. Downey, Edward S. Kirk. Inhibition of Coronary Blood Flow by a Vascular Waterfall Mechanism // Circulation Research. 1975. V. 36. P. 753–760.

УДК 612.115

Взаимодействие фактора свертывания IXa с активированными тромбоцитами с учетом их деления на субпопуляции

П.А. Соловьева¹, Н.А. Подоплелова²

¹Московский физико-технический институт (государственный университет)

²Национальный медицинский исследовательский центр детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Дмитрия Рогачева

Свертывание крови представляет собой сложный каскад ферментативных реакций, большая часть которых протекает не в объеме плазмы, а на мембранах активированных тромбоцитов. К мембранно-зависимым относится и реакция активации фактора X комплексом внутренней теназы. Данный комплекс состоит из сериновой протеиназы фактора IXa и его кофактора VIII [1, 4]. Все ранние работы по описанию взаимодействия факторов свертывания с тромбоцитами были сделаны на гомогенных суспензиях клеток. Однако недавно было доказано, что при активации тромбоциты разделяются на

субпопуляции. Факторы свертывания связываются с отрицательно заряженным фосфатидилсерином, экспонируемым на внешнем слое мембраны только одной из субпопуляций [2, 3]. До настоящего момента детальных исследований взаимодействия фактора свертывания IXa с субпопуляциями активированных тромбоцитов не было проведено.

Методы. Связывание флуоресцентно-меченного (флуорофор FITC) фактора с активированными тромбоцитами оценивали с помощью проточного цитометра FACSCantoII.

Результаты. В данной работе было показано, что фактор свертывания IXa связывается преимущественно с субпопуляцией ФС-положительных тромбоцитов. Связывание было обратимым, Ca^{2+} -зависимым, и не имело насыщения в широком диапазоне концентраций фактора IXa (от 0 до 2000 нМ).

Кроме того, было показано, что диссоциация фактора протекает в две стадии. Первая стадия достаточно быстрая, в первые 20 минут с мембраны тромбоцитов диссоциирует около 30% связавшегося фактора. Вторая стадия значительно медленнее. В ходе нее достигается плато, которое находится значительно выше, чем можно было бы предположить из экспериментов по равновесному связыванию с той же концентрацией свободного фактора. То есть существует механизм закрепления фактора IXa на мембране активированных тромбоцитов, препятствующий его диссоциации.

Выводы. В ходе данной работы нами было количественно охарактеризовано связывание фактора IXa с двумя субпопуляциями активированных тромбоцитов.

Работа поддержана грантами РФФИ № 16-04-01163, № 16-04-00125, № 17-04-01309.

Литература

1. Подоплелова Н.А. [и др.]. Регуляция мембранно-зависимых реакций свертывания крови // Успехи Физиологических наук. 2015. V. 46, № 4. С. 3–14.
2. Munnix I.C.A. [et al.]. Platelet response heterogeneity in thrombus formation // Thromb. Haemost. 2009. V. 102, N 6. P 1149–1156.
3. Yakimenko A.O. [et al.]. Identification of different proaggregatory abilities of activated platelet subpopulations // Biophys. J. 2012. V. 102, N 10. P. 2261–2269.
4. Zwaal R.F. [et al.]. Lipid-protein interactions in blood coagulation // Biochim. Biophys. Acta — Rev. Biomembr. 1998. V. 1376, N 3. P. 433–453.

УДК 543.51+577.115+612.82

Исследование липидного состава мозга методами масс-спектрометрии.

Сравнение результатов экстракции и прямой ионизации

С.Д. Семенов¹, А.А. Сорокин^{1,2}, А.С. Воробьев¹, В.А. Шурхай^{1,3}, Е.Н. Николаев^{1,4}

¹Московский физико-технический институт (государственный университет)

²Институт биофизики клетки РАН

³Центр нейрохирургии им. академика Н.Н. Бурденко

⁴Сколковский институт науки и технологий

Полнота удаления недоброкачественных образований является важной задачей нейроонкологии. Именно полнота удаления во многих случаях определяет прогноз дальнейшего развития заболевания. В случае неполного удаления всех фрагментов опухоли возможно возобновление ее роста, в то же время избыточное удаление здоровых тканей увеличивает риск послеоперационных осложнений. Задача полного удаления недоброкачественных образований в мозге при проведении нейрохирургических операций пока что полностью не решена. Это обусловлено отсутствием на данный момент универсальных аналитических методов, при помощи которых мог бы осуществляться мониторинг состава удаляемых во время операции тканей. В настоящее время существует ряд методов, позволяющих определить границы опухоли, однако большинство из них либо

не может использоваться во время операции (МРТ), либо требуют значительного количества времени (методы иммуногистохимического анализа). Поэтому создание метода экспресс-контроля типа ткани, удаляемой во время нейрохирургической операции, является актуальной задачей с большим потенциалом внедрения в медицинскую практику.

В данной работе предпринята попытка создания метода исследования тканей опухолей головного мозга при помощи профилирования на основе их липидного состава. При исследовании биомолекул в настоящее время широко используются методы масс-спектрометрии, такие как матрично-ассистированная лазерная десорбция/ионизация (MALDI), ионизация при помощи электроспрея (ESI-MS). Использование методов масс-спектрометрии на основе электроспрейной ионизации лучше подходит для исследования липидов, ввиду того, что в данном случае проводится анализ ионов относительно небольшой массы (до 1000 Да), что находится на границе диапазона масс молекул, исследуемых при помощи метода MALDI. За последние десять лет был сформирован целый комплекс методов и подходов анализа липидного состава биологических образцов при помощи хромато-масс-спектрометрии, а также методов обработки результатов такого анализа, что в общем виде называется липидным анализом. Стандартным подходом, применяемым при липидном анализе, является исследование экстракта липидной фракции пробы биоматериала, приготовление которого занимает большое количество времени, что критично в клинических условиях. Для снижения времени исследования можно совместить процессы экстракции и регистрации с помощью метода прямой ионизации в ESI-MS, описанного в статье [1].

В данной работе мы сравнили два подхода исследования состава липидов головного мозга человека: экспресс-анализ на собранной установке, занимающий около 15 минут и анализ экстракта по методу Фолча [2], занимающий в сумме около двух часов.

Образцы здоровых тканей мозга человека были предоставлены ФГБНУ «Научно-исследовательский институт нейрохирургии им. акад. Н.Н. Бурденко». За основу эталонного метода экстракции был выбран метод Фолча [2]. Полученный экстракт был разбавлен 100 мл MeOH. Далее раствор исследовался и анализировался с помощью ESI-MS. Для исследования проб образцов человеческого мозга был модифицирован электроспрейный метод прямой ионизации липидов непосредственно с наконечника медицинской иглы [1]. Для закрепления и предотвращения высыхания проб образца, они размещались в специальной насадке, изготовленной из микропробирки и наконечника типа Eppendorf. Скорость подачи растворителя (MeOH) варьировалась от 2 до 8 мкл/мин. Напряжение электроспрея для всех экспериментов было равным 4–7 кВ. Стабильность электроспрея поддерживалась с помощью точной регулировки положения иглы относительно входного отверстия в масс-спектрометр и контролировалась с помощью видеокамеры.

Сравнительный анализ результатов полученных методами прямой ионизации ткани и масс-спектрометрии липидных экстрактов показал, что оба метода демонстрируют хорошее соответствие по наиболее интенсивным пикам в диапазоне масс 400–1000 Да в пределах погрешностей измерений. Несмотря на это поведение ряда классов соединений различно. Например, в экстрактах заметно понижена интенсивность пика 834, который соответствует PS 40:6, и 600, соответствующего Cer 36:1. При этом наиболее интенсивный пик спектра экстрактов (885 Да PI 38:4) является вторым по интенсивности в спектре прямой экстракции.

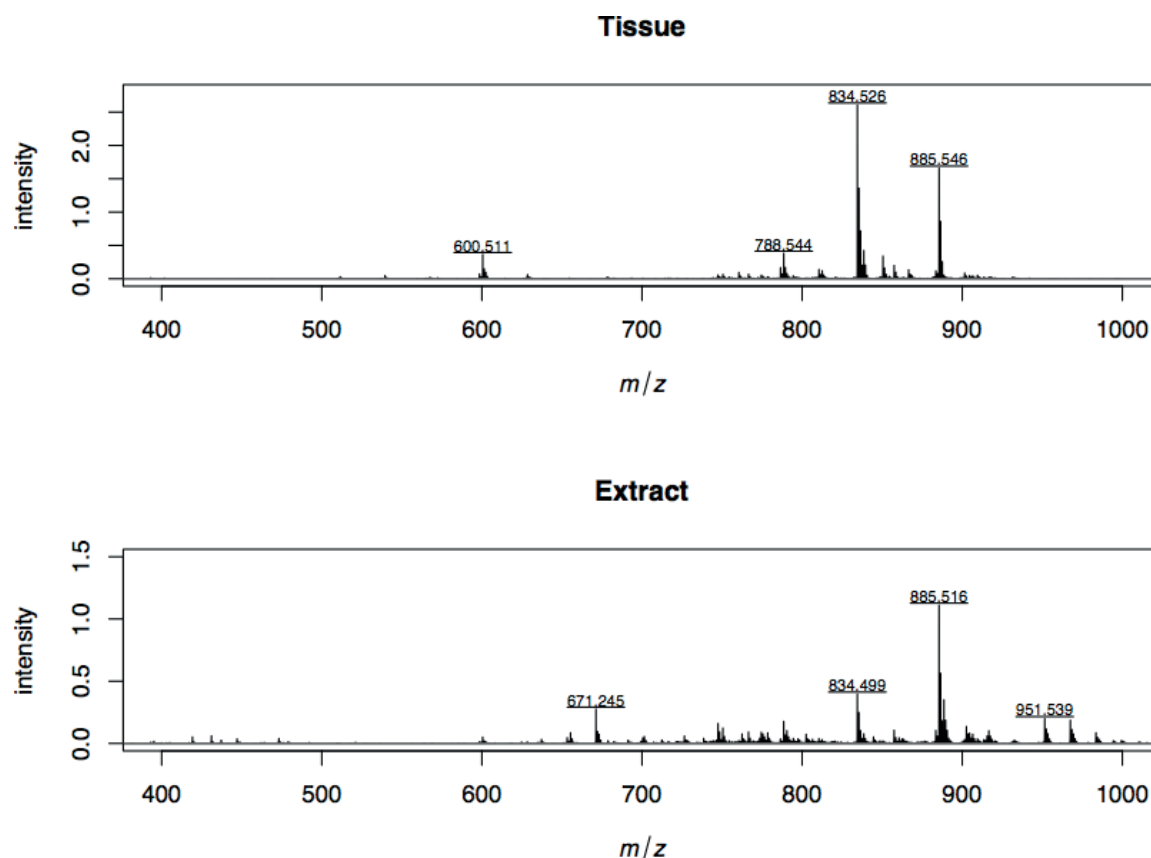


Рис. 1. Спектры полученные при исследовании тканей методами прямой ионизации (Tissue) и экстракции по Фолчу (Extract)

В целом, данное исследование показало что прямая экстракция ткани хорошо воспроизводит качественный состав липидов тканей головного мозга, однако заметно отличается от экстрактов по относительной интенсивности пиков различных соединений.

Работа поддержана грантом РФФИ №16-15-10431.

Литература

1. Kononikhin A. [et al.] A novel direct spray-from-tissue ionization method for mass spectrometric analysis of human brain tumors // Anal. Bioanal. Chem. 2015. V. 407, N 25. P. 7797–7805.
2. Кеймс М. Техника липидологии. Выделение, анализ и идентификация липидов. М.: Мир, 1975. 323 с.

УДК 577.38

Численное моделирование гидродинамической активации тромбообразования

Т.Ю. Иванько¹, Д.М. Пушин^{1,2}, К.Е. Злобина^{1,2}

¹Московский физико-технический институт (государственный университет)

²Гематологический научный центр Минздрава РФ

Один из механизмов активации тромбоцитов — активация в сдвиговых течениях в присутствии фактора фон Виллебранда (vWF) [1]. Запуск указанного механизма возможен только в условиях закритических напряжений сдвига. Подобные гидродинамические условия имеют место как в норме, например, около клапанов сердца, так и при наличии патологий строения сосудов (аневризм, стенозов) или в различных имплантируемых устройствах: аппаратах вспомогательного кровообращения, шунтах или гемодиализных

графтах [2]. Активация тромбоцитов может запускать тромбообразование, приводя к тяжелым осложнениям (инфарктам или инсультам) или выходу из строя имплантируемых устройств.

Молекула vWF играет ключевую роль в передаче динамического влияния напряжения сдвига на внутриклеточные пути активации тромбоцитов [3]. В крови vWF обычно присутствует в глобулярной форме, число активирующих тромбоциты доменов A1 экспонируется наружу глобулы в количестве, не достаточном для активации тромбоцитов. При увеличении напряжения сдвига молекула vWF претерпевает конформационные изменения, разматывается, принимая более растянутую форму. В результате на поверхности мультимера VWF оказывается большее число доменов A1. При превышении сдвиговым напряжением некоторой критической величины, размотанная молекула vWF становится способной активировать тромбоциты. В недавней работе [4] было показано, как напряжение сдвига и длина vWF влияют на активацию тромбоцитов.

Целью данной работы является создание пространственно-распределенной модели гидродинамической активации тромбоцитов в сосудах сложной геометрии.

Модель протестирована на прямом сосуде со стенозом. Она дает возможность исследовать активацию тромбоцитов вследствие изменений геометрии сосуда, условий потока или мультимерности vWF. Полученная в работе модель может использоваться для численного тестирования имплантируемых устройств на предмет провоцирования тромботических осложнений.

Литература

1. Kroll M.H. [et al.] Platelets and shear stress // *Blood*. 1996. V. 88, N 5. P. 1525–1541.
2. Casa L.D. C., Deaton D.H., Ku D.N. Role of high shear rate in thrombosis // *Journal of vascular surgery*. 2015. V. 61, N 4. P. 1068–1080.
3. Nesbitt W.S. [et al.]. A shear gradient-dependent platelet aggregation mechanism drives thrombus formation // *Nature medicine*. 2009. V. 15, N 6. P. 665–673.
4. Zlobina K.E. and Guria G.Th. Platelet activation risk index as a prognostic thrombosis indicator // *Scientific Reports*. 2016. V. 6: 30508. P. 1–6.

