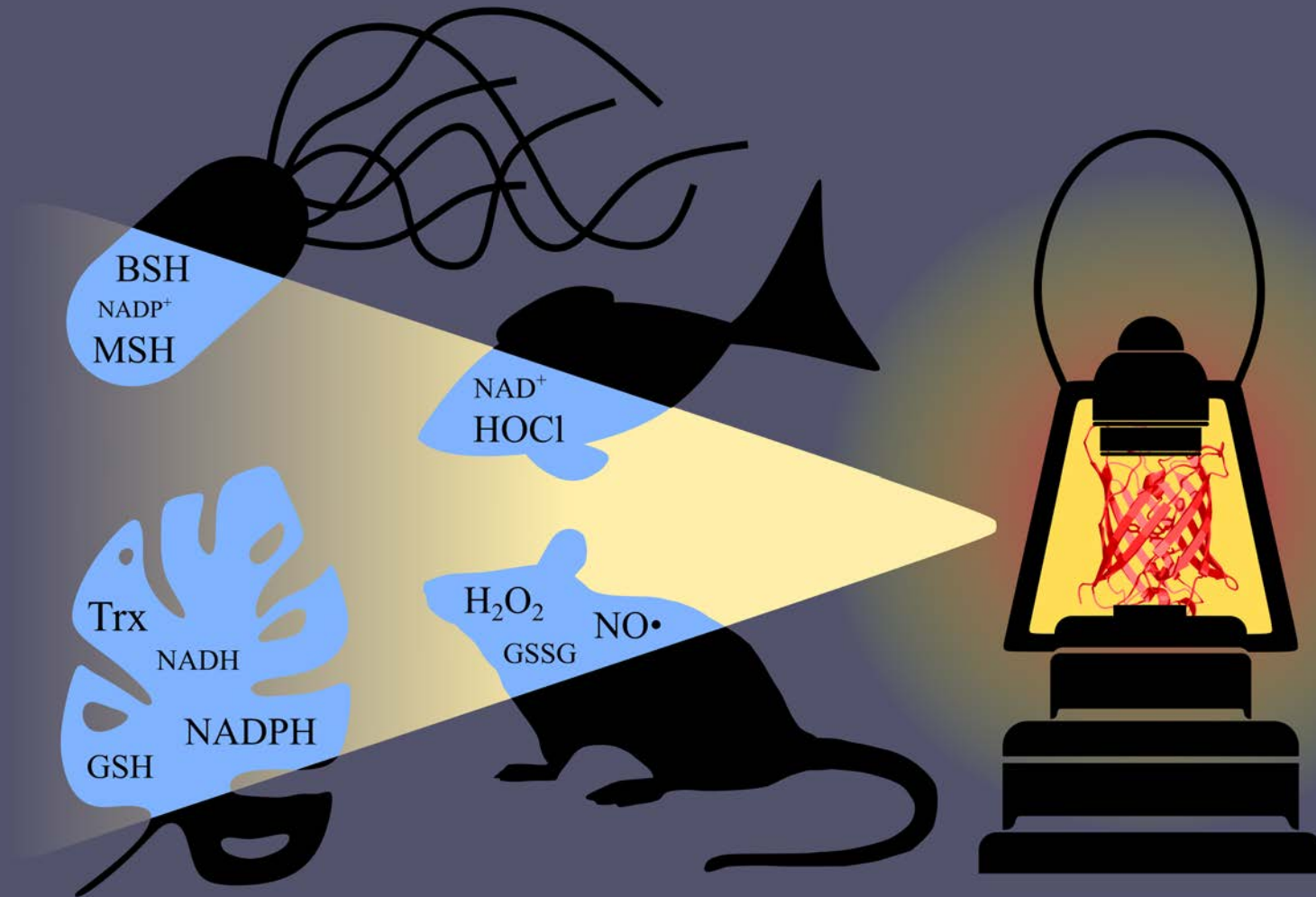
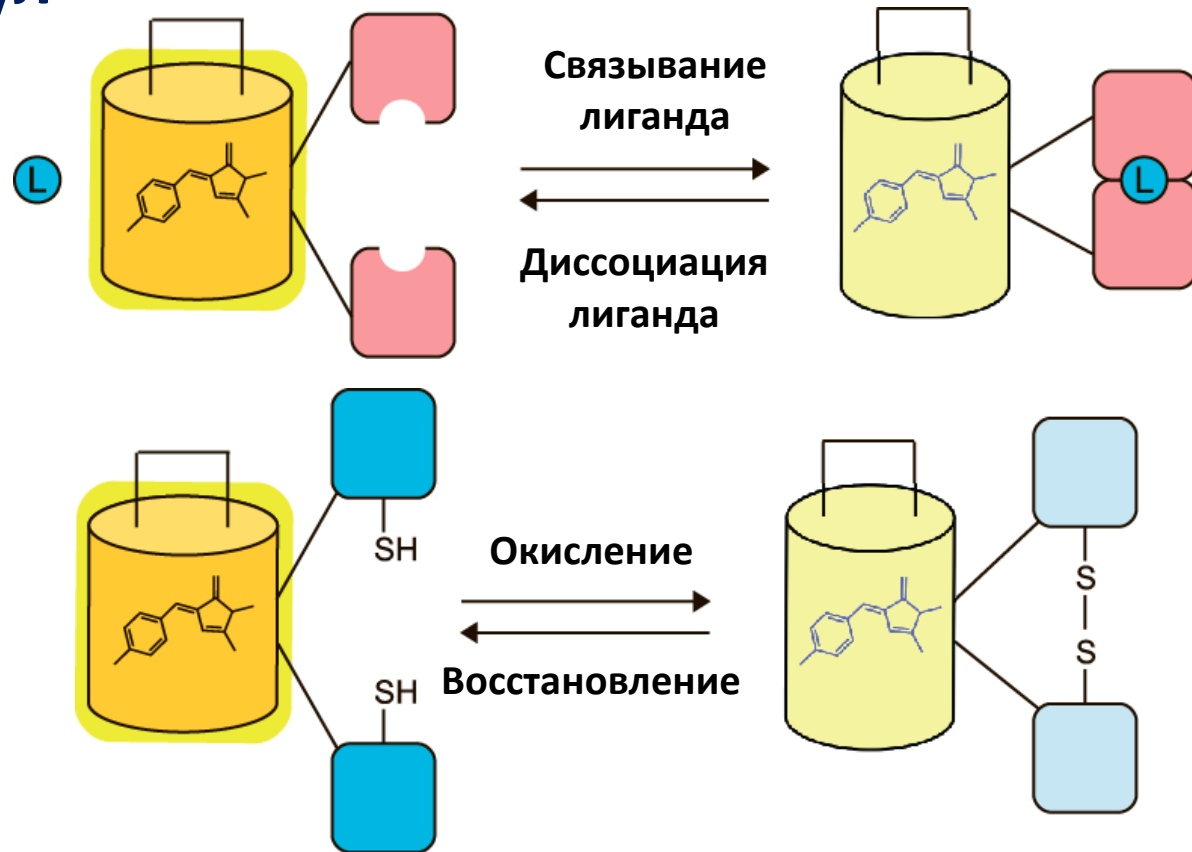


Генетически кодируемые инструменты для исследования биологических процессов

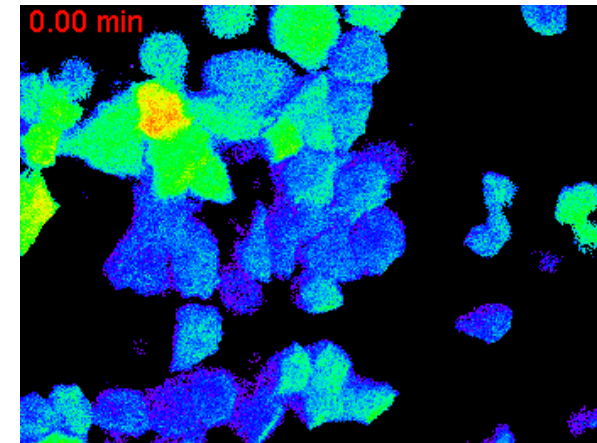


Дмитрий Билан

- **Биосенсор = сенсор биологической природы;**
- Биосенсор – белковая химерная молекула $\left\{ \begin{array}{l} \text{сенсорный модуль} \\ \text{флуоресцентный модуль} \end{array} \right.$;
- Биосенсор изменяет спектральные свойства в ответ на определенный стимул



На примере биосенсора Hypocrates



клетки HeLa Kyoto
визуализация гипогалогенного стресса

Флуоресцентный модуль

Флуоресцентные белки

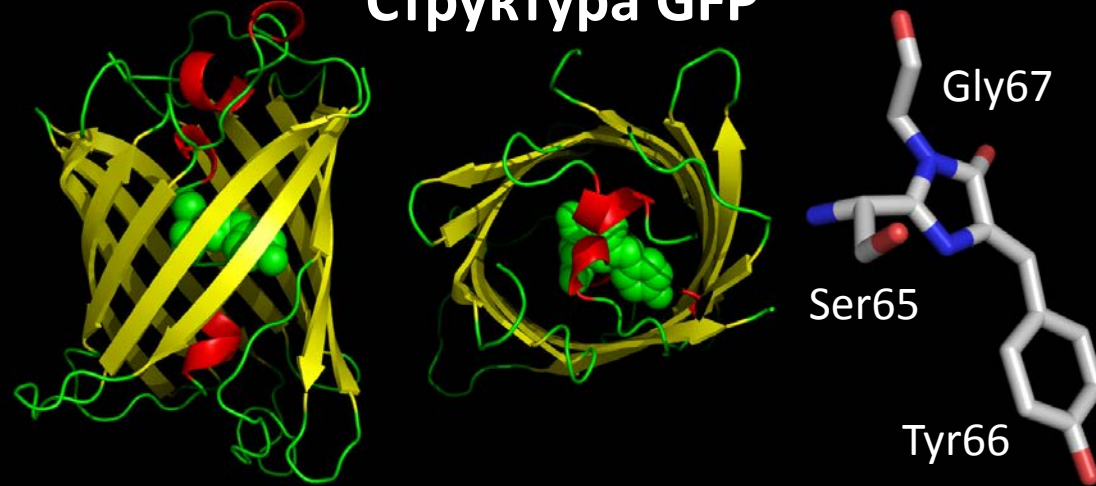
На примере GFP (Green Fluorescent Protein) из медузы *Aequorea victoria*