УДК 577.352

Регуляция транспортных характеристик эластичных наноканалов, сформированных из липидного бислоя

С.А. Романов^{1,2}, П.В. Баширов^{1,2}, К.В. Чекашкина²

¹Московский физико-технический институт (государственный университет)

²Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины

Благодаря последним достижениям в области нанотехнологий и молекулярной инженерии появилась возможность создавать биомиметические наноматериалы — синтетические системы, имитирующие биологические структуры и процессы. Так, живые системы содержат огромное количество разнообразных наномасштабных каналов и пор, принцип организации которых может быть использован для разработки нанофлюидных биосенсоров, способных различать не только отдельные молекулы, но и отдельные элементы структуры важнейших биологических макромолекул (полинуклеиновые кислоты, белки), что необходимо для развития методов одномолекулярного секвенирования нового поколения [1]. Принцип работы таких сенсоров заключается в регистрации импульсов уменьшения ионного тока (resistive impulse technique), текущего через наноканал, в ответ на частичное и кратковременное перекрытие его просвета исследуемой молекулой [2]. Хотя синтетические нанопоры активно используются для исследования отдельных макромолекул и демонстрируют высокую пропускную способность, их эффективность в качестве датчиков не соответствует характеристикам биологических ионных каналов. Основные проблемы заключаются в обеспечении контроля диаметра поры, физико-

химических свойств ее поверхности, регуляции времени перемещения одиночной молекулы аналита через нанопору и предотвращения неспецифического взаимодействия с ее стенками.

В данной работе на примере мембранной нанотрубки (НТ), вытянутой из плоской бислоидной липидной мембраны [3], мы демонстрируем, что двумерная текучесть липидного бислоя позволяет контролировать как плотность поверхностного заряда внутренней стенки канала НТ, так и радиус его просвета с субнанометровой точностью. Нами показано, что электрическое поле индуцирует перераспределение заряженных липидов во внутреннем монослое НТ, что позволяет изменять плотность поверхностного заряда от нуля до чрезвычайно высокого значения $1,7 \text{ e}/\text{nm}^2$ и таким образом регулировать ионную селективность канала. В некоторых случаях изменение поверхностного заряда внутреннего монослоя НТ может быть сопряжено с изменением его радиуса. На основании этого выдвигается предположение о возможности использования липидного бислоя в качестве биосовместимого модификатора поверхностных свойств синтетических нанопор, значительно увеличивающего динамическую функциональность таких наноструктур.

Литература

1. Wanunu M. 2012. Nanopores: A journey towards DNA sequencing // *Physics Life Rev.* N 9(2). P. 125–158.
2. Branton D., Deamer D.W., Marziali A., Bayley H., Benner S.A., Butler T., Jovanovich S.B. The potential and challenges of nanopore sequencing // *Nat. Biotechnol.* 2008. N 26(10). P. 1146–1153.
3. Frolov V.A., Lizunov V.A., Dunina-Barkovskaya A.Y., Samsonov A.V., Zimmerberg J. Shape bistability of a membrane neck: a toggle switch to control vesicle content release // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2003. N 100(15). P. 8698–8703.

УДК 57.011

Знание закономерностей статистики смертности помогает понять, почему стареют организмы, состоящие из потенциально нестареющих клеточных линий

А.В. Халявкин

Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН
Институт системного анализа РАН

Старение организмов представляется загадкой. Многие исследователи выказывали свое непонимание, почему особи, отлично функционировавшие в молодости, постепенно утрачивают эту способность и стареют. При том, что стволовые клетки взрослых, способные неограниченно размножаться, могут обновлять все органы и ткани. Для объяснения феномена старения были выдвинуты две концепции. По одной концепции старение является результатом функционирования генетической программы, подобной программе развития от зиготы до зрелого организма. По другой старение — это следствие неконтролируемых стохастических событий, препятствующих поддержанию состояния молодого зрелого организма. К настоящему времени накоплены данные, противоречащие обеим концепциям. Однако они продолжают обсуждаться в литературе и на научных форумах. Анализ совокупности имеющихся данных показывает, что дилемма «или программа — или стохастика» является ложной. На самом деле, скорее всего, старение особей многих видов не связано ни с программированным, ни со стохастическим механизмом, а является результатом их жизнедеятельности в пессимальных (неадекватных) условиях [1–5]. Для этого надо лишь вспомнить, что устойчивость любых устойчивых систем и режимов возможна лишь в ограниченном диапазоне внешних условий. И тогда достаточно теории управления и системного подхода для того, чтобы и найти первопричину старения, и понять основные механизмы его реализации. Ведь организмы как целое отвечают системными реакциями на внешние воздействия посредством

управляющих и регуляторных систем. От адекватности этих реакций во многом зависит их выживаемость. При этом особи стремятся минимизировать возникающие отклонения от некой целевой функции. Эта многопараметрическая функция должна задавать адекватную активность организма в ответ на конкретное воздействие среды. Поэтому мониторинг локальных характеристик экологической ниши через сенсорные органы и следящие системы организма позволяют управляющим и регуляторным блокам индивида своевременно и адекватно реагировать на большинство требований, предъявляемых организму средой. Многомерному пространству влияний окружающей среды (давлению среды) можно сопоставить многомерное пространство реакций (состояний) индивида. Причем второе пространство существенно меньше первого (вложено в первое), т.к. обычно особи адаптированы к широкому, но ограниченному, диапазону изменений внешних условий, характеризующему именно их экологическую нишу. Причем при старении пространство допустимых состояний организма неуклонно сокращается (гомеостаз с гомеостенозом). Это приводит к росту смертности с возрастом даже при неизменном в среднем давлении среды, т.к. всё большая доля внешних воздействий и внутренних флуктуаций начинает превышать уменьшающиеся резервные возможности индивида им противостоять. Признанного объяснения такому возрастному сокращению объема допустимого «фазового пространства» еще не найдено. Как упоминалось выше, такой «эффект шагреновой кожи» связывают или с локальными недостатками (конструктивной неспособностью к полному самообновлению всех компонент организма за счет накопления стохастических сбоев), или с центральной причиной (реализацией генетической программы старения, необходимой для смены поколений), или с их комбинацией.

Однако пиковые нагрузки и внутренние флуктуации всегда обеспечивают ненулевую смертность и смену поколений безотносительно от наличия или отсутствия старения. Потенциальная же способность к полному самоподдержанию компонент организма у видов с повторными циклами размножения находит все больше подтверждений. Поэтому логично связать первопричину естественного старения индивида с особенностями функционирования его управляющих систем в различных режимах жизнедеятельности, диктуемых внешней средой.

Пусть в фазовом пространстве жизнеспособных состояний организма виртуальная обобщенная уставка, или изображающая точка управляющих систем, соответствует текущему запросу внешней среды. Такое соответствие позволяет системам управления задать и поддерживать адекватный уровень физиологической активности индивида. Рассмотрим простейший случай возмущений среды без тренда. Тогда изображающая точка будет флуктуировать в области допустимых значений вокруг некой средней величины, значение которой, наряду с границами всего фазового пространства, будет поддерживаться гомеостатическим регуляторным блоком управляющей системы. При сдвиге давления среды гомеостатический блок должен поддерживать колебания изображающей точки вокруг нового значения в фазовом пространстве жизнеспособных состояний организма.

Предположим, что так происходит не всегда. Допустим, что многомерное пространство жизнеспособных состояний организма состоит из внутренней области (ядра) и внешней оболочки. Для ядра постулируется гомеостаз без гомеостеноза, а для оболочки – с гомеостенозом. То есть в фазовом подпространстве оболочки гомеостатический блок не способен удерживать на уровне, соответствующем текущему запросу внешней среды, виртуальную изображающую точку управляющих систем (при нормальной относительно нее регуляции). Он также не способен поддерживать границы области допустимых состояний организма. Данная область начинает сокращаться, а изображающая точка начинает дрейфовать в сторону от зоны ядра. Это неадекватно влияет на координирующие и коррекционные функции управляющих систем организма, приводя к «системному расхождению» (термин А.А. Богданова), характерному для старения. Скорости этих изменений, определяющие темп старения, должны зависеть от разности между границей негемеостенозного ядра и начальной локализацией изображающей точки, соответствующей конкретному давлению среды.

Из минимальной модели старения потенциально нестареющих индивидов [1–5] следует, что при значениях стандартного давления среды, находящихся за границами

адекватного диапазона внешних условий, индуцирующих полное самоподдержание всех систем организма (изображающая точка управляющих систем локализована вне устойчивого ядра), индивиды обязаны испытывать старение. При этом, если возрастное увеличение силы смертности растет по экспоненте («закон Гомперца»), то параметры этой экспоненты согласуются с другой закономерностью статистики смертности – с корреляцией Стрелера-Милдвана [6]. Из нее следует, что чем меньше стартовый уровень силы смертности (ниже давление среды), тем выше показатель экспоненты, т.е. кинетический параметр, характеризующий темп старения. Эта закономерность как раз и является ключом к пониманию возникновения старения у потенциально нестареющих организмов. Ведь геронтологам давно было ясно, что «в самих клетках и многоклеточных организмах не заключено ничего такого, что мешало бы их превращению в вечно функционирующие самовосстанавливающиеся системы» [6]. И поэтому было необходимо «выяснение принципиального вопроса, почему стареет организм, состоящий из потенциально бессмертных клеток» [7]. При этом клетки не только проявляют свою способность не стареть, но, даже состарившись в неадекватных условиях *in vivo* или *in vitro*, могут вернуться в молодое состояние при изменении условий их жизнедеятельности [8].

Литература

1. Khaliavkin A.V. Influence of environment on the mortality pattern of potentially non-senescent organisms. General approach and comparison with real populations // Adv. Gerontol. 2001. V. 7. P. 43–46.
2. Khalyavkin A.V., Yashin A.I. Nonpathological senescence arises from unsuitable external influences // Ann. N.Y. Acad. Sci. 2007. V. 1119. P. 306–309.
3. Khalyavkin A.V. From macro- to nano-systems and back in search of the primary cause and control of aging // Proceedings of the International Conference «Instabilities and Control of Excitable Networks: From macro- to nano-systems». Dolgoprudny, 2012. P. 69–76.
4. Khalyavkin A.V., Krutko V.N. Aging is a simple deprivation syndrome driven by a quasi-programmed preventable and reversible drift of control system set points due to inappropriate organism-environment interaction // Biochemistry. 2014. V. 78. P. 1133–1135.
5. Khalyavkin A.V., Krut'ko V.N. How regularities of mortality statistics explain why we age despite having potentially ageless somatic stem cells // Biogerontology. 2017.
6. Strehler B.S. Time, Cells, and Aging. New York: Academic Press, 1977. 456 p.
7. Frolkis V.V., Muradian Kh.K. Life Span Prolongation. Boca Raton: CRC Press, 1991. 425 p.
8. Rando T.A., Chang H.Y. Aging, rejuvenation, and epigenetic reprogramming: resetting the aging clock. // Cell. 2012. V. 20. P. 46–57.

УДК 57.088.1

**Разработка нового формата иммунохроматографического анализа,
основанного на использовании высокоспецифичных детектируемых агентов,
выполняющих базовые логические операции**

Е.Н. Мочалова^{1,2}, А.В. Орлов², П.И. Никитин², М.П. Никитин^{1,2}

¹Московский физико-технический институт (государственный университет)

²Институт общей физики им. А.М. Прохорова РАН

Создание высокоспецифичных методов детекции химических веществ и биологических молекул представляет интерес в самых различных областях науки. На данный момент разработано множество платформ для детекции маркеров различных заболеваний в целях клинической диагностики, токсинов и витаминов, например, для проверки качества продуктов питания, наркотиков для задач в области криминалистики и др. [1]–[4].

Широкое признание среди методов детекции получил иммунохроматографический анализ, основанный на использовании специальных тестовых полосок. Образец (например, крови, слюны или мочи) при миграции вдоль тестовой полоски взаимодействует с высокоспецифичными детектируемыми агентами, в роли которых выступают наночастицы, в результате чего происходит (или не происходит) их связывание. Далее эти комплексы достигают зоны тестовой линии, с иммобилизованными на ней «регистрирующими» молекулами (например, с антителами или антигенами). В итоге по линии, образованной (или не образованной) комплексами, можно судить о наличии детектируемых молекул в образце.

Иммунохроматографический анализ, как правило, не требует дополнительных реагентов; кроме того, возможна визуальная оценка результата теста, что позволяет проводить легкую и быструю интерпретацию без использования каких-либо приборов.

Однако конкурентный формат иммунохроматографического анализа, используемый для детекции низкомолекулярных аналитов, обладает большой погрешностью в области малых концентраций, что существенно ограничивает предел детекции.

Ранее сотрудниками нашей лаборатории был предложен подход, позволяющий преобразовать почти любой тип нано- и микрочастицы в автономные биокомпьютерные структуры, которые способны реализовать полный набор логических функций («ДА», «НЕ», «И», «ИЛИ») и связаться с мишенью в результате вычисления [5].

В целях улучшения параметров иммунохроматографии данный подход был применен для разработки принципиально нового формата проведения иммунохроматографического анализа для детекции малых молекул. Нами созданы высокоспецифичные детектируемые агенты, реализующие базовую логическую функцию «ДА», которая характеризуется возрастанием детектируемого сигнала при возрастании концентрации аналита. При использовании соответствующих антител или иных распознающих рецепторов разработанные нами агенты могут быть использованы для детекции практически любого низкомолекулярного аналита.

Работа выполнена при поддержке грантов РФФИ № 17-33-80176 и № 17-54-560024.