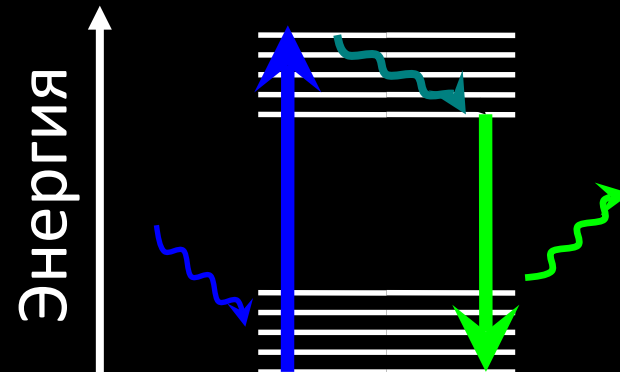
Aequorea victoria

©haddock@mbari.org

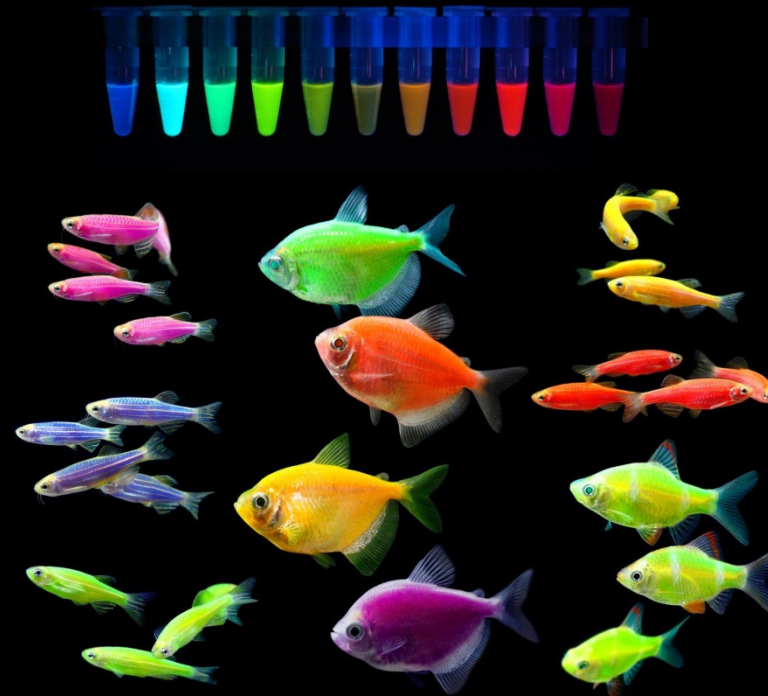
Структура GFP



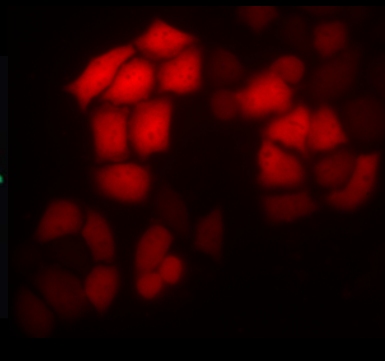
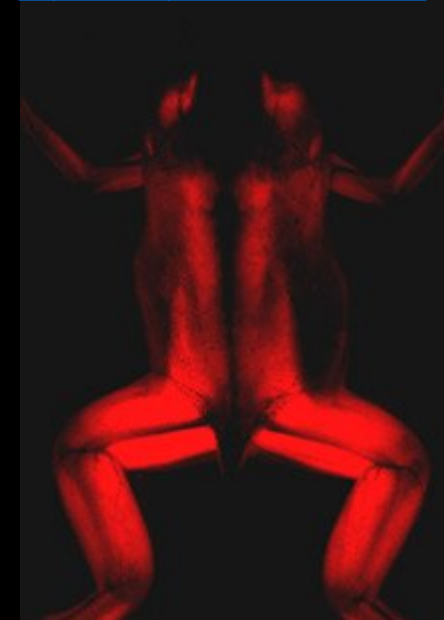
Флуоресценция



Разнообразии флуоресцентных белков в различных биологических объектах



<https://www.photonics.com/Articles/>



Где искать сенсорные модули для биосенсоров?

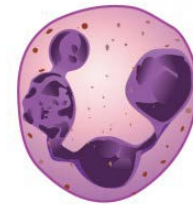
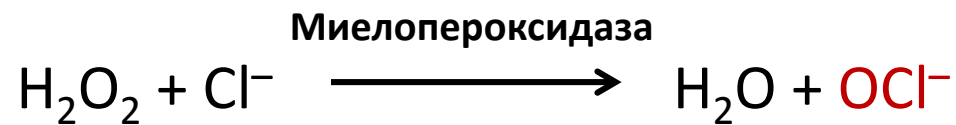
Некоторые новинки от нашей команды



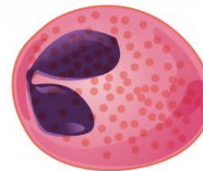
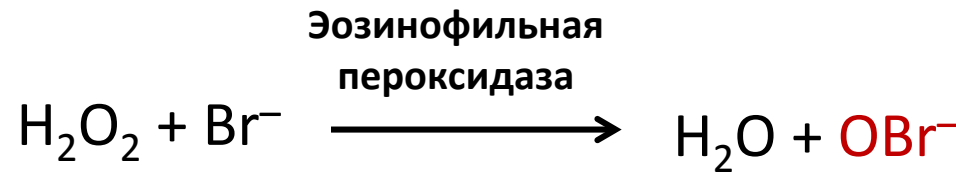
Некоторые новинки от нашей команды



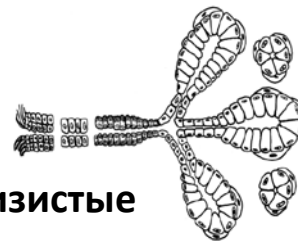
Гипогалогенные кислоты (HOCl, HOBr, HOSCN)



Нейтрофил



Эозинофил

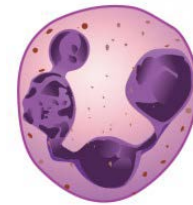
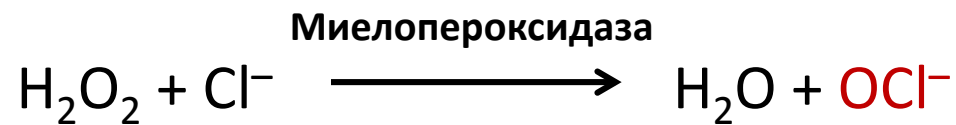


Слизистые железы

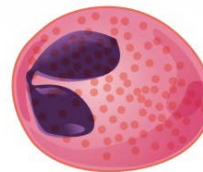
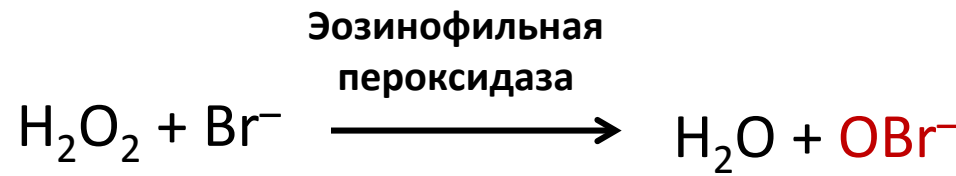
Некоторые новинки от нашей команды



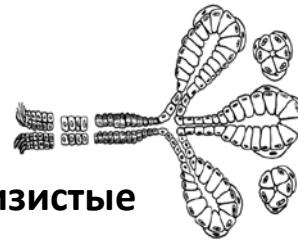
Гипогалогенные кислоты (HOCl, HOBr, HOscn)



Нейтрофил



Эозинофил



Слизистые железы

ГИПОГАЛОГЕННЫЙ СТРЕСС – МАРКЕР ВОСПАЛЕНИЯ

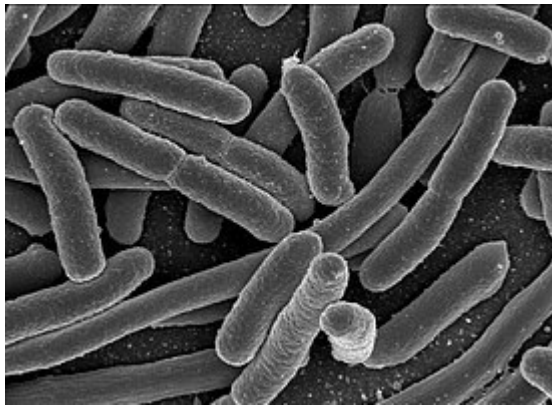
- респираторная система;
- нервная система;
- выделительная система;
- соединительная ткань;
- сердечно-сосудистая система;
- инфекционные болезни

Некоторые новинки от нашей команды



План создания сенсора для регистрации HOCl , HOBr , HO^+SCN

Escherichia coli



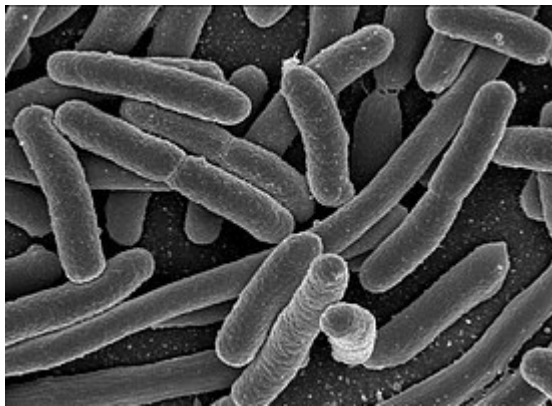
<https://ru.wikipedia.org>

Некоторые новинки от нашей команды

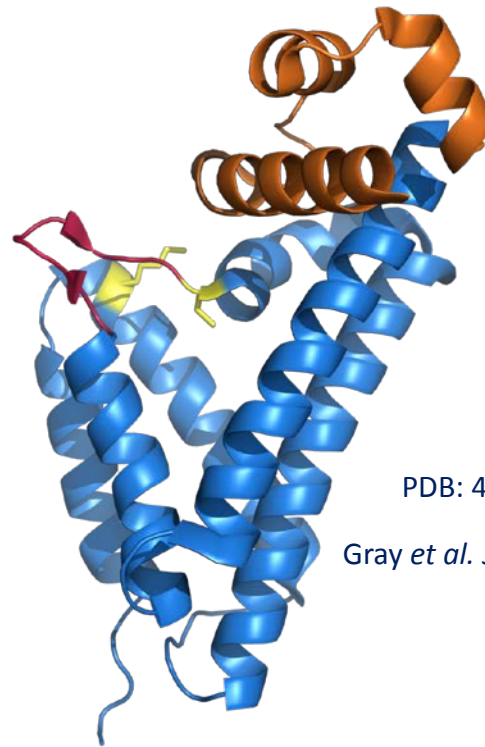


План создания сенсора для регистрации HOCl, HOBr, HO/SCN

Escherichia coli



<https://ru.wikipedia.org>



PDB: 4YZE

Gray *et al.* J. Biol. Chem. 2013, 288:13789

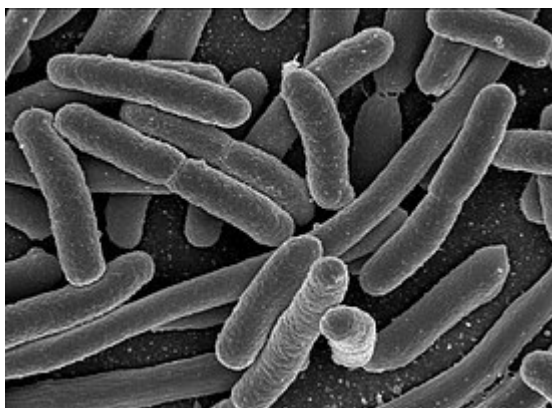
транскрипционный репрессор NemR
природный сенсор гипогалогенного стресса

Некоторые новинки от нашей команды

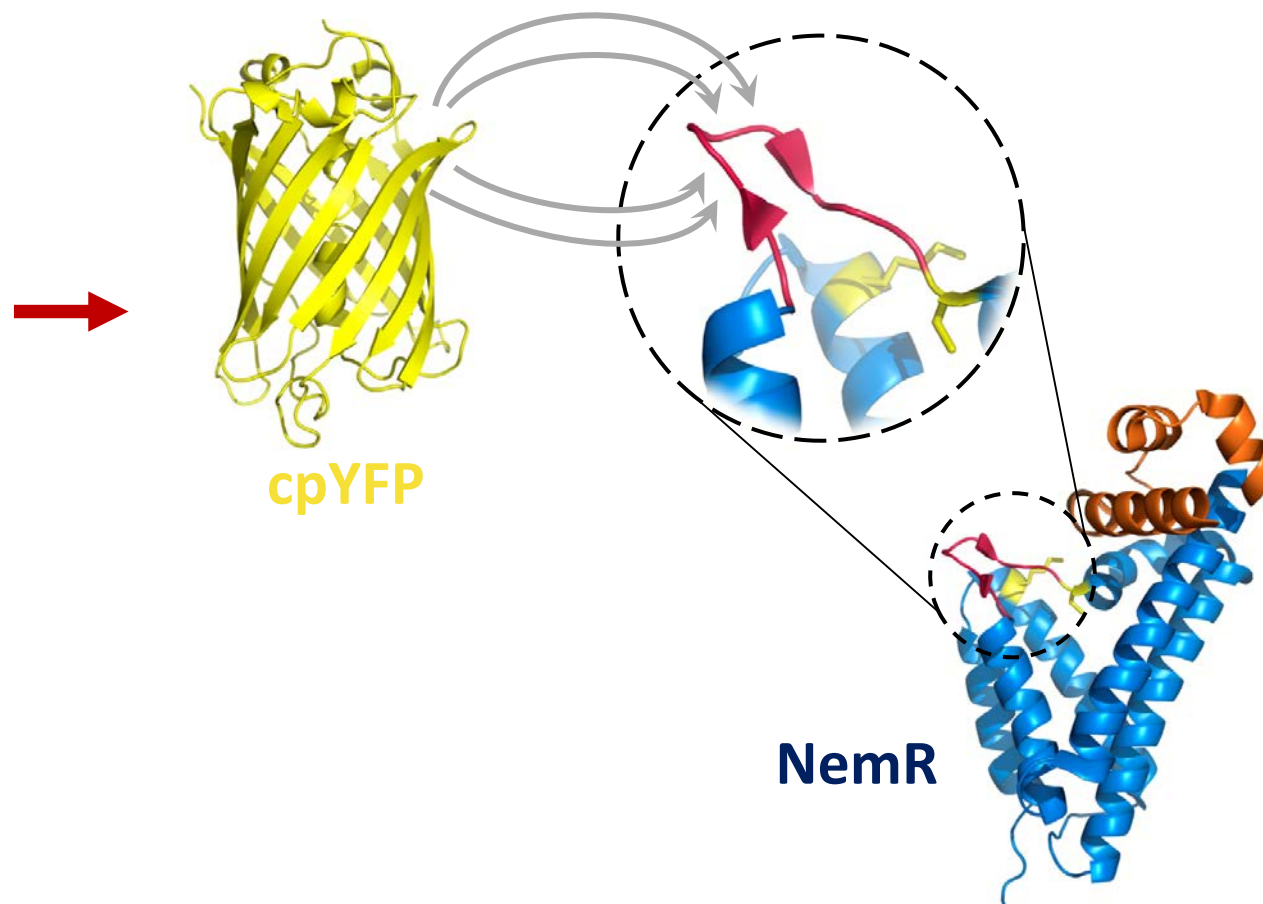


План создания сенсора для регистрации HOCl, HOBr, HO SCN

Escherichia coli



<https://ru.wikipedia.org>

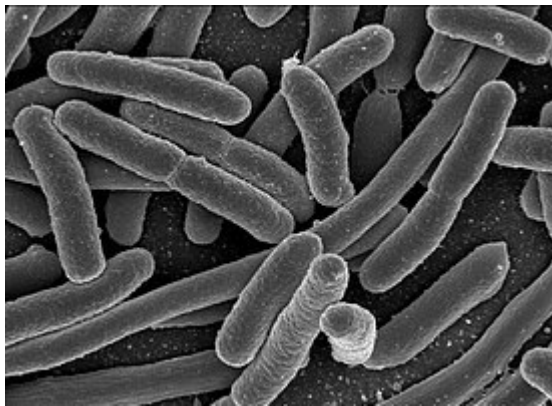


Некоторые новинки от нашей команды

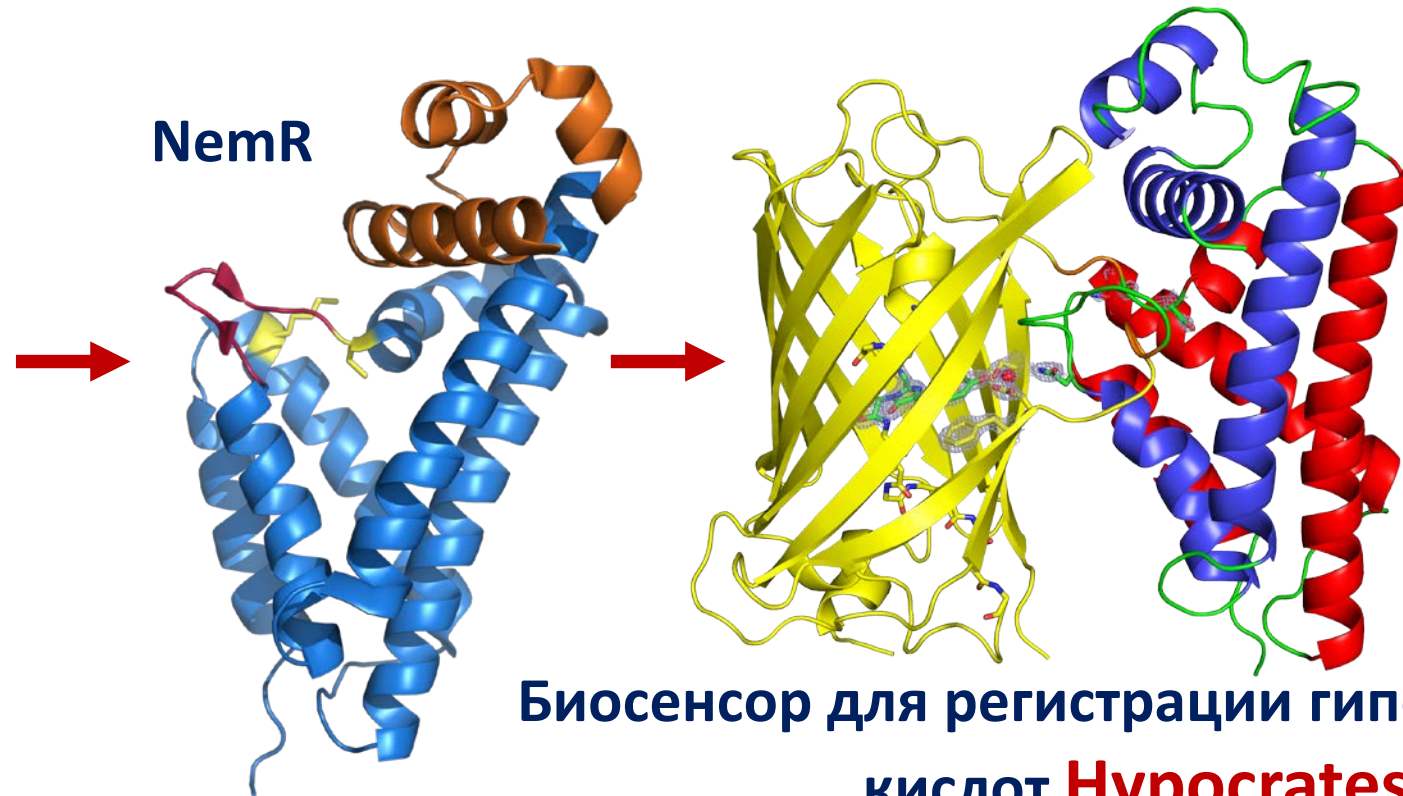


План создания сенсора для регистрации HOCl, HOBr, HO SCN

Escherichia coli



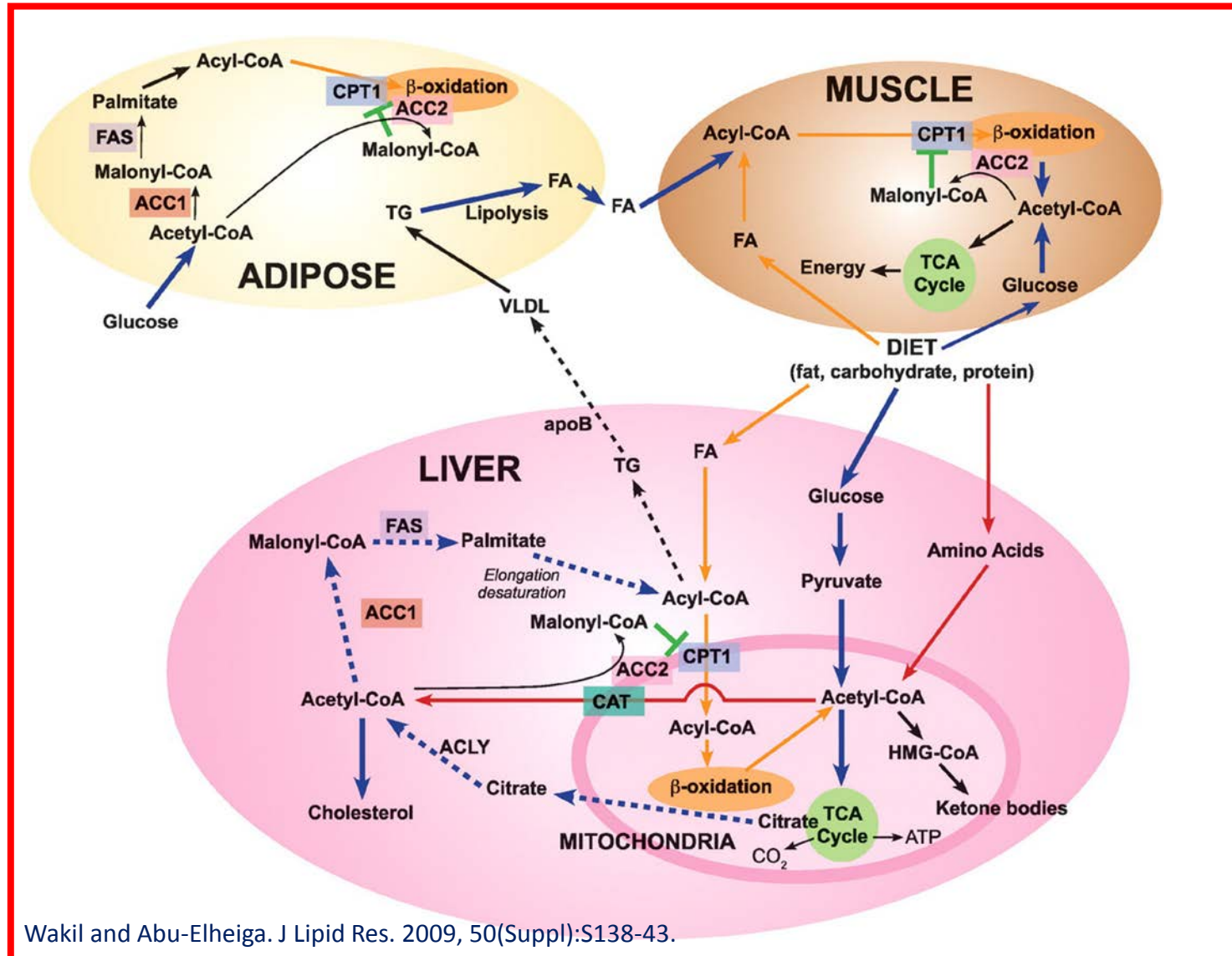
<https://ru.wikipedia.org>



Биосенсор для регистрации гипогалогенных
кислот **Hypocrates**
(from **Hypochlorite Ratiometric Sensor**)

Некоторые новинки от нашей команды

Метаболизм жирных кислот



Некоторые новинки от нашей команды



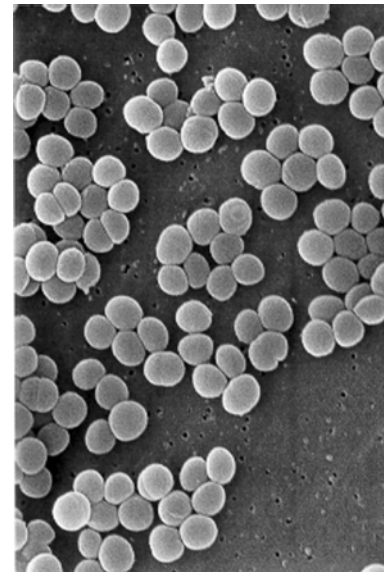
План создания сенсоров для регистрации метаболитов жирных кислот

Vibrio cholerae



https://www.rki.de/DE/Content/Infekt/NRZ/EM/Aufnahmen/EM_Tab_Vibrio_cholerae.html