Литература

1. Orlov A.V., Bragina V.A., Nikitin M.P., Nikitin P.I. Rapid dry-reagent immunomagnetic biosensing platform based on volumetric detection of nanoparticles on 3D structures // Biosens. Bioelectron. 2016. V. 79. P. 423.
2. Orlov A.V., Khodakova J.A., Nikitin M.P., Shepelyakovskaya A.O., Brovko F.A., Laman A.G., Grishin

- E.V., Nikitin P.I.* Magnetic Immunoassay for Detection of Staphylococcal Toxins in Complex Media // *Anal. Chem.* 2013. V. 85(2). P. 1154.
3. *Nexo E., Christensen A.L., Petersen T.E., Fedosov S.N.* Measurement of Transcobalamin by ELISA // *Clin. Chem.* 2000. V. 46(10). P. 1643.
4. *Kintz, P., Villain M., Cirimele V.* Hair Analysis for Drug Detection // *Ther. Drug Monit.* 2006. V. 79. P. 423.
5. *Nikitin M.P., Shipunova V.O., Deyev S.M., Nikitin P.I.* Biocomputing based on particle disassembly // *Nat. Nanotechnol.* 2014. V. 9. P. 716.

УДК 577.113.4

Направленное окисление структуры G-квадруплекса промотора с-Мус онкогена под действием порфирина

Г.В. Чащина¹, А.Д. Бениаминов^{1,2}, Д.Н. Калюжный²

¹Московский физико-технический институт (государственный университет)

²Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН

Огромное число промоторов всех онкогенов генома человека содержат нуклеотидные последовательности, способные потенциально образовывать G-квадруплексную структуру [1]. Данные структуры могут служить потенциальными молекулярными мишенями в противоопухолевой терапии. В качестве объекта исследования выбрана последовательность промотора онкогена с-Мус. G-квадруплексная структура, образуемая данной последовательностью, широко изучена физико-химическими методами *in vitro*. Однако поведение и структурные свойства этого G-квадруплекса в присутствии комплементарной нити в двойной спирали ДНК исследованы слабо.

При помощи ПЦР на геномной ДНК человека был получен участок chr8 (128748130-128748278) 149 bp, соответствующий промоторной области онкогена с-Мус. Ранее Zheng и др. [2] показали, что присутствие 40% полиэтиленгликоля способно индуцировать образование квадруплексных структур в составе двойной спирали ДНК. Нагревание и медленное охлаждение (отжиг) в условиях пониженной активности воды приводит к смещению равновесия и формированию G-квадруплексной структуры из двойной спирали ДНК.

Ранее на теломерной последовательности человека было показано, что взаимодействие с порфириновым производным и последующее освещение голубым светом приводит к специфичному окислению гуанинов квадруплексной структуры, в то время как двойная спираль той же последовательности подвержена окислению в меньшей степени [3]. Используя данное производное на нашей модельной системе, мы обнаружили, что после освещения наблюдается разрушение квадруплексной структуры, которое было индуцируемо отжигом в присутствии полиэтиленгликоля. Напротив, двойная спираль была подвержена окислению в меньшей степени (рис. 1).

Таким образом, мы подтвердили образование G-квадруплексной структуры промоторной области онкогена с-Мус в составе протяженной двойной спирали в условиях «молекулярного краудинга». С помощью производного порфирина мы показали возможность направленного разрушения квадруплексной структуры. Данное исследование раскрывает перспективы направленного фотоиндуцируемого повреждения ДНК промоторных областей онкогенов с помощью производных порфирина.

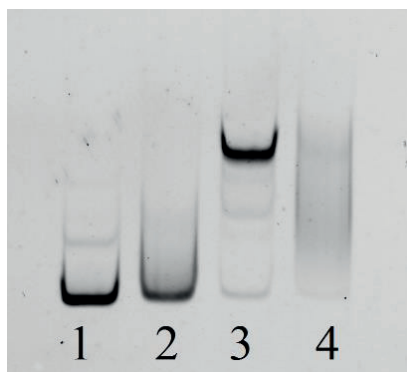


Рис. 1. Подвижность ДНК, моделирующих конформационные перестройки промоторной последовательности онкогена с-Мус: 1 – необработанная ДНК; 2 – ДНК, освещенная в течение пяти минут; 3 – отоженная ДНК; 4 – ДНК, отоженная и освещенная в течение пяти минут

Работа выполнена при поддержке гранта РНФ, проект № 16-14-10396.

Литература

1. Balasubramanian S., Hurley L.H., Neidle S. Targeting G-quadruplexes in gene promoters: a novel anticancer strategy? // *Nat Rev Drug Discov.* 2011. V. 10, N 4. P. 261–275.
2. Zheng K.W., Chen Z., Hao Y.H., Tan Z. Molecular crowding creates an essential environment for the formation of stable G-quadruplexes in long double-stranded DNA // *Nucleic Acids Res.* 2010. V. 38, N 1. P. 327–338.
3. Beniaminov A.D., Novikov R.A., Mamaeva O.K., Mitkevich V.A., Smirnov I.P., Livshits M.A., Shchyolkina A.K., Kaluzhny D.N. Light-induced oxidation of the telomeric G4 DNA in complex with Zn(II) tetracarboxymethyl porphyrin // *Nucleic Acids Res.* 2016. V. 44, N 21. P. 10031–10041.

УДК 574.24 582.29; 543.429.22; 543.423.1

Эффективность длительного мониторинга окружающей среды урбанотерритории (на примере города Долгопрудного, Московская область)

А.Г. Кузёмин, П.В. Бондаренко, С.Е. Журавлева

Московский физико-технический институт (государственный университет)

Проблемы качества окружающей среды (ОС) особенно актуальны на территориях современных мегаполисов. Воздействия различных загрязнителей оказывают комплексный эффект на всех представителей биоты. Актуальность работы состоит в том, что впервые на территории г. Долгопрудного, Московская область будет изучено изменение влияния дорожного полотна на окружающую среду после введения в эксплуатацию эстакады.

Для исследования загрязнения среды предполагается использовать лишеноиндикационный метод, основанный на изучении физических характеристик трансплантированных лишайников ЭПР- и оптико-спектрометрией. Данная методика позволяет оценить влияние антропогенной нагрузки на атмосферу. Совокупность физико-химических и биологических методов позволяет провести не только количественную оценку загрязнения, но и оценить влияние на экосистему. Воздействия поллютантов ОС на талломы лишайников вызывают снижение содержания хлорофиллов в фотобионте, деструкцию липидных мембран клеток, а также нарушение работы электронного транспорта в окислительно-восстановительной системе органелл клеток, что приводит к их гибели и образованию «лишайниковых пустынь» на урбанизированных территориях. Лишайники являются индикаторными видами широко используемыми для исследований атмосферного загрязнения, методы работы с ними хорошо изучены, поэтому лишеноиндикационный метод исследований позволит достоверно оценить антропогенную нагрузку от транспортного потока.

Методика планируемой работы была использована ранее для изучения загрязнённости окружающей среды в г. Долгопрудном, поэтому работа будет опираться на предыдущие исследования, что поможет проанализировать изменение влияния транспортного потока на атмосферу.

В качестве объекта исследования был выбран эпифитный лишайник Ксантория настенная (*Xanthoria parietina* (L.) Th. Fr.), так как этот вид является устойчивым к загрязнению и в предыдущей работе по изучению атмосферы г. Долгопрудного также использовался этот вид. Для целей трансплантации образцы лишайника на коре субстрата будут закреплены на двух пластиковых стендах: первый стенд будет помещен на двухметровой высоте от поверхности земли в фоновой зоне (55°59'3.33" с. ш. 37°30'41.16" в. д.) и второй стенд – в урбанизированной зоне (55°55'22.57" с. ш. 37°31'44.15" в. д.). Сбор лишенологического материала проводился по общепринятым методам.

Образцы талломов лишайников были собраны в фоновой зоне (вдали от крупных городов, автомагистралей, промышленных объектов) 08.10.2017 г. со стволов форофитов *Acer negundo* (L.) на западном склоне широколиственного лесного массива вдоль канала река Москва города Долгопрудного Московской области (55°56'32.71" с. ш. 37°28'53.49" в. д.). Образцы лишайников срезались вместе с корой субстрата форофита на высоте двух метров от уровня земли. Талломы лишайников собирались из одного строго ограниченного участка со сходными микроклиматическими условиями (высота дерева, диаметр ствола, вид дерева, экспозиция, наклон ствола).

Талломы лишайника весь период трансплантации должны иметь одинаковую экспозицию (одна сторона света). В естественных условиях лишайник *X. parietina* встречается в хорошо освещенных прямыми солнечными лучами местах. Интенсивность фотосинтетической системы фотобионта лишайников зависит от интенсивности освещения. В талломах лишайника *X. parietina* вырабатывается антрахиноновый оранжевый пигмент париедин, расположенный в виде мелких кристаллов в верхнем коровом слое. Он синтезируется микобионтом под воздействием средневолнового ультрафиолетового излучения (280–320 нм). Процесс синтеза стимулируется фотосинтезом, который протекает в клетках зеленой водоросли *Trebouxia*, входящей в состав лишайника. Париедин эффективно поглощает излучение в области спектра 400–500 нм, по этой причине он может участвовать в защите фотосинтетического аппарата фотобионта от интенсивного излучения.

Для исследования образцов предполагается использовать оптико-эмиссионную спектрометрию с индуктивно-связанной плазмой (ИСП-ОЭС), позволяющую определять содержание химических элементов в образцах, а так же спектроскопию электронного парамагнитного резонанса (ЭПР-спектроскопия), позволяющую фиксировать изменение физиологического состояния лишайников в зависимости от качества окружающей среды.

В работе предполагается провести оценку влияния транспортного полотна на атмосферу, сопоставив результаты данной работы с полученными в 2014 году.



Рис. 1. Исследуемый объект *X. parietina* на клёне ясенелистом (*A. negundo* L.)

УДК 620.3

Модификации магнитных наночастиц белком магнитотактических бактерий для адресной доставки лекарств к раковым клеткам

П.А. Котельникова^{1,2}, В.О. Шипунова^{1,2,3}, М.П. Никитин^{1,2,4}, С.М. Деев^{1,3}

¹Институт биоорганической химии им. академиков М. М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН

²Московский физико-технический институт (государственный университет)

³Национальный исследовательский ядерный университет «МИФИ»

⁴Институт общей физики им. А.М. Прохорова РАН

На сегодняшний день перед учеными стоит задача не только подобрать соединение для лечения или диагностики, но и доставить его точно и избирательно. Для такой адресной доставки необходимы агенты, обладающие минимальной токсичностью, но при этом максимально эффективно распознающие клетки-мишени.

Одной из основных проблем внедрения таких конструкций в диагностику и терапию является сложность их сборки, необходимость подбора индивидуальных условий и методов для каждого набора компонентов. Использование белкового модуля барназа-барстар [1] позволяет соединять функциональные компоненты в физиологических условиях с высокой специфичностью и аффинностью. Поверхностная модификация частиц белком, полученным в результате работы, поможет упростить процедуру покрытия частиц, избежать использования токсичных полимеров, повысить биосовместимость всей конструкции.

В данной работе был выделен рекомбинантный белок, объединяющий барстар и С-концевой фрагмент белка магнитотактических бактерий [2] Mms6, который *in vivo* [3], [4] и *in vitro* [5] специфично связывается с магнетитом и участвует в формировании магнитосом — органелл, отвечающих за ориентацию бактерий в магнитном поле. С помощью МТТ-теста было установлено, что полученный белок в широком диапазоне концентраций не оказывает токсичного влияния на клетки. Измерение ферментативной активности барназы в присутствии данного белка и белка барстар как контроля показало, что Bs-Mms6 связывается с барназой так же эффективно и специфично, как и барстар.

Частицы были модифицированы Bs-Mms6 без предварительного покрытия полимером и химической конъюгации. *In vitro* была продемонстрирована специфичность

сборки модуля барназа-BsMms6 на поверхности этих частиц. Частицы, покрытые BsMms6, и контрольные частицы инкубировали с конъюгатом DARPin-Bn-FITC, при различных его концентрациях. Интенсивность флуоресценции FITC у исследуемых частиц, была пропорциональна концентрации DARPin-Bn-FITC, в отличие от контрольных частиц, которые не показали значительного связывания.

Таким образом, в данной работе с помощью нового рекомбинантного белка Bs-Mms6 были модифицированы при физиологических условиях магнитные наночастицы. Полученная конструкция благодаря низкой токсичности и простоте сборки может рассматриваться как перспективный агент для тераностики.

Исследование выполнено при финансовой поддержке гранта РФФИ 17-74-20146.

Литература

1. Deyev S. M. [et al.]. Design of multivalent complexes using the barnase-barstar module // *Nature biotechnology*. 2003. Т. 21. N 12. P. 1486.
2. Blakemore R. P. Magnetotactic bacteria // *Science*. 1975. V. 190, N 4212. P. 377–379.
3. Arakaki A., Webb J., Matsunaga T. A novel protein tightly bound to bacterial magnetic particles in *Magnetospirillum magneticum* strain AMB-1 // *Journal of Biological Chemistry*. 2003. V. 278, N 10. P. 8745–8750.
4. Elfick A. [et al.]. Biosynthesis of magnetic nanoparticles by human mesenchymal stem cells following transfection with the magnetotactic bacterial gene mms6 // *Scientific reports*. 2017. V. 7.
5. Rawlings A.E. [et al.]. Ferrous iron binding key to Mms6 magnetite biomineralisation: A mechanistic study to understand magnetite formation using pH titration and NMR spectroscopy // *Chemistry-A European Journal*. 2016. V. 22, N 23. P. 7885–7894.

УДК 577.29

Исследование взаимодействия виментина с митохондриями

Л.Я. Иноземцев¹, А.А. Минин²

¹Московский физико-технический институт (государственный университет)

²Институт белка РАН

Митохондрии играют центральную роль в физиологии клеток, и регуляция их свойств различными факторами важна для нормального функционирования клеток и тканей. Недавно в нашей лаборатории было обнаружено, что белок промежуточных филаментов виментин связывает митохондрии, и при этом снижается их внутриклеточная подвижность и увеличивается мембранный потенциал. Чтобы выяснить особенности взаимодействия виментина с митохондриями мы разработали экспериментальную модель, которая основана на анализе соосаждения митохондрий, изолированных из печени крысы, с очищенным рекомбинантным виментином, экспрессированном в бактериях.