Staphylococcus aureus

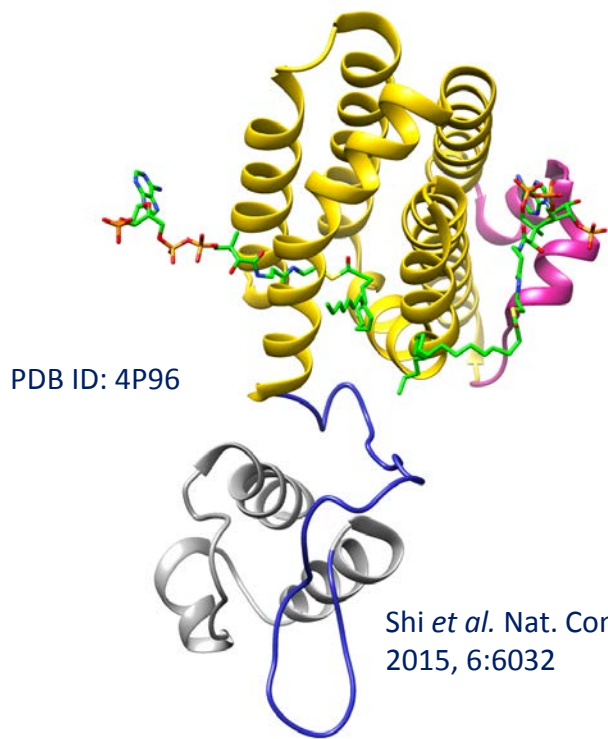


<https://ru.wikipedia.org>

Некоторые новинки от нашей команды



План создания сенсоров для регистрации метаболитов жирных кислот

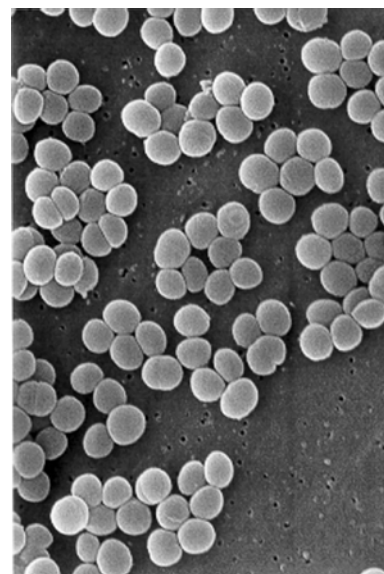


Vibrio cholerae



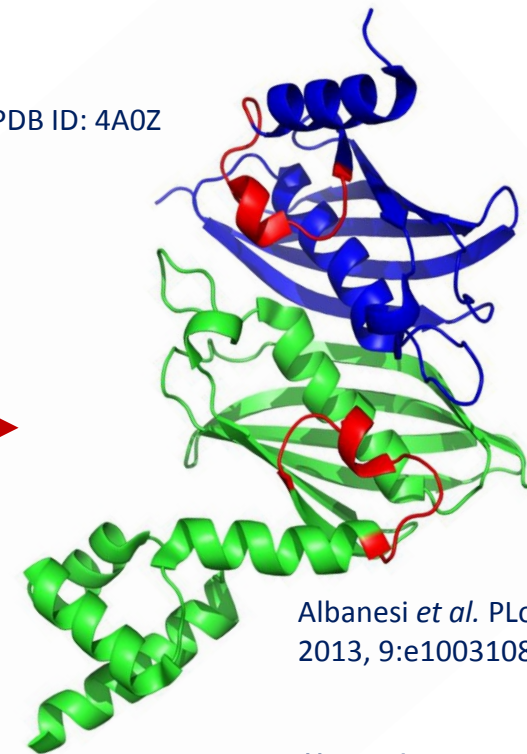
https://www.rki.de/DE/Content/Infekt/NRZ/EM/Aufnahmen/EM_Tab_Vibrio_cholerae.html

Staphylococcus aureus



<https://ru.wikipedia.org>

PDB ID: 4A0Z



Albanesi *et al.* PLoS Pathog. 2013, 9:e1003108

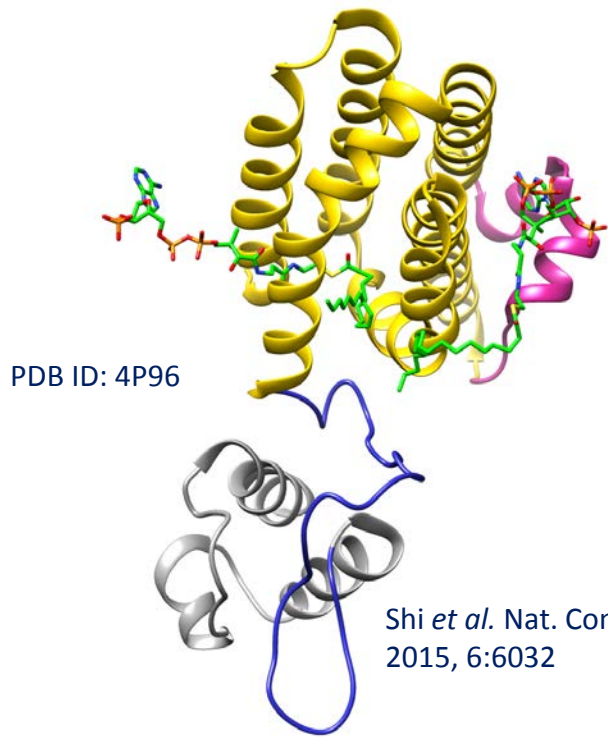
транскрипционный фактор **FapR**
– природный сенсор **малонил-КоА**

транскрипционный фактор **FadR**
– природный сенсор **ацил-КоА**

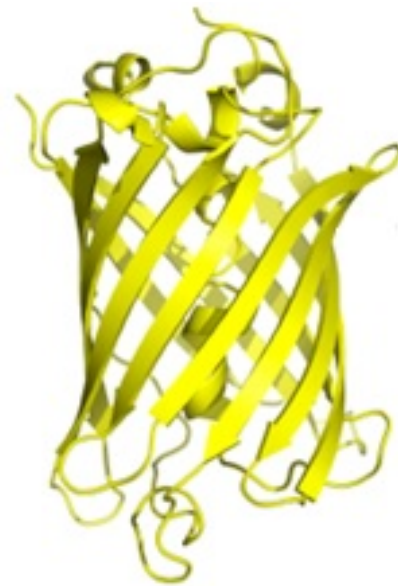
Некоторые новинки от нашей команды



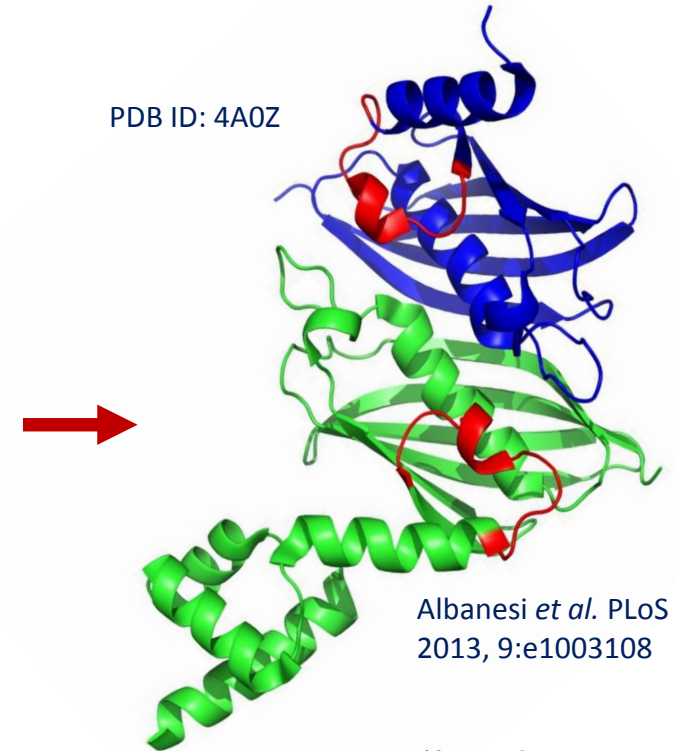
План создания сенсоров для регистрации метаболитов жирных кислот