Наши данные свидетельствуют о том, что за связывание с митохондриями отвечает N-конец виментина. Мы обнаружили, что с митохондриями связана протеолитическая активность, которая приводит к частичной деградации виментина. Масс-спектрометрический анализ показал, что связанный с митохондриями протеолиз виментина приводит к потере им сначала N-, а затем C-конца. Протеолиз подавляется лейпептином, ингибитором цистеиновых протеаз. При потере N-конца связь виментина с митохондриями нарушается.

Работа выполнена при поддержке РФФИ (грант № 17-04-01775) и РФФИ (грант № 14-14-00234).

Реализация конструкций булевой логики на твердой фазе и их исследование методом спектрально-фазовой интерферометрии

А.В. Пушкарев^{1,2}, А.В. Орлов², П.И. Никитин², М.П. Никитин¹

¹Московский физико-технический институт (государственный университет)

²Институт общей физики им. А. М. Прохорова РАН

Одной из ключевых задач современной биомедицинской терапии и диагностики является создание систем, способных анализировать большое количество биологических данных для точной постановки диагноза и доставки лекарств непосредственно в очаг заболевания.

Способом решения этой задачи является создание нано- и микроагентов, способных, автоматически проанализировав содержание маркеров заболевания, принять решение о высвобождении лекарственного компонента, например, инсулина при одновременно пониженном его содержании и повышенном уровне сахара. Создание таких молекулярных конструкций позволит одновременно решать задачи, диагностики и терапии, так как подобные системы, введенные в организм, будут взаимодействовать только с поврежденными и патогенными объектами. Реализацией этой идеи умных лекарств являются супрамолекулярные структуры, способные выполнять логические операции, используя концентрации биологических молекул в качестве переменных.

Из-за аналогии с функциями булевой алгебры данные конструкции называются биоконструкциями [1]. Ранее нами были описаны молекулярные интерфейсы, основанные на наночастицах и способные выполнять различные логические операции с использованием одних и тех же анализируемых молекул [2]. Однако актуальной остается задача создания этих агентов на твердой фазе, что помимо возможности их детального изучения может позволить, например, создать новые производительные и чувствительные биосенсоры.

В настоящей работе на поверхности микроскопных покровных стекол были созданы и изучены молекулярные системы, реализующие базовые унарные логические операции «ДА», «НЕ». Единичным входным сигналом являлось наличие анализируемой молекулы в растворе, а единичным выходным – связывание целевой молекулы с поверхностью. В основе работы функции «ДА» лежит эффект экранирования целевой молекулы от взаимодействия с центрами связывания на поверхности. При наличии анализируемой молекулы в растворе экранирующий компонент вымещается с поверхности, давая к ней доступ целевой молекуле. Таким образом, единичному входному сигналу соответствует единичный выходной, а нулевому входному – нулевой выходной. Функция «НЕ» ставит единицу на выходе в соответствие ноль на входе, а ноль на входе – единицу на выходе. Это достигается путем замены экранирующего компонента на связывающий целевую молекулу, который вымещается с поверхности при наличии анализируемого вещества.

Изучение и оптимизация работы созданных молекулярных структур проводились с помощью метода спектрально-фазовой интерферометрии [3]. Он позволяет без использования каких-либо меток в реальном времени наблюдать прирост или уменьшение толщины бимолекулярного слоя на поверхности микроскопного покровного стекла, вызванное реакцией между исследуемым компонентом раствора и слоем иммобилизованных молекул. Использование этого метода позволило не только наблюдать каждую стадию работы реализованных структур, но и получить кинетические константы скоростей протекающих реакций, что является крайне важным для изучения работы созданных функций.

Было показано, что созданные «умные» слои сохраняют свою работоспособность на других (отличных от стеклянных) поверхностях. Например, структура, реализующая функцию «ДА» остается работоспособной как на поверхности стандартного 96-луночного планшета, так и на поверхности наночастиц.

Реализация умных слоев на твердой фазе позволит создавать высокопроизводительные биосенсоры, каждая элементарная ячейка которых будет способна анализировать одновременно несколько компонентов изучаемой смеси, а возможность использования безметочных методов анализа, таких, как метод спектрально-фазовой интерферометрии, — оптимизировать создаваемые булевы конструкции, например, подбирая рецепторы с наиболее подходящей аффинностью.

Литература

1. *De Silva P., Uchiyama S.* Molecular logic and computing // *Nat. Nanotechnol.* 2007. V. 2. P. 399.
2. *Nikitin M.P., Shipunova V.O., Deyev S.M., Nikitin P.I.* Biocomputing based on particle disassembly // *Nat. Nanotechnol.* 2014. V. 9. P. 716.
3. *Orlov A.V., Burenin A.G., Shipunova V.O., Lizunova A.A., Gorshkov B.G., and Nikitin P.I.* Development of immunoassays using interferometric real-time registration of their kinetics // *Acta Naturae.* 2014. V. 6. P. 85.

УДК 576.367

Создание сенсоров каспаз-3/8/9 на основе красных флуоресцентных белков

К.К. Малышевская^{1,2}, Н.Г. Гурская^{1,2}, К.А. Лукьянов^{1,2}

¹Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина
и Ю.А. Овчинникова РАН

²Нижегородская государственная медицинская академия

Апоптоз, или программируемая клеточная гибель — естественный процесс уничтожения клеток [1]. Апоптоз является одним из ключевых событий, которые необходимо отслеживать при развитии раковой опухоли, а также для мониторинга лекарственных воздействий на неё. Идентифицировать апоптотическую гибель раковой клетки можно с помощью генетически кодируемых сенсоров активности различных участников апоптоза.

Для выявления активации апоптотических каскадов можно отслеживать активности различных компонентов апоптоза, например апоптотических каспаз (особая группа протеаз — ферментов, расщепляющих белки) [2]. Частой мишенью является каспаза-3, которая играет центральную роль в активации апоптоза как по внешнему, так и по внутреннему сигнальному пути. Сейчас уже получено несколько вариантов сенсоров каспазы-3 на основе FRET между флуоресцентными белками разных цветов, сигнал которых можно наблюдать как с помощью обычного флуоресцентного имиджинга (по интенсивности сигналов донора и акцептора), так и с помощью FLIM-имиджинга (по возрастанию времени жизни флуоресценции донора) [3].

Однако возможность использования таких сенсоров в опухолевых *in vivo* моделях нередко бывает весьма ограничена. Чаще всего это связано с низкой проницаемостью биологических тканей для большей части света видимого спектра. Длинноволновой свет лучше проникает в биологические ткани, поэтому рационально использовать красные и дальнекрасные флуоресцентные белки.

Ранее был получен флуоресцентный FRET-сенсор, содержащий в качестве донора красный GFP-подобный белок mKate, а в качестве акцептора — инфракрасный белок iRFP. Линкер между этими белками содержит специфический сайт DEVD, который узнается и разрезается каспазой-3 [4].

Для расширения специфичности в полипептидный линкер дополнительно к сайту DEVD был введен сайт LEHD, который узнается и разрезается каспазами-8/9. Таким образом на основе сенсора каспазы-3 был сконструирован сенсор каспаз-3/8/9. Каспаза-8 и каспаза-9 в ходе развития апоптоза активируются раньше, чем каспаза-3, поэтому такая конструкция обеспечивает ранний ответ, то есть позволяет детектировать индукцию каспаз-зависимого апоптоза на более ранних стадиях развития клеточной смерти.

Использование других флуоресцентных белков может позволить новые сенсоры с улучшенными свойствами. За последние несколько лет опубликован ряд работ, описывающих новые, более яркие и стабильные белки красного и инфракрасного спектров [5], [6]. Чтобы добиться увеличения яркости и динамического диапазона сенсора, используются новые флуоресцентные белки из недавно опубликованных работ: красный белок mScarlet в качестве FRET-донора, и ближне-инфракрасный белок miRFP в качестве FRET-акцептора.

Работа поддержана Российским научным фондом (грант 14-25-00129).

Литература

1. Taylor R.C., Cullen S.P., Martin S. J. Apoptosis: controlled demolition at the cellular level // Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 2008. V. 9(3). P. 231–241.
2. McStay G.P., Salvesen G.S., Green D.R. Overlapping cleavage motif selectivity of caspases: implications for analysis of apoptotic pathways // Cell Death Differ. 2008. V. 15(2). P. 322–331.
3. Shcherbo D., Souslova E.A., Goedhart J., Chepurnykh T.V., Gaintzeva A., Shemiakina I.I., Gadella T.W., Lukyanov S., Chudakov D.M. Practical and reliable FRET/FLIM pair of fluorescent proteins // BMC Biotechnol. 2009. V. 25 P. 9–24.
4. Zlobovskaya O.A., Sergeeva T.F., Shirmanova M.V., Dudenkova V.V., Sharonov G.V., Zagaynova E.V., Lukyanov K.A. Genetically encoded far-red fluorescent sensors for caspase-3 activity // BioTechniques. 2016. V. 60(2). P. 62–68.
5. Filonov G.S., Piatkevich K.D., Ting L.M., Zhang J., Kim K., Verkhusha V.V. Bright and stable near-infrared fluorescent protein for in vivo imaging // Nat Biotechnol. 2011. V. 17. P. 757–761.
6. Bindels D.S., Haarbosch L., van Weeren L., Postma M., Wiese K.E., Mastop M. mScarlet: a bright monomeric red fluorescent protein for cellular imaging // Nat Methods. 2016. V. 21.

УДК 577.29:575.89

Эволюционно-структурный анализ гена BLGT_02875 у *B. longum subsp. longum* GT15 и его ортологов у бифидобактерий

А.В.Елизарова^{1,2}, М.С.Чекалина², В.Н. Даниленко²

¹Московский физико-технический институт (государственный университет)

²Институт общей генетики Н.И. Вавилова РАН

Наибольшее количество микроорганизмов в организме человека приходится на желудочно-кишечный тракт (75–78%). Микробиота ЖКТ синтезирует большое количество продуктов, которые участвуют в метаболизме организма хозяина и влияет на функционирование систем органов. Микробиоту именуют новым эндокринным органом [1]. Состав микробиоты оказывает влияние на состояние здоровья и играет важную роль в поддержании гомеостаза.

Род *Bifidobacterium* является важной группой комменсалов, насчитывает 45 видов из организмов человека, животных, птиц и насекомых. Известно, что бифидобактерии составляют до 90% микробиоты кишечника младенца и 1–3% для здорового взрослого [2].

Механизмы, позволяющие бактериям, входящим в состав облигатной комменсальной микробиоты, и, в частности, бифидобактериям адаптироваться к факторам занимаемой экологической ниши в организме хозяина под давлением иммунной системы, остаются неизученными.

Системы сигнальной трансдукции обеспечивают связь бифидобактерий с внешней средой, представленной организмом хозяина, и могут быть потенциальными участниками формирования механизмов адаптации. Однокомпонентные сигнальные системы прокариот, представленные серин-треониновыми протеинкиназами (СТПК), обеспечивают передачу сигнала путем обратимого фосфорилирования белков [3]. Ранее коллективом лаборатории были идентифицированы и охарактеризованы шесть СТПК (Pkb1-6) в геномах бифидобактерий. СТПК Pkb2 была позиционирована авторами как видоспецифическая в связи с низким уровнем межвидовой гомологии по сравнению с другими СТПК

бифидобактерий [4]. Факторами, обеспечивающими быструю дивергенцию, могут являться конкурентные отношения с другими обитателями экологической ниши, давление со стороны иммунной системы хозяина и др. Авторы установили также консервативный характер ближайшего генетического окружения гена *pkb2*, в частности, наличие генов, кодирующих белок, содержащий фибронектиновые домены и мотивы, характерные для цитокиновых рецепторов, Мох-R-подобную АТФазу и других [4]. Консервативность генетического окружения *pkb2* внутри рода косвенно указывает на возможность совместного функционирования и, как следствие, коэволюции данных генов.

В рамках данной работы был проведен анализ межвидовой гомологии гена, кодирующего вышеупомянутую АТФазу, и установлен сходный уровень межвидовой идентичности аминокислотных последовательностей. Работа сфокусирована на изучении причин дивергенции данного гена и поиске сайтов, находящихся под давлением отбора, что, в свою очередь, позволит дополнить функциональную аннотацию АТФазы. Актуальность работы заключается в классификации, изучении характера эволюции и функциональной аннотации вышеупомянутой АТФазы, которая потенциально может участвовать, совместно со своими функциональными партнерами, в формировании механизмов адаптации к факторам занимаемой экологической ниши в организме хозяина под давлением иммунной системы.

В результате эволюции в течение длительного времени возможно два исхода: мутация может быть зафиксирована либо потеряна. Несинонимичные замены могут находиться под давлением отбора. В современной эволюционной биологии для определения воздействия отбора и его характера используют соотношение $\omega = \frac{dN}{dS}$, где dN и dS – расстояния между ортологичными генами в филогенетике, их оценивают из выравнивания последовательностей. Большинство несинонимичных замен в кодирующих участках отрицательно влияет на структуру и функции белка. В результате $\omega < 1$ для большинства генов. При положительном отборе $\omega > 1$. Однако, он редко имеет место сразу во многих кодонах гена и во всей филогении. Обычно наблюдается в конкретном регионе и только для некоторых видов. Тогда для всего гена величина возможно незначительно, но сдвинута в сторону 1. Разработано множество моделей, способных обнаружить все эти сценарии. В данной работе оценка параметра ω для наблюдаемых данных (последовательности гена, кодирующего АТФазу, и реконструированное филогенетическое дерево) была произведена в программе CODEML (пакет PAML) [5] для моделей, позволяющих параметру ω варьироваться между различными сайтами, а также между ветвями филогении. Часть моделей допускает положительный отбор, часть не допускает. По полученной вероятности наблюдения данных на входе при заданной модели и сгенерированных программой параметрах были проведены тесты отношения правдоподобия.