cpYFP



PDB ID: 4A0Z



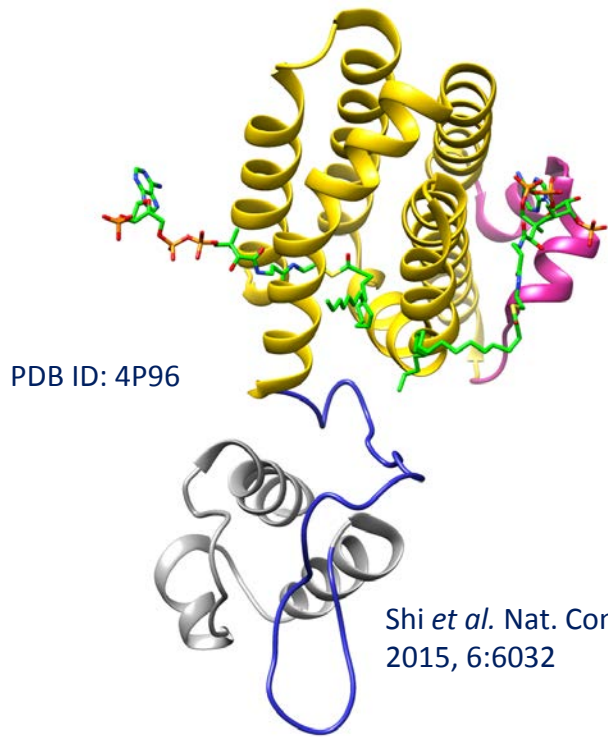
транскрипционный фактор **FadR**
– природный сенсор **ацил-КоА**

транскрипционный фактор **FarR**
– природный сенсор **малонил-КоА**

Некоторые новинки от нашей команды



План создания сенсоров для регистрации метаболитов жирных кислот



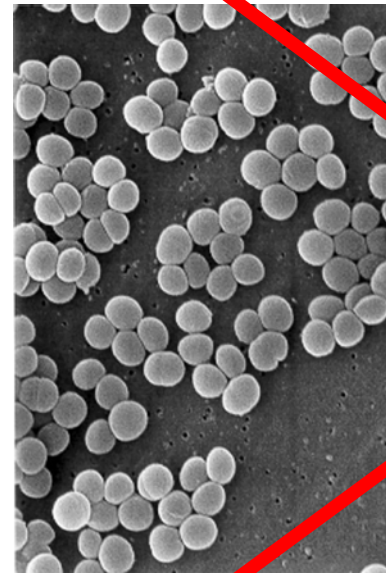
Shi *et al.* Nat. Commun. 2015, 6:6032

Vibrio cholerae



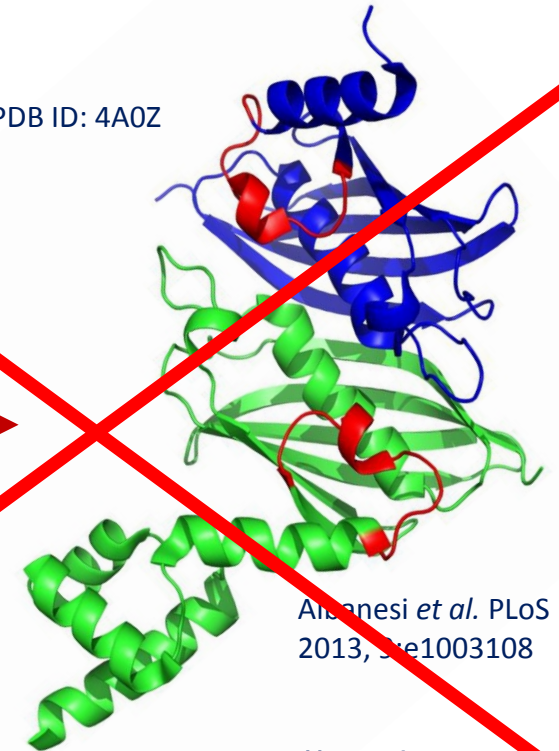
https://www.rki.de/DE/Content/Infekt/NRZ/EM/Aufnahm/EM_Tab_Vibrio_cholerae.html

Staphylococcus aureus



<https://ru.wikipedia.org>

PDB ID: 4A0Z



Albanesi *et al.* PLoS Pathog. 2013, 9:e1003108

транскрипционный фактор **FapR**
– природный сенсор **малонил-КоА**

транскрипционный фактор **FadR**
– природный сенсор **ацил-КоА**

Некоторые новинки от нашей команды

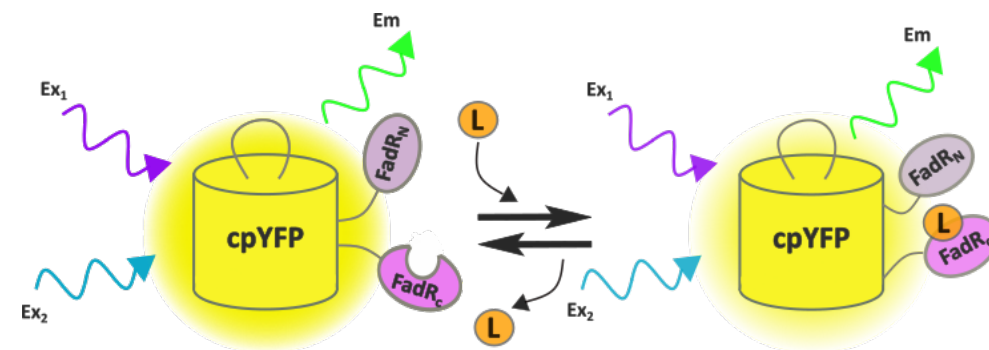
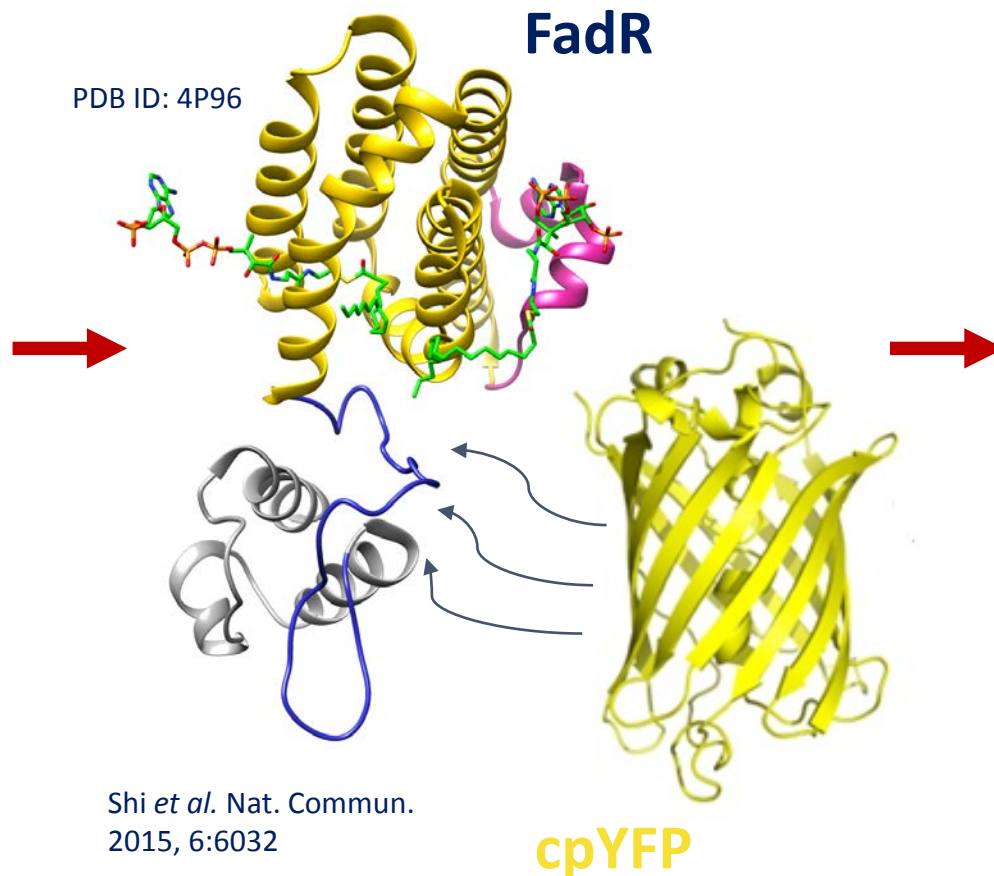


План создания сенсора для регистрации ацил-КоА

Vibrio cholerae



https://www.rki.de/DE/Content/Infekt/NRZ/EM/Aufnahmen/EM_Tab_Vibrio_cholerae.html



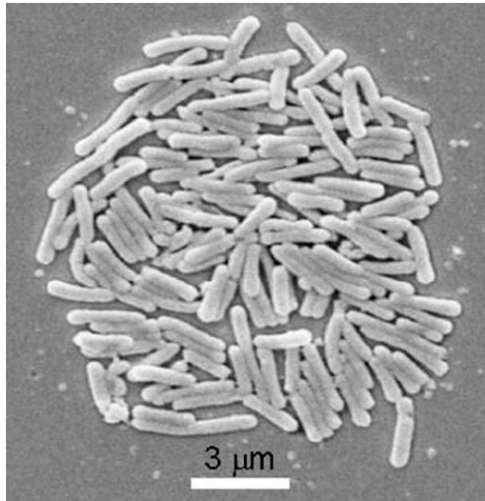
Биосенсор для регистрации
длинноцепочечных ацил-КоА
биосенсор **LocI**
(from **L**ong **C**hain **i**ndicator)