В результате работы создана база данных гена, кодирующего рассматриваемую АТФазу, из 253 штаммов рода *Bifidobacterium*. Было обнаружено, что у вида *Bifidobacterium breve* данный ген в ходе эволюции слился с соседним геном, который содержит фибронектиновый домен и мотив цитокинового рецептора, и входит в консервативное окружение гена, кодирующего протеинкиназу Pkb2 у бифидобактерий (43 из 253 последовательностей базы данных). С использованием кластерного анализа было показано, что данная АТФаза принадлежит семейству белков МохR и подклассу MRP (МохR Proper). Данные об изученных представителях этого подкласса позволяют сделать предположение о том, что эта АТФаза участвует в процессе инсерции ионов металла либо какого-либо кофактора в другой белок. При проведении сравнительного структурного анализа показано, что домен рассматриваемой AAA+ АТФазы содержит все характерные мотивы первичной структуры: Walker A, Walker B, Sensor-1, аргининовый палец. Был проведен анализ молекулярной эволюции гена, кодирующего эту АТФазу, представителей рода *Bifidobacterium* путём сопоставления имеющихся данных о гене с моделями, реализованными в программе CODEML, и статистического анализа полученных в программе параметров. Проведенные тесты на проверку гипотез о воздействии положительного отбора на отдельные ветви филогении/сайты показали, что нет

достаточных оснований утверждать, что на ген как в целом, так и эпизодически, воздействует положительный отбор. Однако были выявлены ветви филогении, находящиеся под влиянием ослабленного отрицательного отбора. Было показано, что часть таких сайтов приходится на функциональную область белка – домен AAA+. В некоторых ветвях дерева существуют сайты под ослабленным отрицательным отбором в консервативных мотивах домена, участвующих в функционировании белка. Во всех выявленных ветвях есть сайты, пришедшие на N- и C-концевые области домена AAA+. Известно, что в этих областях расположены характерные для белков AAA+ элементы третичной структуры.

Данная работа является частью исследования гена *pkb2* и его генетического окружения коллективом сотрудников лаборатории, нацеленного на изучение механизмов адаптации бифидобактерий к факторам занимаемой экологической ниши в организме хозяина.

Литература

1. Clarke G., Stilling R.M., Kennedy P.J., Stanton C., Cryan J.F., Dinan T.G. Gut microbiota: the neglected endocrine organ // *Mol Endocrinol*. 2014. V. 28, N 8. P. 1221–1238.
2. Turroni F., Peano C., Pass D.A., Foroni E., Severgnini M., Claesson M.J. [et al.]. Diversity of bifidobacteria within the infant gut microbiota // *PLoS One*. 2012. V. 7, N 5. P.e36957.
3. Ulrich L.E., Koonin E.V., Zhulin I.B. One-component systems dominate signal transduction in prokaryotes // *Trends Microbiol*. 2005. V. 13, N 2. P. 52–56.
4. Nezametdinova V.Z., Zakharevich N.V., Alekseeva M.G., Averina O.V., Mavletova D.A., Danilenko V.N. Identification and characterization of the serine/threonine protein kinases in *Bifidobacterium*. // *Arch Microbiol*. 2014. V. 196, N 2. P. 125–136.
5. Yang Z. PAML 4: phylogenetic analysis by maximum likelihood // *Mol Biol Evol*. 2007. V. 24, N 8. P. 1586–1591.

УДК 57.088.5

Оценка качества результатов белковой масс-спектрометрии

М.А. Пашкова¹, И.А. Алтухов¹, Д.М. Мошенский²

¹Московский физико-технический институт (государственный университет)

²Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова

Последние годы существует потребность в оценке качества масс-спектрометрических данных. На данный момент существует множество инструментов, предназначенных для этой цели [1]. Нами была предпринята попытка создания инструмента, лишённого недостатка предшественников, для быстрой оценки качества масс-спектров.

Создана программа для оценки качества данных белковой масс-спектрометрии (LC-MS/MS). Программа принимает на вход файл в одном из форматов данных масс-спектрометрии (.mzXML). Оценка качества спектров проводится непосредственно по сырым данным, а также по результатам белковой идентификации, которая осуществляется программой X!Tandem.

Качество данных определяется с помощью ряда метрик (например, максимальная частота сканирования в каждую минуту измерения, накопление белковых групп от времени удерживания на хроматографической колонке, распределение отношения массы к заряду родительских ионов). Программа рассчитывает 4 метрики по сырым данным, 12 — по результатам идентификации.

Также для сокращения времени анализа была создана дополнительная программа, которая прореживает масс-спектры. Принцип её работы основан на гипотезе о том, что по прореженным данным можно с достаточной точностью определять качество исходных данных. Сейчас эта гипотеза проверяется нами на различных масс-спектрах.

В дальнейшем планируется использовать данную программу для анализа большого количества существующих данных разного качества, чтобы определить значимость каждой метрики в оценке качества. Это поможет определить вес каждой метрики в общей оценке, которую программа присваивает масс-спектру.

Литература

1. *Bittremieux W. [et. al.]. Computational quality control tools for mass spectrometry proteomics // Proteomics. 2016. V. 17. P. 3–4.*

УДК 577.25

Разработка красного кальциевого сенсора, имеющего в качестве новой сенсорной части кальмодулин из грибов *S. cerevisiae****Е.С. Чефанова^{1,2}, Н.В. Барыкина¹, О.М. Субач^{1,2}, Г.Н. Ениколопов¹, Ф.В. Субач¹***¹Московский физико-технический институт (государственный университет)²Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт»

Ионы кальция (Ca^{2+}) выполняют функцию универсальной сигнальной молекулы в живых организмах. Процессы проведения импульса в нейронах сопровождаются изменением концентрации ионов Ca^{2+} . Генетически-кодируемые флуоресцентные кальциевые индикаторы (ГККИ) нашли широкое применение для визуализации активности нейронов в мозге за счёт отсутствия проблем с доставкой в клетки и возможности специфического мечения отдельных клеточных популяций. На данный момент разработан ряд ГККИ, способных изменять уровень своей флуоресценции в зависимости от концентрации ионов Ca^{2+} , и таким образом визуализировать активность нейронов. Эти сенсоры имеют различные характеристики, такие как контраст, яркость, кинетика и т. д. Несмотря на большой ряд ГККИ, сенсорная часть самых популярных ГККИ ограничена исключительно кальций-связывающим белком — кальмодулином из животных, который у большинства многоклеточных животных имеет идентичную последовательность, начиная от человека и заканчивая червем. За счёт этого ГККИ могут взаимодействовать с эндогенными белками нейрональной клетки, такими как кальмодулин и др., и нарушать функционирование нейронов. Мы обнаружили, что кальмодулин из грибов *Saccharomyces cerevisiae* имеет 43% аминокислот, отличных от таковых для кальмодулина из многоклеточных животных. Мы решили разработать сенсоры на основе кальмодулина из грибов *S. cerevisiae*, предполагая, что такие сенсоры могут не взаимодействовать с компонентами нейрональной клетки и иметь другие характеристики по сравнению с имеющимися ГККИ. Для этого была получена бактериальная библиотека, экспрессирующая мутанты ГККИ, в которой варьировали линкеры между флуоресцентной частью на основе циркулярно-пермутированной версии красного флуоресцентного белка *srpApple* и кальмодулином из грибов *S. cerevisiae*. Библиотека была проанализирована вначале на чашках Петри с помощью флуоресцентного стереомикроскопа. Затем наиболее контрастные мутанты были очищены и охарактеризованы на планшетном ридере и спектрофлуориметре. Таким образом, были найдены первые мутанты, реагирующие на добавление Ca^{2+} увеличением красной флуоресценции на 90%. В будущем улучшенный вариант, а именно, мутант с увеличенным контрастом и яркостью, красного ГККИ с кальмодулином из грибов *S. Cerevisiae* позволит визуализировать активность нейронов мозга мыши в режиме реального времени, не оказывая влияния на функцию нейронов.

Работа поддержана грантами РНФ № 16-15-10323 и РФФИ № 15-04-03383.

УДК 615.281.9

Разработка новых антибактериальных молекул и изучение механизма их действия

Е.В. Дейнека¹, И.А. Остерман², Я.А.Иваненков^{2,3}

¹Московский физико-технический институт (государственный университет)

²Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова

³Институт биохимии и генетики Уфимского научного центра РАН

Введение. Одной из наиболее актуальных проблем современной науки является резистентность бактерий по отношению к антибиотикам. Около 50-ти лет назад казалось, что человечество навсегда победило бактериальные инфекции и будет хорошо защищено уже существующими антибиотиками. Несмотря на то, что большое количество бактерий может быть убито лекарством, малая доля особо устойчивых популяций получает ресурсы на дальнейшее стремительное размножение. Все это заставляет задуматься о возможности новых эпидемий и необходимости дальнейшего исследования инфекционных болезней. Поэтому научное сообщество ищет новые пути борьбы с вредоносными бактериями и, следовательно, новые антибиотические агенты.

Описание метода. В настоящей работе исследуются антибиотики, действующие на биосинтез белка, а именно трансляционные ингибиторы. Изучение основывается на ранее разработанном репортерном штамме pDualrep2 ΔtolC, который успешно применяется при высокопроизводительном скрининге библиотек различных химических соединений [1].

Репортерная система представляет собой штамм *Escherichia coli*, трансформированный плазмидой, в которой закодирован флюоресцентный белок Katushka2S. Перед геном Katushka2S расположен генетически модифицированный аттенуаторный участок триптофанового оперона *E. coli*. Бактерия использует аттенуатор для контроля эффективности трансляции лидерного пептида, содержащего два триптофановых кодона подряд. При недостатке триптофана рибосома замедляется, и вторичная структура синтезируемой РНК делает возможной транскрипцию генов биосинтеза триптофана, расположенных в геноме следом за аттенуаторной областью. В репортерной конструкции триптофановые кодоны заменены на эффективно прочитываемые аланиновые. Только остановка рибосомы антибиотиками может способствовать прохождению РНК полимеразы через аттенуаторную область, за которой в репортерной конструкции располагается ген Katushka2S (рис. 1) [2].

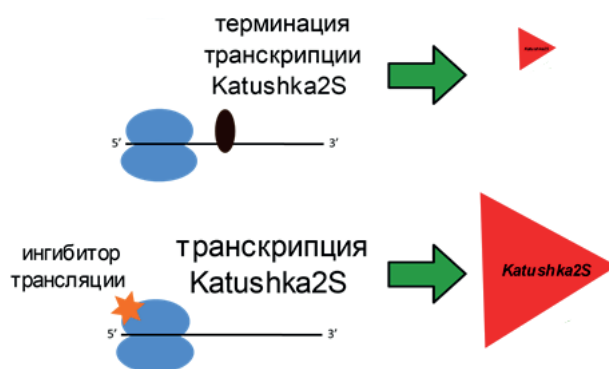


Рис. 1. Работа репортерной системы

Таким образом, вокруг области ингибирования, возникшей под действием антибактериального препарата, в том месте, где концентрация антибиотика сублетальна, происходит индукция гена Katushka2S. Экспрессия этого гена хорошо заметна визуально по образованию вокруг зоны ингибирования кольца, флюоресцирующего красным цветом. На рис. 2 представлен образец положительного контроля.

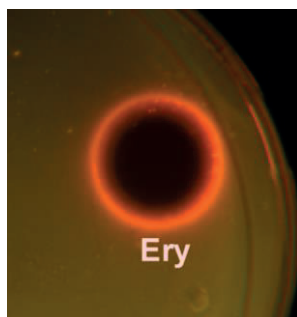


Рис. 2. Индукция флуоресцентного белка Katushka2S (обозначен красным псевдоцветом) в присутствии ингибирующего трансляцию антибиотика эритромицина (Ery). Растворитель диметилсульфоксид

Таким методом была протестирована библиотека органических соединений, предоставленных «ЗАО ИИХР», и были обнаружены молекулы, относящиеся к классу *N*-пиридилил замещенных амидов пара- и мета- карбоксипиперидинов, представители которого обладают свойствами трансляционных ингибиторов.

Результаты. На основе детального анализа указанного класса соединений были выделены структурные признаки, отвечающие за антибактериальную активность. Некоторые молекулы имели незначительные структурные различия, однако их активность существенно отличалась. На основании этого был оценен вклад различных групп в процесс ингибирования. Наиболее активное вещество из вышеупомянутого класса представлено на рис. 3.

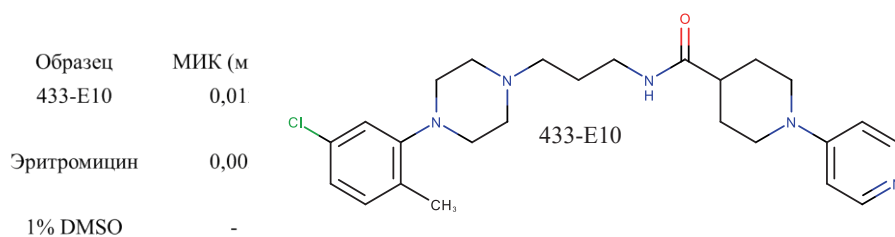


Рис. 3. Молекула-хит из класса *N*-пиридилил замещенных амидов пара- и мета- карбоксипиперидинов и значение ее минимальной ингибирующей концентрации (МИК) в сравнении с эритромицином

Полученные результаты имеют значительную роль в осознании механизмов действия ингибиторов. Данные о взаимосвязи структура-активность способствуют усовершенствованию существующих антибактериальных агентов с целью повышения их активности. В дальнейшем планируется протестировать новый класс молекул, синтезированных на основе полученных знаний.

Коллектив авторов благодарит Министерство образования и науки Российской Федерации, грант № 20.9907.2017/VU, и Российский научный фонд, грант № 17-74-30012 (ИБГ РАН).

Литература

1. Osterman I.A., Prokhorova I.V., Sysoev V.O., Boykova Y.V., Efremenkova O.V., Svetlov M.S., Kolb V.A., Bogdanov A.A., Sergiev P.V., Dontsova O.A. Attenuation-based dual-fluorescent-protein reporter for screening translation inhibitors // *Antimicrob. Agents Chemother.* 2012 V. 56 P. 1774–1783.
2. Сергеев П.В., Остерман И.А., Головина А.Я., Андреянова Е.С., Лантев И.Г., Плетнев Ф.И., Евфратов С.А., Марусич Е.И., Веселов М.С., Леонов С.В., Иваненков Я.А., Богданов А.А., Донцова О.А. // Высокопроизводительная платформа для скрининга новых ингибиторов биосинтеза белка // *Вестн. Моск. Ун-та. Сер. 2. Химия.* 2015. Т. 56, № 6 С. 405–408

Эффект актин-связывающих бициклических пептидов на актиновый цитоскелет *in vivo*

А.Т. Арутюнян¹, Kumeta Masahiro², Yoshimura Shige H.²

¹Московский физико-технический институт (государственный университет)

²Киотский университет

Актин является одним из основных компонентов цитоскелета в клетках эукариот и отвечает за размер, форму и движение клеток. Первичный контроль функциональности актина достигается путем регулирования его динамики полимеризации/деполимеризации, которая опосредована многими актин-содержащими факторами *in vivo*. Ранее был разработан актин-связывающий пептид с использованием актин-связывающего домена белка Thymosin-β4, сшитого с бициклическим пептидом (BcP) путем итерационного отбора по аффинности [1]. Было показано, что этот BcP предпочтительно связывается с мономерным актином *in vitro*, однако его эффект *in vivo* еще не был подробно описан. В этой работе была использована флуоресцентная микроскопия (конфокальный сканирующий лазерный микроскоп Olympus FV1200) для исследования влияния BcP на актиновый цитоскелет и адаптивные клеточные реакции на механические стрессы.

Цель состояла в том, чтобы пронаблюдать влияние бициклических пептидов на актин *in vivo* и, кроме того, исследовать, как клетки реагируют на различные типы стресса после воздействия со стороны пептида. План заключался в том, чтобы подвергнуть клетки механическому стрессу (путём растяжения силиконовой подложки, на которой клетки предварительно росли) и посмотреть, что происходит с цитоскелетом и организацией клеточного актина в целом, например, при формировании стрессовых волокон и филоподий, а также пронаблюдать изменения во времени отклика клеток на механический стресс.

Для исследования эффективности ингибирования полимеризации актина клетки HeLa были инкубированы в течение двух часов с бициклическим пептидом reGR4 (раствор в ДМСО), зафиксированы 4%-PFA, сделаны проницаемыми и окрашены родамин-фаллоидином.

Был проведён эксперимент по выращиванию клеток HeLa в силиконовой камере и их растяжению для наблюдения за реакцией клеток на механический стресс после добавления контрольного бициклического пептида reRG8. Также принималось во внимание изменение площади поверхности клеток, адгезированных на подложке.

Добавление обоих BcP (reRG4 и reRG8) привело к резкому сокращению волокон F-актина в клетках, окрашенных фаллоидином. Интродукция reRG4, который обладает в 100 раз большей аффинностью к актину, чем reRG8, показала более сильное ингибирование. Чтобы лучше понять влияние BcP на клетки, лучше использовать растворитель, отличный от ДМСО, так как последний оказывает определенное влияние на актиновый цитоскелет сам по себе. Наблюдалась явная отрицательная корреляция между интенсивностью сигнала от BcP и актиновых структур. Бициклические пептиды, похоже, не давали большинству основанных на F-актине структур собираться. Клетки, инкубированные с BcP, связывались с маркером клеточной смерти (DAPI), но выглядели здоровыми на фазово-контрастных изображениях, тогда как морфологически неиндуцированные клетки были более повреждены. Индуцированные BcP клетки не увеличивали свою площадь после растяжения подложки, в то время как неиндуцированные клетки значительно расширились в ответ на механический стресс. Этот результат предполагает, что BcP препятствует нормальному клеточному ответу на механический стресс

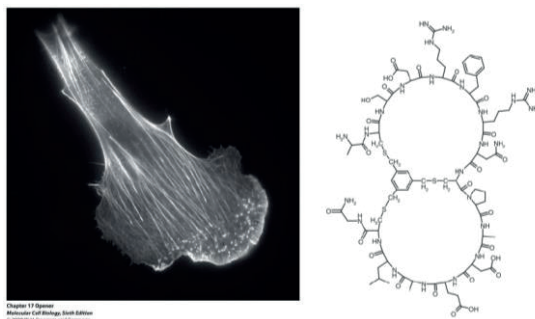


Рис. 1. Мигрирующая клетка, окрашенная F-актин-связывающим агентом (слева); химическая структура макроциклического ингибитора калликреина [1] (справа)

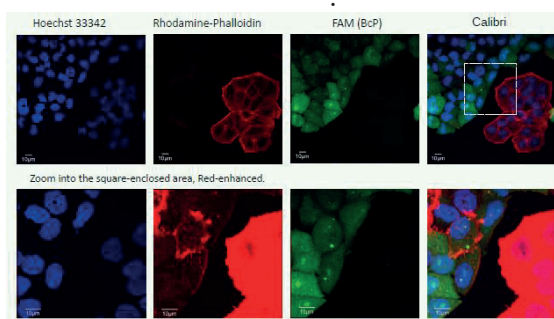


Рис. 2. Изображения клеток HeLa, окрашенных F-актин-связывающим родамин-фаллоидином; также окрашены ядра клеток (краситель Hoechst33342) и бициклический пептид (краситель FAM)

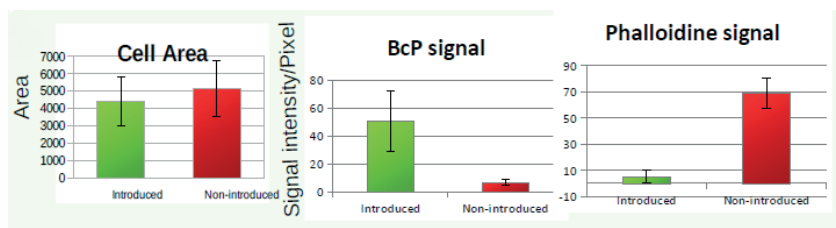


Рис. 3. Диаграммы, показывающие соотношение общей площади, занятой клетками, подвергшимся воздействию пептида, и клетками, не подвергшимися его воздействию

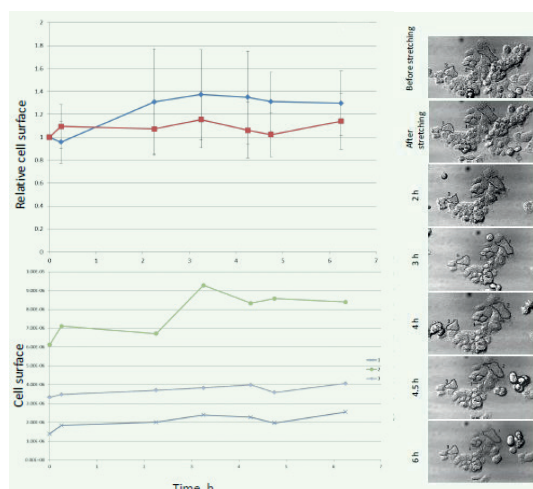


Рис. 4. Графики, представляющие среднее изменение площади клетки по отношению к её размеру перед растяжением (синий и красный для необработанных и обработанных клеток соответственно, слева) и динамика отдельных клеток во времени (справа)

Литература

1. *Heinis C., Rutherford T., Freund S., Winter G.* Phage-encoded combinatorial chemical libraries based on bicyclic peptides // *Nature Chemical Biology*. V. 5. 2009. P. 502–507.

УДК 577.29

Сравнительное изучение мутантных вариантов фактора транскрипции KLF11 при моногенных формах диабета

А.И. Кузнецова¹, Т.С. Краснова², А.С.Орехова², П.М. Рубцов^{1,2}

¹Московский физико-технический институт (государственный университет)

²Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН

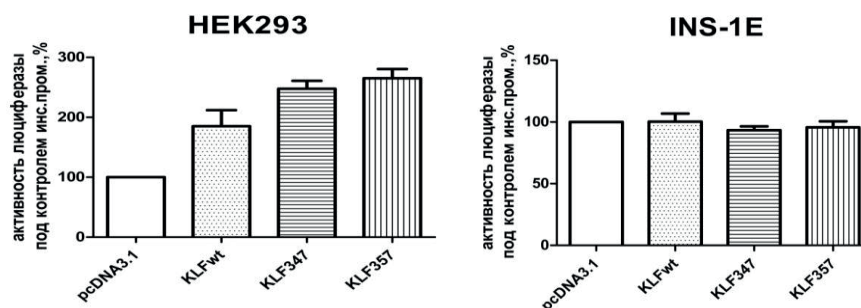
MODY (Maturity Onset Diabetes of the Young) – сахарный диабет взрослого типа у молодых – это гетерогенное аутосомно-доминантное наследственное заболевание, обусловленное дефектами в функционировании β -клеток поджелудочной железы [1]. Известно 13 типов диабета MODY, вызванных мутациями в 13 разных генах. В данной работе изучена новая мутация в гене транскрипционного фактора (ТФ) KLF11. KLF11 участвует в регуляции инсулинового промотора в β -клетках, взаимодействуя с другими факторами: p300 и PDX-1. Фактор p300 является коактиватором и связующим звеном между KLF11 и PDX-1 [2]. У пациентов с MODY7 ранее была обнаружена мутация Ala347Ser, изменяющая активность KLF11 [3]. Эта мутация ведет к замене аминокислоты в эволюционно консервативном домене TRD3, который участвует в белок-белковых взаимодействиях с рецепторами, сопряженными с G-белками (GPCR), при активации которых происходит транслокация G β 2-субъединицы (GNB₂) в ядро и связывание ее с KLF11. Мутация Ala347Ser препятствует связыванию белков, что влияет на метаболизм клетки и может стать причиной уменьшения секреции инсулина [4]. При секвенировании гена KLF11 у больного с симптомами MODY была обнаружена новая мутация Asn357Ser, которая затрагивает тот же эволюционно-консервативный домен TRD3 [5].

Для проверки влияния мутации на взаимодействие KLF11 с его белковым партнером GNB₂ были получены конструкции, содержащие кДНК фактора транскрипции KLF11 дикого типа и двух мутантных вариантов, обеспечивающих экспрессию этих белков, слитых с флуоресцентным белком EGFP, и конструкция, содержащая ген GNB₂ для экспрессии белка слитого с полигистидиновым тэгом (His6). После котрансфекции клеток НЕК293 полученными плазмидами лизаты клеток инкубировали с магнитными частицами, содержащими никелевый сорбент, связывающий His6. Связавшийся с сорбентом образовавшийся белковый комплекс анализировали с помощью электрофореза в полиакриламидном геле и иммуоблоттинга с антителами к EGFP и His. Полученные результаты подтверждают экспрессию KLF11 и His-GNB₂ в клетках НЕК293. Однако анализ их взаимодействия затруднен из-за неспецифического взаимодействия EGFP с магнитными частицами.

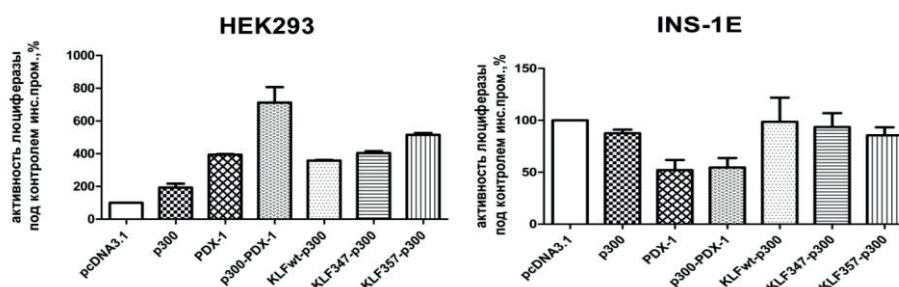
Ранее было показано, что в клетках НЕК293 экспрессия KLF11 индуцируется высокими концентрациями глюкозы. KLF11 способен связываться с GC-богатой последовательностью в промоторе гена инсулина и повышать его активность [2]. В клеточной линии инсулиномы INS-1E при высокой концентрации глюкозы снижается уровень экспрессии эндогенной мРНК KLF11 и активность инсулинового промотора [6]. Для изучения влияния новой мутации на транскрипционную активность мы провели котрансфекцию клеток НЕК293 и INS-1E плазмидой, содержащей репортерный ген люциферазы под контролем инсулинового промотора, и разными комбинациями плазмид, обеспечивающих экспрессию белков p300, KLF11 дикого типа и его мутантных вариантов и PDX-1 (рис. 1). Установлено, что KLF11 дикого типа и оба мутантных варианта незначительно повышают уровень экспрессии люциферазы в клетках НЕК293 и понижают в клетках INS-1E. При совместной экспрессии p300 и KLF11 активность промотора повышается в обеих системах, а при действии KLF11 или его мутантных вариантов в

комбинации с p300 и PDX-1 активность инсулинового промотора значительно повышается в клетках HEK293 и понижается в INS-1E. Таким образом, обнаружено сходное действие известного ранее мутантного варианта KLF11 Ala347Ser и нового варианта Asn357Ser на активность инсулинового промотора в рамках одного типа клеток. Подтверждены ингибирующее действие KLF11 на активность инсулинового промотора в клетках инсулиномы и зависимость его функционирования от взаимодействия с еще одним фактором транскрипции, специфичным для β -клеток, – PDX-1.

a)



б)



в)

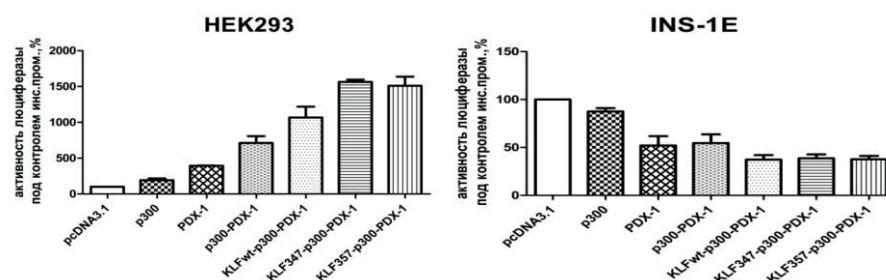


Рис 1. Анализ влияния KLF11 и его мутантных вариантов на экспрессию репортерного гена люциферазы под контролем инсулинового промотора в системе временной экспрессии генов в клетках человека

Работа выполнена при частичной поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект №16-34-00930).