Некоторые новинки от нашей команды



План создания сенсора для регистрации пер/полисульфидов

Xylella fastidiosa



Mizell et al., DOI: 10.32473/edis-in174-2003

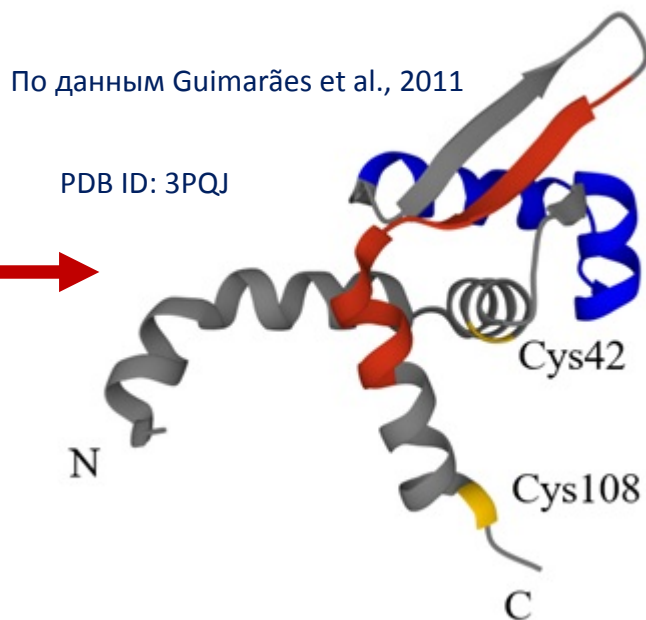
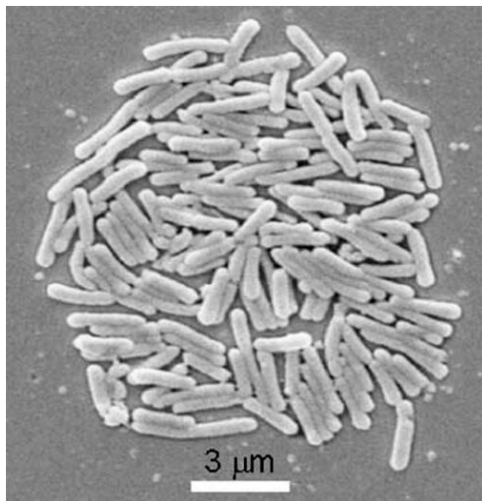


Некоторые новинки от нашей команды



План создания сенсора для регистрации пер/полисульфидов

Xylella fastidiosa



Mizell et al., DOI: 10.32473/edis-in174-2003

транскрипционный фактор **BigR**
– природный сенсор пер/полисульфидов

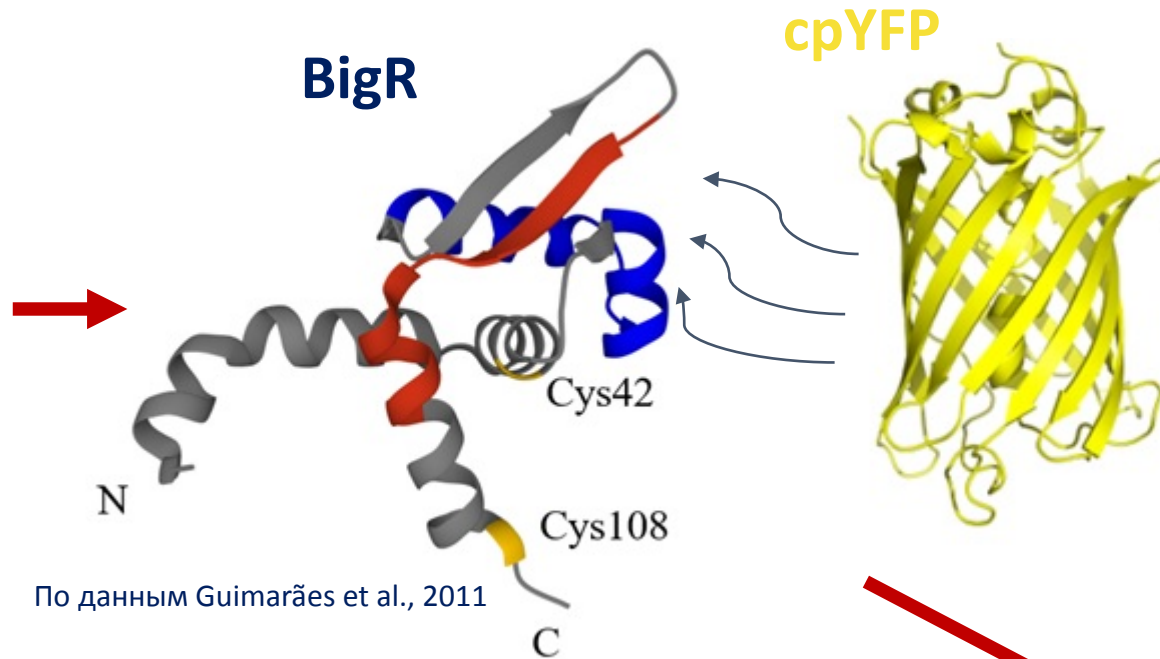
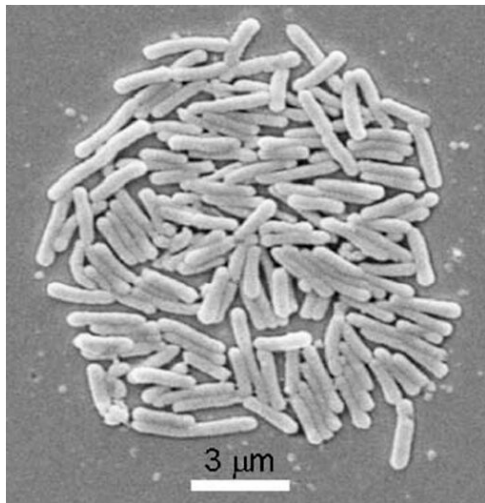


Некоторые новинки от нашей команды



План создания сенсора для регистрации пер/полисульфидов

Xylella fastidiosa



По данным Guimarães et al., 2011

Биосенсор для регистрации
полисульфидов
биосенсор **PersIc**
(from **Persulfide I**ndicator)

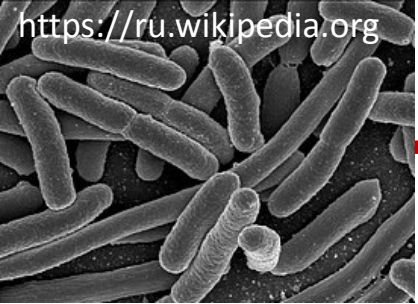
Mizell et al., DOI: 10.32473/edis-in174-2003



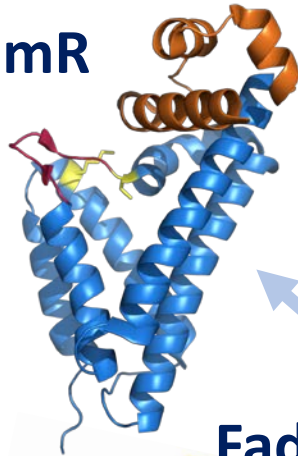
Некоторые новинки от нашей команды



Escherichia coli



NemR



Vibrio cholerae

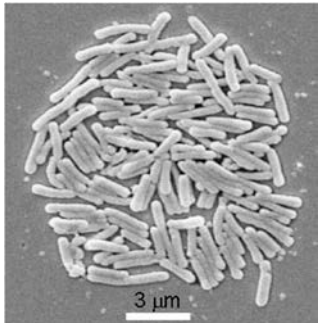


FadR

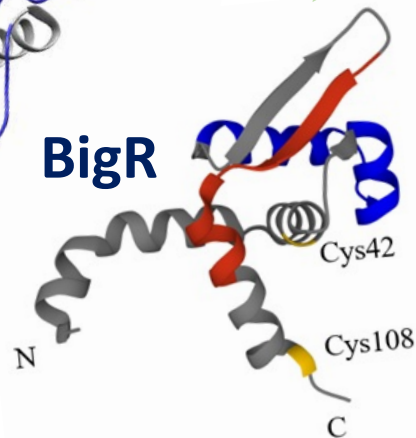


Xylella fastidiosa

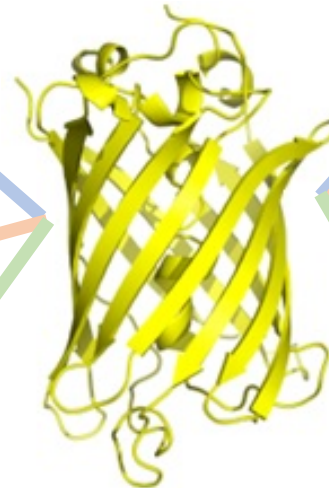
Mizell et al., DOI:
10.32473/edis-in174-2003



BigR



cpYFP



Hypocrates для регистрации
гипогалогенных кислот

Kostyuk et al, Nature Communications, 2022

Loc1 для регистрации
длинноцепочечных ацил-КоА

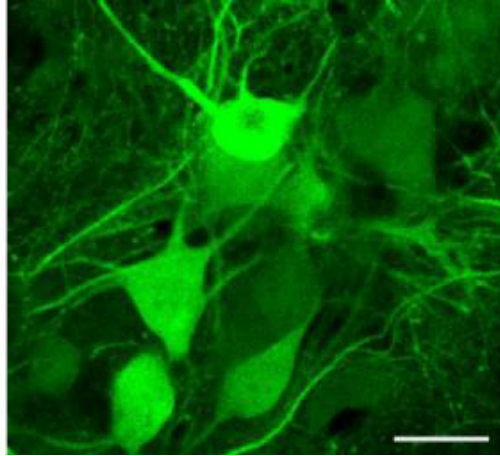
Pers1c для регистрации
полисульфидов

И так далее...