Литература

1. Vaxillaire M., Froguel P. Monogenic diabetes of the young, pharmacogenetics and relevance to multifactorial forms of type 2 diabetes // *Endocr. Rev.* 2008. V. 29. P. 254.
2. Perakakis N. [et al.]. Human Krüppel-like factor 11 differentially regulates human insulin promoter activity in β -cells and non- β -cells via p300 and PDX1 through the regulatory sites A3 and CACCC box // *Mol. Cell. Endocrinol.* 2012. V. 363. P. 20.
3. Neve B. [et al.]. Role of transcription factor KLF11 and its diabetes-associated gene variants in pancreatic beta cell function // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2005. V. 102. P. 4807.
4. Lomberk G. [et al.]. Krüppel-like factor 11 regulates the expression of metabolic genes via an evolutionarily conserved protein interaction domain functionally disrupted in maturity onset diabetes of the young // *J. Biol. Chem.* 2013. V. 288. P. 17745.

5. Краснова Т.С. [и др.]. Идентификация и функциональный анализ новой мутации в гене фактора транскрипции KLF11, вызывающей диабет MODY// Мед. Акад. Журнал. 2006. № 4. С. 221.
6. Niu X. [et al.]. Human Krüppel-like factor 11 inhibits human proinsulin promoter activity in pancreatic beta cells // Diabetologia. 2007. V. 50. P. 1433.

УДК 681.787

4Pi микроскоп: метод локализации единичных молекул

Е.В. Буглакова¹, Yiming Li², J. Ries²

¹Московский физико-технический институт (государственный университет)

²Европейская молекулярно-биологическая лаборатория

Флуоресцентная микроскопия сверхвысокого разрешения, широко используемая в структурной биологии, позволяет преодолеть дифракционный предел и достичь разрешения в 20–30 нм в латеральном направлении. Однако в аксиальном направлении разрешение как правило в 5–7 раз хуже, что связано с формой функции рассеяния точки (point spread function). Одним из решений этой проблемы является конструкция 4Pi-микроскопа [1], в котором флуоресценция собирается двумя объективами и интерферирует на детекторе. Однако достижение высокого разрешения невозможно без знания формы PSF.

$$PSF(x, y, z, \varphi) = I(x, y, z) + A(x, y, z) \cos(2kz + \varphi) + B(x, y, z) \sin(2kz + \varphi). \quad (1)$$

Рассматривая интерферирующие лучи как гауссовы пучки с волновым фронтом, плоским вблизи фокуса, в данной работе удалось описать интерференционную PSF формулой (1), где φ – относительная фаза, I , A и B – эмпирические коэффициенты, получаемые в процессе калибровки микроскопа. Эта формула является удобным представлением PSF, так как, с одной стороны, включает в себя экспериментально полученные коэффициенты и таким образом позволяет учесть aberrации и особенности конкретного микроскопа, с другой — явно задаёт зависимость формы PSF от относительной фазы. Корректность данного представления PSF для различных aberrаций была проверена с помощью симуляций на языке Matlab.

В каждом биологическом образце содержится несколько тысяч флуорофоров. На изображении, полученном с микроскопа, каждый флуорофор представляется xy -срезом PSF. Этот срез содержит информацию о точных x , y и z координатах и об относительной фазе между интерферирующими лучами. Ранее в лаборатории была разработана программа, позволяющая находить координаты флуорофоров для изображений, полученных с помощью PALM и STORM микроскопов с одним объективом, используя метод максимального правдоподобия. В данной работе эта программа была модифицирована для обработки изображений 4Pi-микроскопа. Был разработан следующий алгоритм нахождения точных координат: сначала, исходя из экспериментальных данных, необходимо рассчитать матрицы I , A , B , затем построить по ним кубические сплайны и составить функцию правдоподобия с учётом пуассоновского шума sCMOS матрицы детектора и модельной функции (1). После этого функция правдоподобия максимизируется методом Левенберга–Марквардта. С помощью симуляций было показано, что, используя данный метод, можно достичь высокой точности определения координат (до нескольких нанометров) и даже при маленьком числе фотонов приблизиться к теоретической границе для данного класса методов [2], задаваемой неравенством Рао–Крамера.

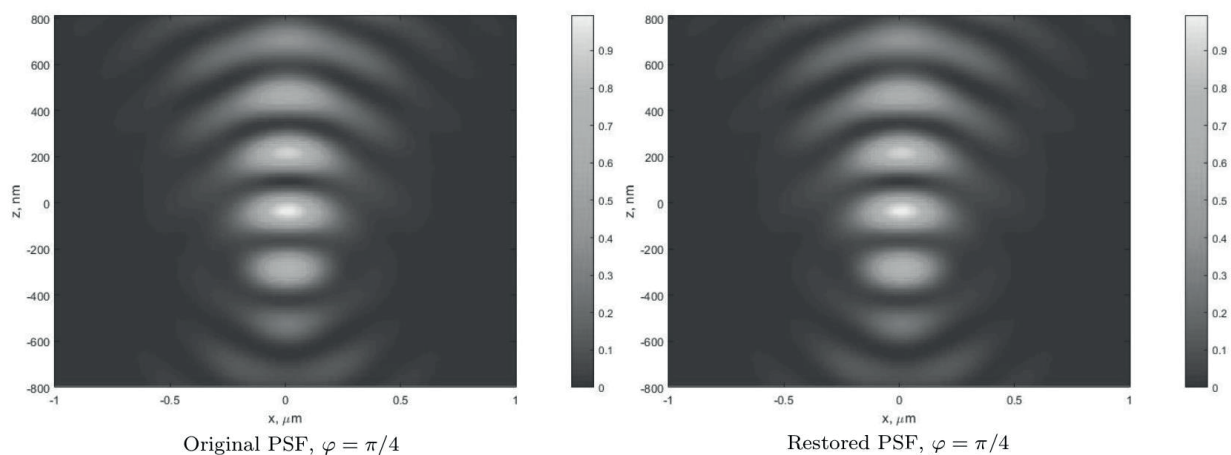


Рис. 1. Интерференционная PSF и PSF, полученная с использованием формулы (1).

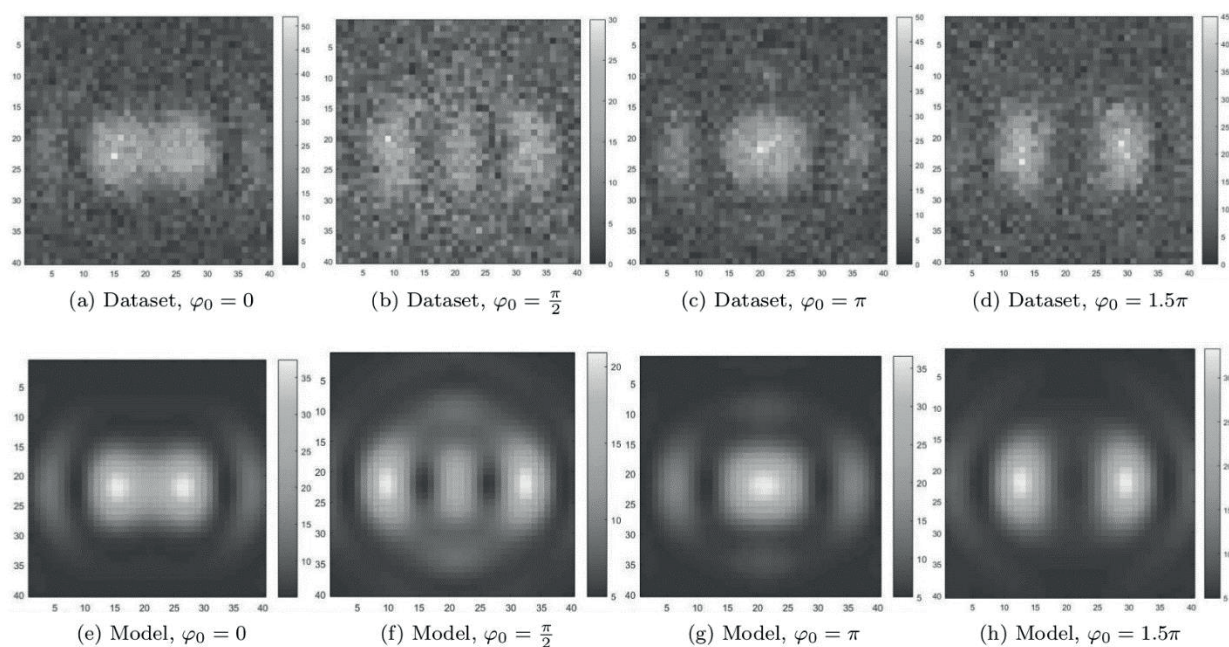


Рис. 2. Симуляция изображений флуорофоров с шумом и модельные PSF, полученные с помощью разработанной программы

Литература

1. Huang F. [et al.]. Ultra-high Resolution 3D Imaging of Whole Cells // Cell. 2016. V. 166. P. 1028.
2. Von Middendorf C. [et al.]. Isotropic 3D Nanoscopy based on single emitter switching // OSA. 2008. V. 16. P. 20774.

УДК 577.218

Определение структуры и функции длинной некодирующей РНК LINC01420

Д.О. Кони́на, М.Ю. Скоблов, А.Ю. Филатова

Медико-генетический научный центр РАМН

Введение. По данным проекта GENCODE(v2.4) на сегодняшний день проаннотировано 15767 днРНК у человека, но лишь для малой части из них изучена функция. Было показано, что длинные некодирующие РНК действуют как регуляторы на

разных уровнях экспрессии генов, включая организацию хроматина, регуляцию транскрипции и посттранскрипционный контроль. Исследования днРНК приведут к более полному пониманию механизмов молекулярно-биологических процессов организма и помогут оптимизировать и систематизировать диагностику наследственных заболеваний человека, а также и разработать подходы для их терапии. Данная работа посвящена определению структуры и функции новой длинной некодирующей РНК LINC01420.

Цель. Анализ структуры и функций новой длинной некодирующей РНК человека LINC01420.

Материалы и методы. С помощью данных из геномного браузера UCSC был проведен анализ консервативности и экспрессии в различных клеточных линиях и тканях, найдены возможные изоформы исследуемой РНК. Праймеры для ПЦР подбирали с помощью программы OLIGO 7. Для определения структуры днРНК использовали реакцию обратной транскрипции, ПЦР, RACE-ПЦР. Для исследования профиля экспрессии проводили ПЦР в реальном времени и с генами «домашнего хозяйства» на образцах РНК, выделенных из различных клеточных линий человека. Для определения функции была исследована внутриклеточная локализация днРНК, проведен нокдаун и исследована жизнеспособность клеток. Определение внутриклеточной локализации транскрипта LINC01420 осуществлено посредством фрагментации лизата клеток на цитоплазматический компартмент, нуклеоплазму и хроматиновую фракцию с помощью мягкого лизиса.

Для проведения нокдауна использовали липофекцию с малыми интерферирующими РНК с помощью Metafectene. Эффективность трансфекции оценивали на проточном цитофлуориметре. Для изучения изменения жизнеспособности клеток использовали МТТ-тест. В качестве отрицательного контроля использовали контрольную неспецифическую малую интерферирующую РНК, не влияющую на экспрессию генов в клетке. Малые интерферирующие РНК подбирали с помощью программы siRNAfit.

Результаты. Биоинформатический анализ показал, что ген LINC01420 высоко представлен во многих клеточных линиях и тканях человека и является консервативным у разных видов позвоночных. С помощью ПЦР анализа на кДНК, полученных из клеточных линий HEK293N, HELa и первичной культуры фибробластов человека, была определена экзон-интронная структура днРНК. Было выявлено две изоформы соответствующих предсказанным транскриптам из баз данных RefSeq и Ensemble. Далее, нами был проведен экспрессионный анализ на образцах РНК, полученных из 12 клеточных линий и фибробластов человека. Экспрессионные данные по гену LINC01420 в различных клеточных линиях подтвердили существование двух изоформ: короткой – мажорной и длинной – минорной. В целом, уровень экспрессии LINC01420 оказался высоким. Наиболее сильная экспрессия наблюдалась в клеточных линиях: A549, C33A, HEK293N и в фибробластах человека. Поэтому дальнейшее исследование структуры и функции LINC01420 было проведено на клеточной линии HEK293N. Нами также были впервые установлены точные 5' и 3' границы транскрипта LINC01420 методом RACE-ПЦР. Для определения функции LINC01420, была подобрана эффективная система нокдауна с помощью которой мы добились снижения экспрессии на 80%. Исследование влияния нокдауна LINC01420 на жизнеспособность клеточной линии A375 не выявило существенных различий с контролем. Была установлена цитоплазматическая локализация транскрипта LINC01420.

Выводы. Биоинформатический анализ показал, что LINC01420 имеет высокое сходство первичной структуры РНК у разных позвоночных и человека, имеет несколько изоформ и экспрессируется на высоком уровне в большинстве тканей человека. Установлена экзон-интронная структура длинной некодирующей РНК LINC01420 и показано, что она состоит из трех экзонов. Показано, что LINC01420 экспрессируется на высоком уровне в разных клеточных линиях человека и имеет две изоформы. Определены 5' и 3' границы гена LINC01420. Для длинной некодирующей РНК LINC01420 была установлена цитоплазматическая локализация. Подобрана эффективная система нокдауна и не обнаружено влияния изменения экспрессии LINC01420 на жизнеспособность клеточной

линии A375. Наше дальнейшее исследование будет нацелено на определение РНК-партнеров LINC01420 и установления ее возможной функции.