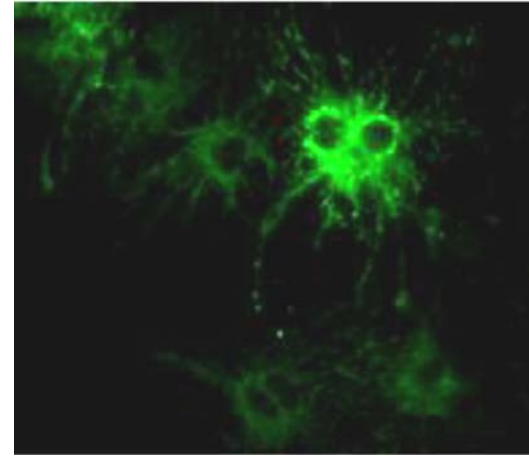
Широкий полет для фантазии

**В чем преимущества флуоресцентных
биосенсоров?**

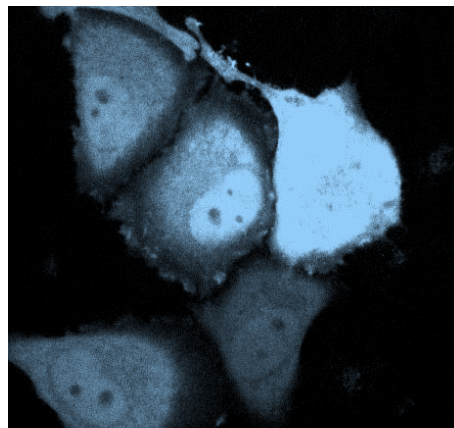
- Выбираем промотор и направляем инструмент в интересующие типы клеток



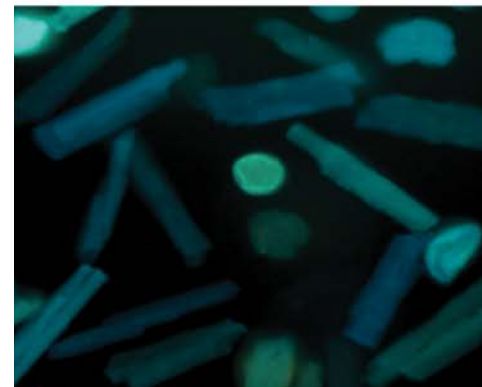
сенсор HyPer7 в нейронах
(первичная культура из гиппокампов эмбрионов мыши)



GFAP, сенсор HyPer7 в астроцитах
(первичная культура из гиппокампов эмбрионов мыши)

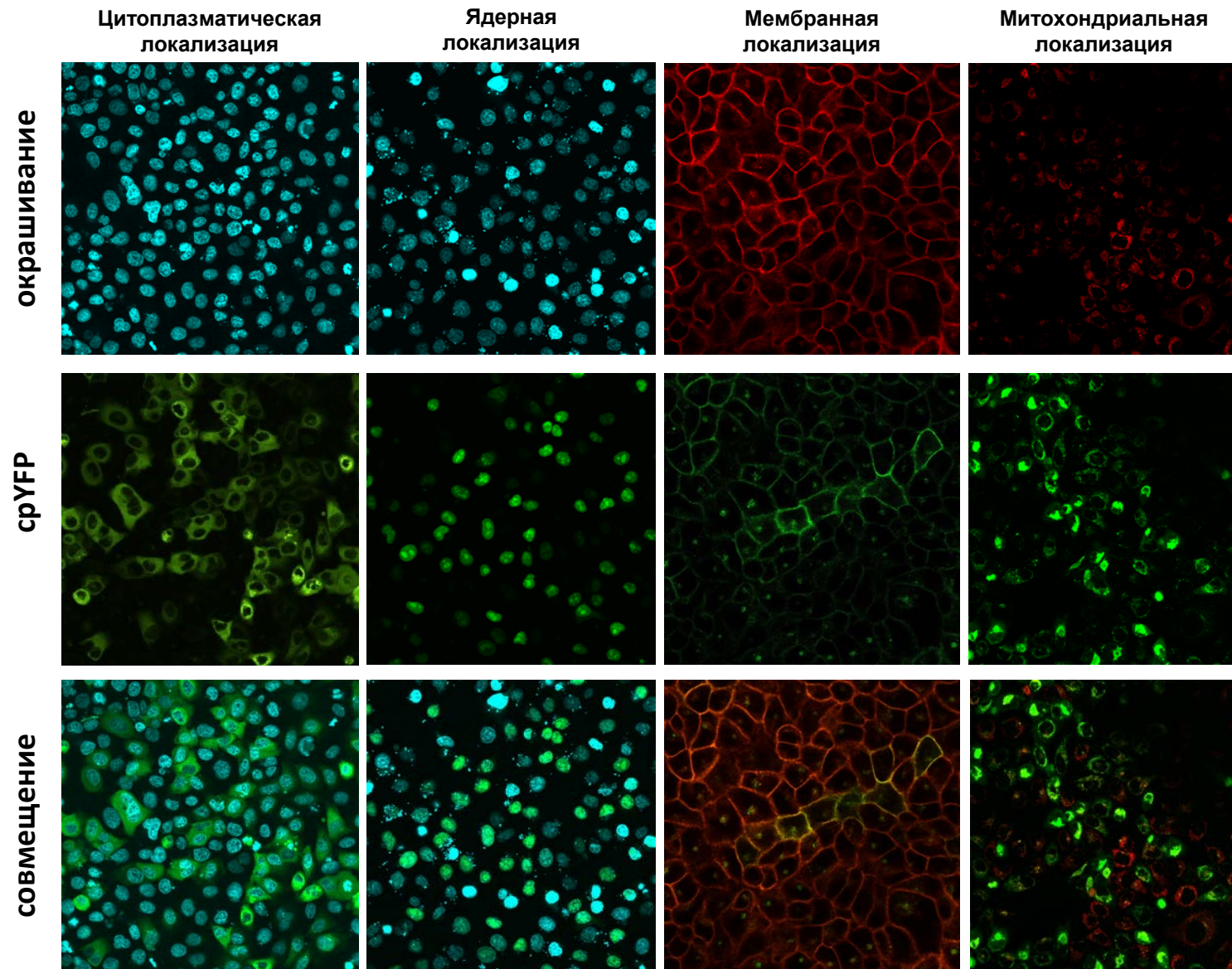


сенсор RexYFP в HeLa Kyoto



сенсор HyPer в кардиомиоцитах
(первичная культура)

- Выбираем сигнальную последовательность и направляем инструмент в интересующие компартменты клеток