УДК 577.29

Разработка методик для анализа видового состава пищевой продукции растительного происхождения с помощью высокопроизводительного секвенирования

*А.А. Айгинин^{1,4}, М.Д. Логачева^{2,3}, А.А. Криницина², Г.А. Шипулин¹, К.Ф. Хафизов^{1,4},
А.С. Сперанская^{1,2}*

¹Центральный НИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора

²Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова

³Сколковский институт науки и технологий

⁴Московский физико-технический институт (государственный университет)

Качество продуктов питания и биологически активных добавок существенно сказывается на здоровье, продолжительности жизни и трудоспособности населения. Одной из важнейших проблем в продовольственной отрасли в настоящее время является фальсификация продуктов питания. Зарубежными научными исследованиями уже неоднократно было показано, что, например, растительные смеси и чаи, распространяемые через торговые сети, часто содержат не те растительные компоненты, которые были заявлены производителем на этикетке. В целом, для идентификации состава продуктов питания применяют очень широкий спектр методов. Для обнаружения фальсификации может быть использован и метод полимеразной цепной реакции, с помощью которого возможно детектировать отдельные виды в различных смесях. Тем не менее, современной альтернативой могут стать передовые лабораторные методы диагностики состава продуктов питания и кормов с использованием технологий высокопроизводительного секвенирования (NGS), чье развитие в последние годы шло бурными темпами. Как частный случай, возможно выполнять полный метагеномный анализ таких смесей, основанный на высокопроизводительном секвенировании т.н. ДНК-штрихкодов, т.е. малых участков ядерной или митохондриальной ДНК, специфичных для рода или вида. (см., например, [1]). Основное преимущество этого метода в том, что за один анализ возможно идентифицировать полный состав сложного продукта, используя всего несколько пар праймеров, и при этом не требуется построения гипотезы о том, что именно искать в образце.

Мы представляем данные исследования методом высокопроизводительного секвенирования таких продуктов питания как травяные чаи. Исследовались фиточаи, как состоящие из одного компонента, так и многокомпонентные чаи нескольких торговых марок, в качестве одного из компонентов которых был заявлен иван-чай, растение популярное среди людей, предпочитающих ЗОЖ. Нами были проверены различные методы выделения нуклеиновых кислот из образцов, а также различные способы приготовления библиотек для высокопроизводительного секвенирования. Для работы были использованы две популярные платформы для высокопроизводительного секвенирования: Illumina MiSeq и Ion S5. В качестве ДНК-штрихкодов были использованы перспективные маркеры для растений и грибов ITS1-(5.8S)-ITS2.

Анализ данных производился путем выравнивания прочтений секвенатора на локальную базу референсных последовательностей ITS1/ITS2. Пайплайн для обработки состоял из трех модулей и был разработан на основе открытого программного обеспечения. Первый модуль предназначался для обработки сырых данных секвенатора. Прочтения фильтровались по длине и по качеству, далее, с помощью программы ITSx, производилось удаление праймеров и консервативных участков рРНК генов 18S, 5.8S и 28S, что необходимо для минимизации возможных ошибок при анализе. На следующем шаге обработанные последовательности, с помощью программы Blast [2], выравнивались

на локальную базу референсных маркеров. Идентификация состава образца с точностью до рода производилась путем суммирования выравниваний принадлежащих одному виду, при этом учитывались только те виды, на которые выравнивались 100 и более последовательностей с *evalue* не более 10^{-10} . При невозможности достоверно определить род, идентифицировался более высокий таксономический уровень.

Проведенный анализ продуктов показал, что, во-первых, все проанализированные образцы фиточаев содержали примесные компоненты, которые представляли собой полевые сорняки, а также плесневые грибы родов *Aspergillus*, *Alternaria* и др. Большинство заявленных производителем растительных компонентов были идентифицированы до рода. Исключение составили компоненты, плохо поддающиеся лизису или содержащие небольшое количество нуклеиновых кислот (например, представленные фрагментами корней). Во-вторых, было установлено, что в двух травяных чаях иван-чай (род *Chamerion*) был заменен фенотипически схожим растением, дербенником (род *Lythrum*). При этом наблюдалась высокая степень корреляции полученных результатов при использовании обоих платформ для высокопроизводительного секвенирования.

Таким образом, нами было продемонстрировано, что обе платформы для высокопроизводительного секвенирования подходят как минимум для качественной оценки состава сложных растительных смесей. Была также подготовлена референсная база маркеров ITS1/ITS2 для анализа данных с помощью разработанного пайплайна. Описанная методика позволяет успешно идентифицировать компоненты в сложных смесях до рода. В случае необходимости определения организмов до вида в некоторых случаях необходимо использовать более длинные фрагменты ДНК-штрихкодов. Методика также позволяет оценить относительное содержание примесей в смесях, однако абсолютная количественная оценка затруднена в силу различий в копийности маркеров, а также особенностей выделения нуклеиновых кислот из сложных смесей.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации (номер соглашения: 14.609.21.0101, уникальный идентификатор проекта: RFMEFI60917X0101).

Литература

1. Prosser S.W., Hebert P.D. Rapid identification of the botanical and entomological sources of honey using DNA metabarcoding // Food Chem. 2017. V. 214. P. 183–191.
2. Altschul S. F., Gish W., Miller W. [et al.]. Basic local alignment search tool // J. Mol. Biol. 1990. V. 215. P. 403–410.

УДК 576.54

Поиск новых биомаркеров онкозаболеваний среди морфологических характеристик экзосом

В.С. Чернышев, Г.В. Сергей

Московский физико-технический институт (государственный университет)

Экзосомы и другие внеклеточные везикулы (ВВ) являются стабильными мембраносодержащими частицами с диаметром 20–120 нм, выделяемыми в кровь практически всеми видами клеток, включая эпителиальные клетки, мезенхимальные клетки, лимфоциты и раковые клетки. Экзосомы транспортируются во внеклеточное пространство путем экзоцитоза (направленного транспорта) как результат формирования мультивезикулярных телец (МВТ) клеткой-отправителем [1]. В результате этого экзосомы и ВВ, попадая во внеклеточное пространство, могут быть обнаружены в любой жидкости организма, включая кровь, мочу и слюну. Они содержат нуклеиновые кислоты (в частности, микро-РНК и другие некодирующие РНК) и белки, окруженные мембраной клетки-отправителя. Именно количество и вид нуклеиновых кислот, содержащихся в экзосомах, являются основным предметом исследований и обсуждений, поскольку

экзосомы играют важную роль в межклеточной коммуникации, где микро-РНК может быть доставлена другим клеткам-реципиентам (адресатам) путем слияния экзосом с мембранами и последующим выходом РНК и других высокомолекулярных органических веществ в цитоплазму этих клеток. На данный момент атомно-силовая микроскопия (АСМ) нечасто используется для изучения экзосом, но имеет большой потенциал стать дополнительным инструментом для диагностики заболеваний [2].

В ходе работы были получены АСМ сканы для четырех образцов экзосом, выделенных из сыворотки крови пациентов с диагнозом «рак толстой кишки», и для 4 образцов экзосом от пациентов без диагноза. Сканирование проводилось в полуконтактном режиме и режиме quantitative mode. На снимках помимо самих экзосом были зафиксированы связанные с ними структуры: нанофиламенты и мультивезикулярные тела. В докладе будут представлены предварительные результаты, полученные после анализа экзосом посредством АСМ.

Литература

1. *Sharma S., Das K., Woo J., Gimzewski J. K.* Nanofilaments on glioblastoma exosomes revealed by peak force microscopy // *J. R. Soc. Interface.* 2014. P. 1–7.
2. *Palanisamy V., Sharma S., Deshpande A., Zhou H., Gimzewski J., Wong D.T.* Nanostructural and transcriptomic analyses of human-saliva-derived exosomes // *PLoS ONE.* 2010. V. 5(1). P. 1–11.
3. *Sharma S., Gillespie B.M., Palanisamy V., Gimzewski J.K.* Quantitative nanostructural and single-molecule force spectroscopy biomolecular analysis of human-saliva-derived exosomes // *Langmuir.* 2011. V. 27. P. 14394–14400.

УДК 576.322.2

Изучение влияния виментина на миграцию клеток

С.С. Енджиевская, А.А. Минин

Московский физико-технический институт (государственный университет)
Институт белка РАН

Белок промежуточных филаментов виментин увеличивает способность различных клеток к миграции. Примером этого может служить эпителиально-мезинхимальный переход при заживлении поврежденных тканей, а также при злокачественном росте опухолей и образовании метастаз, когда его экспрессия коррелирует с высокой миграционной активностью клеток. Несмотря на многочисленные попытки объяснить эффект виментина, его роль остается неясной. Для выяснения роли виментина в миграции клеток мы проанализировали при помощи видео-микроскопии подвижность крысиных фибробластов REF52 и сравнили ее с подвижностью этих клеток после разрушения в них гена виментина при помощи системы CRISPR Cas9. Оказалось, что нокаут виментина не влиял на среднюю скорость миграции клеток, в то время как направленность движения клеток была сильно подавлена. Наши данные позволяют предположить, что виментиновые промежуточные филаменты способствуют поляризации мигрирующих клеток, что необходимо для поддержания направленности движения.

Работа выполнена при поддержке РФФИ (грант № 17-04-01775) и РНФ (грант № 14-14-00234).

Роль SCL-комплекса в регуляции экспрессии рецепторной тирозинкиназы C-KIT при лейкозах

Э.Р. Ваганова^{1,2}, П.В. Спирин², В.С. Прасолов^{1,2}

¹ Московский физико-технический институт (государственный университет)

² Институт молекулярной биологии им. В. А. Энгельгардта РАН

Острый миелоидный лейкоз (ОМЛ) является одним из наиболее распространенных злокачественных заболеваний кроветворной системы. В клетках ОМЛ часто обнаруживают мутации и хромосомные aberrации в генах, ответственных за нормальную пролиферацию и дифференцировку. В результате в бластных клетках крови появляются мутантные формы белков, которые участвуют в их злокачественном перерождении. Одной из наиболее часто встречаемых в ОМЛ является хромосомная транслокация $t(8;21)(q22;q22)$, которая приводит к образованию слитного белка RUNX1-RUNX1T1 (AML1-ETO) [1]. Считается, что появление RUNX1-RUNX1T1 может приводить к нарушению нормальной экспрессии генов, отвечающих за дифференцировку клеток крови, а с другой стороны к активации экспрессии генов, ассоциированных с лучшей выживаемостью и повышенной пролиферацией клеток, однако механизмы такой регуляции остаются неизвестными [2]. В конечном итоге это приводит к изменению активности большого числа сигнальных каскадов и к злокачественному перерождению бластных клеток. К числу таких генов относят C-KIT, кодирующий рецепторную тирозинкиназу с одноименным названием. Для большинства клеток ОМЛ характерен высокий уровень экспрессии C-KIT [3]. В норме этот рецептор отвечает за нормальную дифференцировку кроветворных клеток-предшественников.

Высокий уровень экспрессии C-KIT характерен только для незрелых клеток. В злокачественных клетках он связан с аномальной пролиферацией таких клеток и снижением чувствительности к сигналам апоптоза. Одним из основных регуляторов C-KIT является многокомпонентный транскрипционный комплекс SCL. Известно, что некоторые компоненты SCL-комплекса связаны с прогрессией острых лимфобластных лейкозов. Вероятно, в ОМЛ данный комплекс также играет важную роль. В данной работе исследовано влияние SCL-комплекса и слитного белка RUNX1-RUNX1T1 на экспрессию C-KIT. Для этого в клетки миелоидного и лимфоидного ряда вводили рекомбинантную плазмиду с репортерным геном люциферазы, находящейся под контролем промотора C-KIT, а также конструкции, кодирующие компоненты SCL-комплекса. Выявлено, что эктопическая экспрессия компонент SCL-комплекса в клетках моноцитарного и лимфобластного лейкоза приводит к позитивной регуляции активности промотора рецепторной тирозинкиназы C-KIT. Показано, что RUNX1-RUNX1T1 может влиять на SCL-комплекс и его отдельные компоненты, и таким образом регулировать активность промотора C-KIT. Полученные результаты имеют как фундаментальное, так и прикладное значение и являются перспективными для разработки новых подходов для диагностики и лечения острых миелоидных лейкозов.

Работы по эктопической экспрессии выполнены при поддержке гранта Российского научного фонда № 14-14-01089-П.

Работы по оценке функциональных свойств клеток выполнены при поддержке гранта Российского фонда фундаментальных исследований № 17-04-01555.

Литература

1. Loke J. [et al.]. RUNX1-ETO and RUNX1-EV11 Differentially Reprogram the Chromatin Landscape in t(8; 21) and t(3; 21) AML // Cell Reports. 2017. V. 19, N 8. P. 1654–1668.
2. Spirin P.V. [et al.]. Silencing AML1-ETO gene expression leads to simultaneous activation of both pro-apoptotic and proliferation signaling // Leukemia. 2014. V. 28, N 11. P. 2222.
3. Wang Y.Y. [et al.]. AML1-ETO and C-KIT mutation/overexpression in t(8; 21) leukemia: implication in stepwise leukemogenesis and response to Gleevec // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2005. V. 102, N 4. P. 1104–1109.

Научное издание

Труды
60-й Всероссийской научной конференции МФТИ

Биологическая и медицинская физика

20-26 ноября 2017 года

Составители:

М.В. Милов, К.И. Агладзе

Редакторы:

В.А. Дружинина, И.А. Волкова, О.П. Котова, Н.Е. Кобзева

Корректоры:

И.А. Волкова, О.П. Котова, Н.Е. Кобзева

Набор и вёрстка:

М.А. Чайковский

Подписано в печать 12.12.2017. Формат 60 × 84 ¹/₈.

Усл. печ. л. 6. Тираж 40 экз. Заказ № 608.

Федеральное государственное автономное образовательное
учреждение высшего образования «Московский физико-технический институт
(государственный университет)»

141707, Московская обл., г. Долгопрудный, Институтский пер., 9
Тел. (495) 408-58-22

"Полиграфия "ПРОДВИЖЕНИЕ"
123592, г. Москва, ул. Кулакова дом 20, стр. 1Б
E-mail: info@prodv.pro
Тел. (495) 988-93-68



ISBN 978-5-7417-0653-4