Возможность исследования биологических процессов в моделях *in vivo*



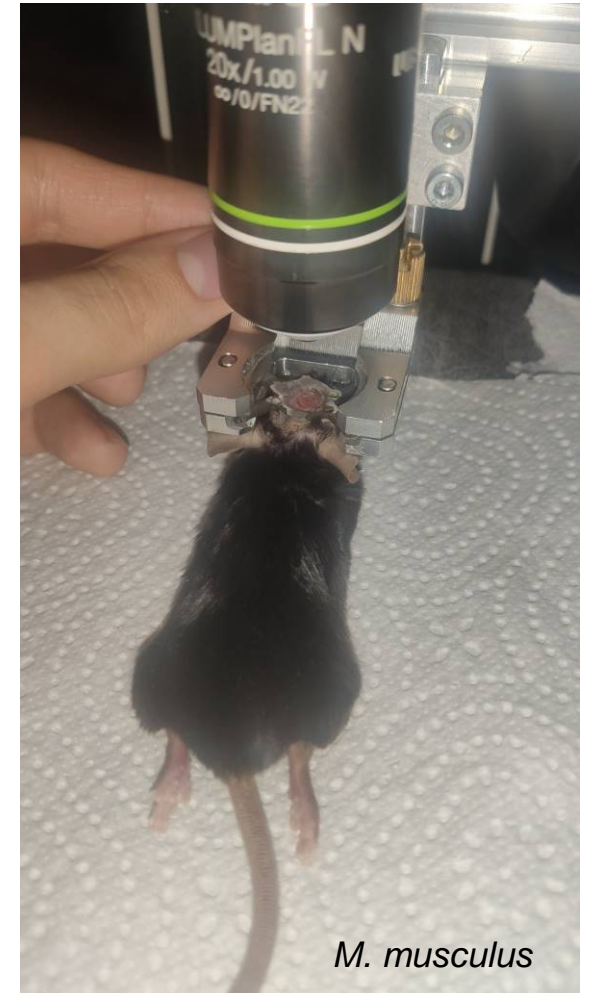
D. rerio



D. rerio Casper

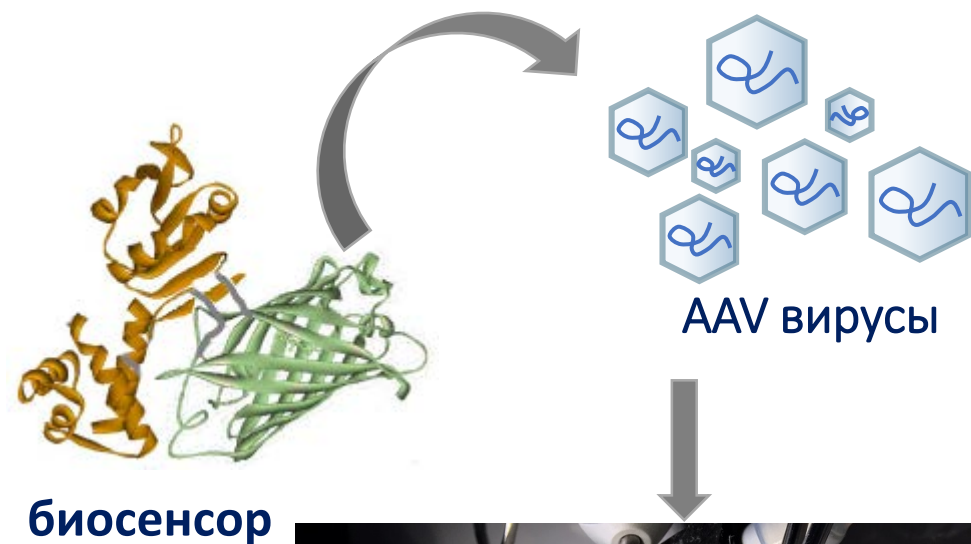


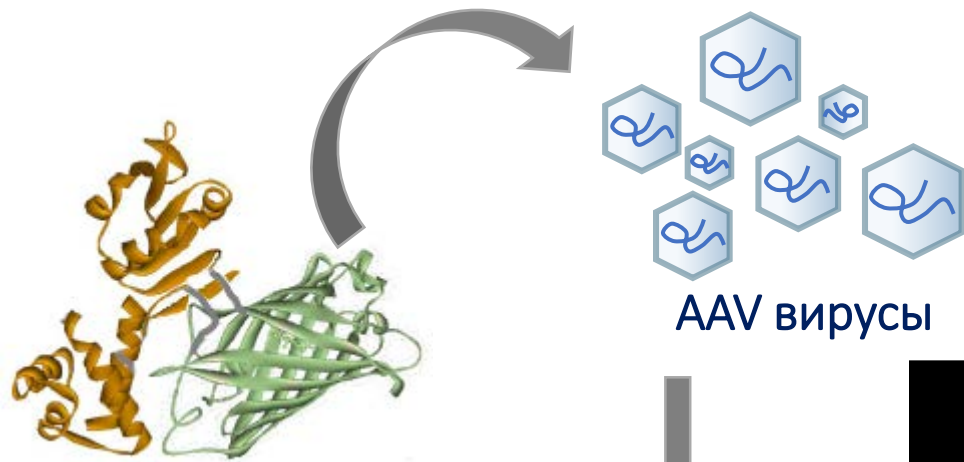
R. norvegicus



M. musculus







биосенсор

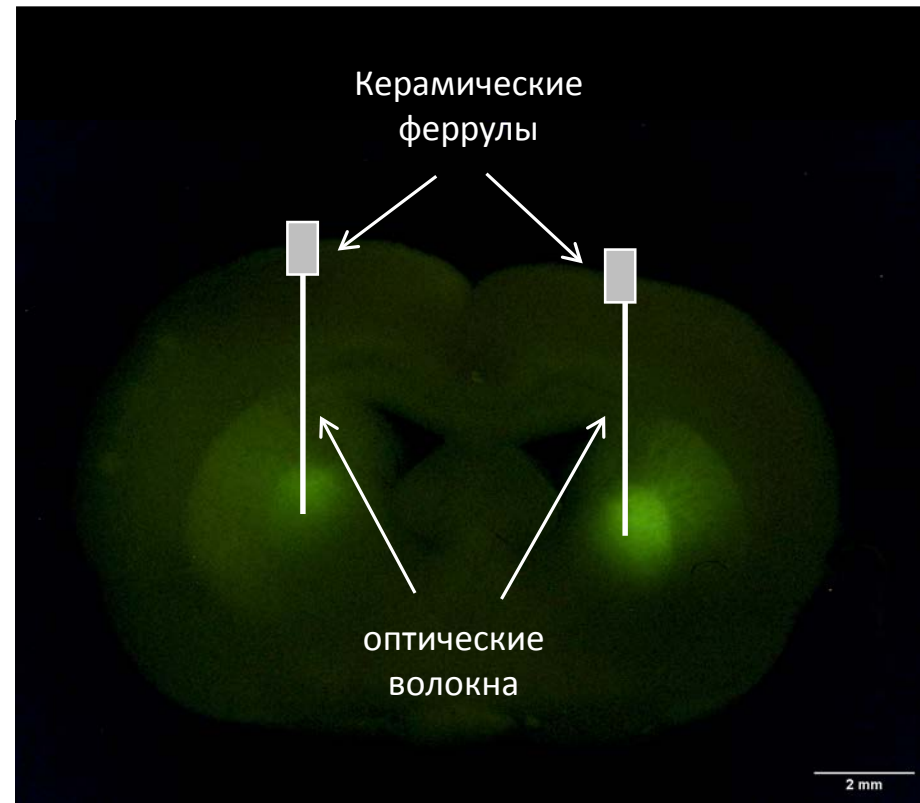
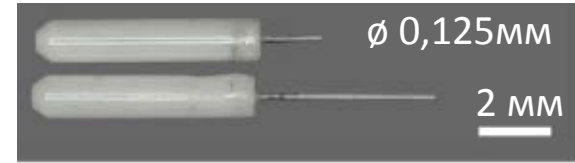
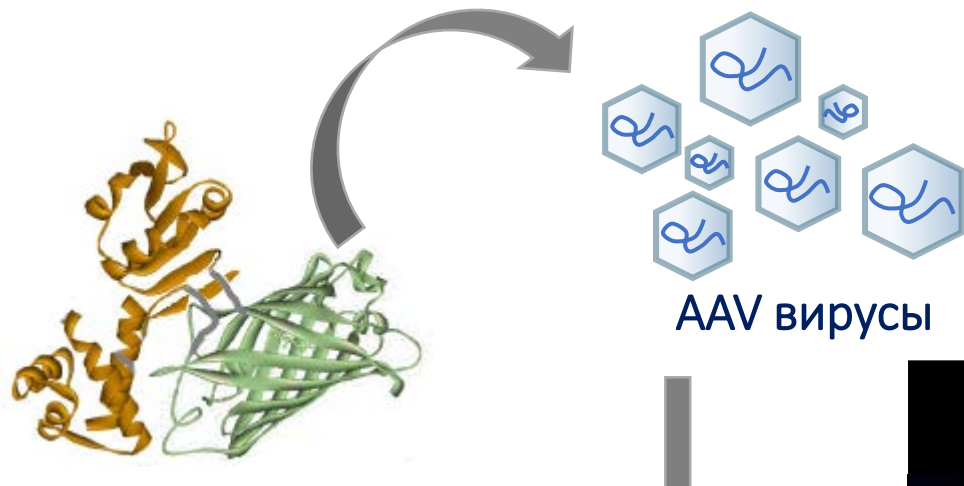
AAV вирусы

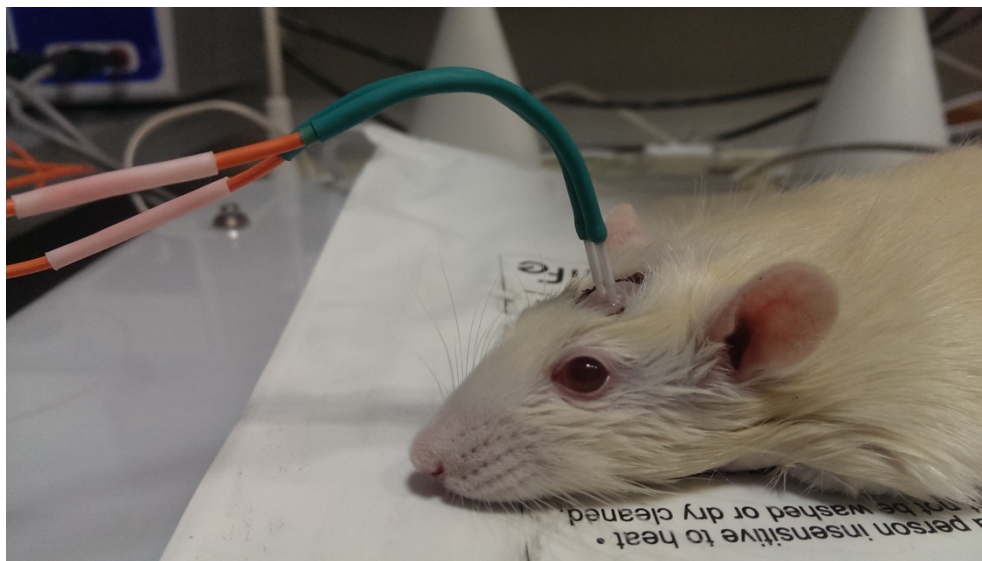


Срез мозга крысы через 4 недели
после инъекции AAV9 с геном
биосенсора HyPer7

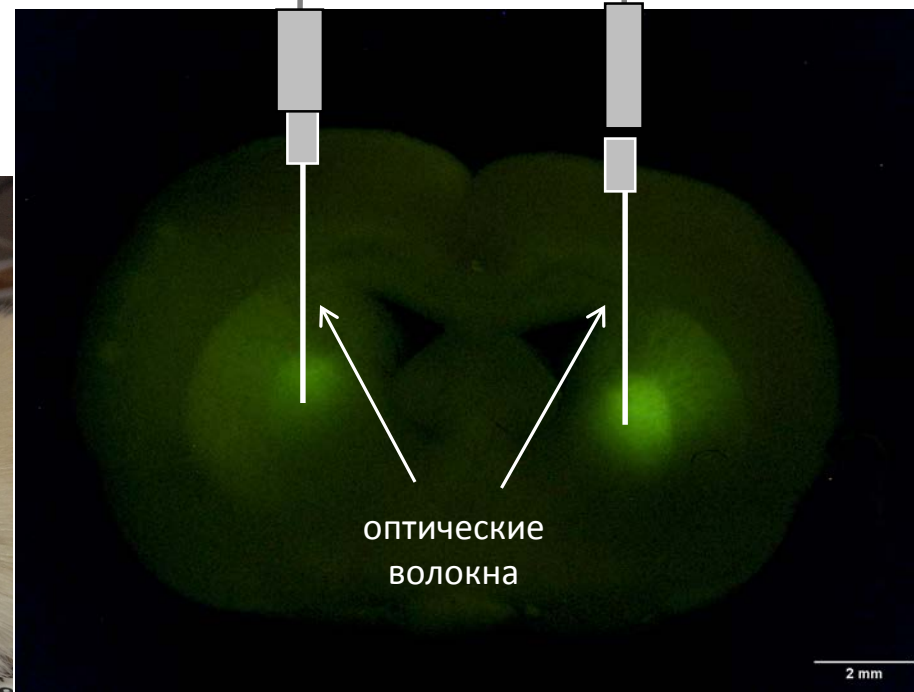


2 mm

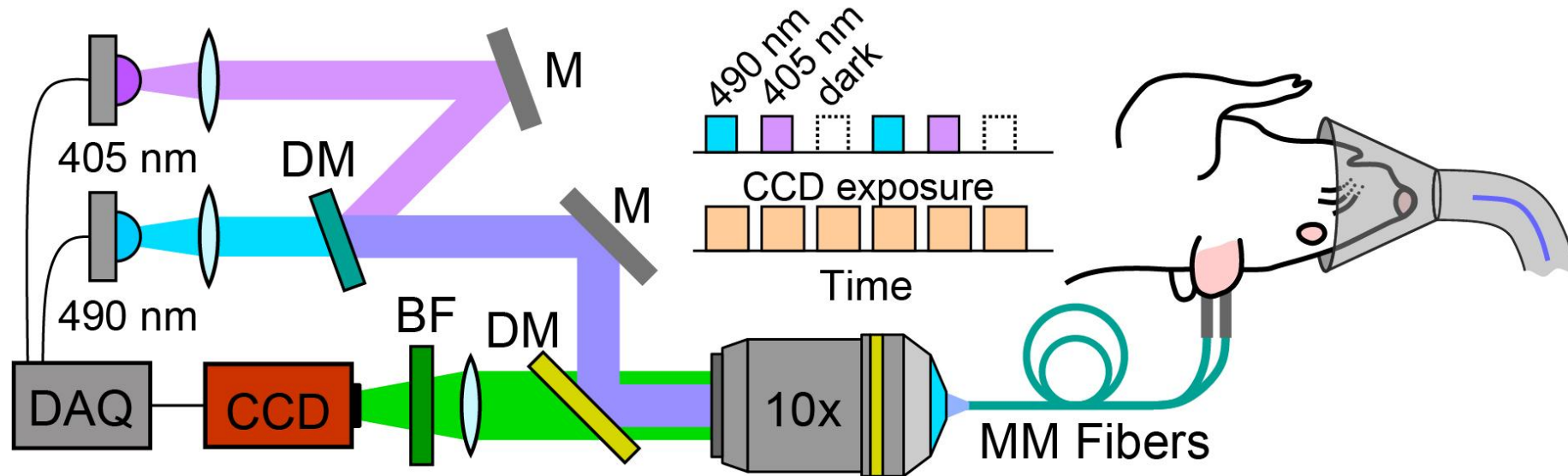




Оптическая схема



Регистрация флуоресцентного сигнала в тканях мозга *in vivo* с помощью оптоволоконного интерфейса

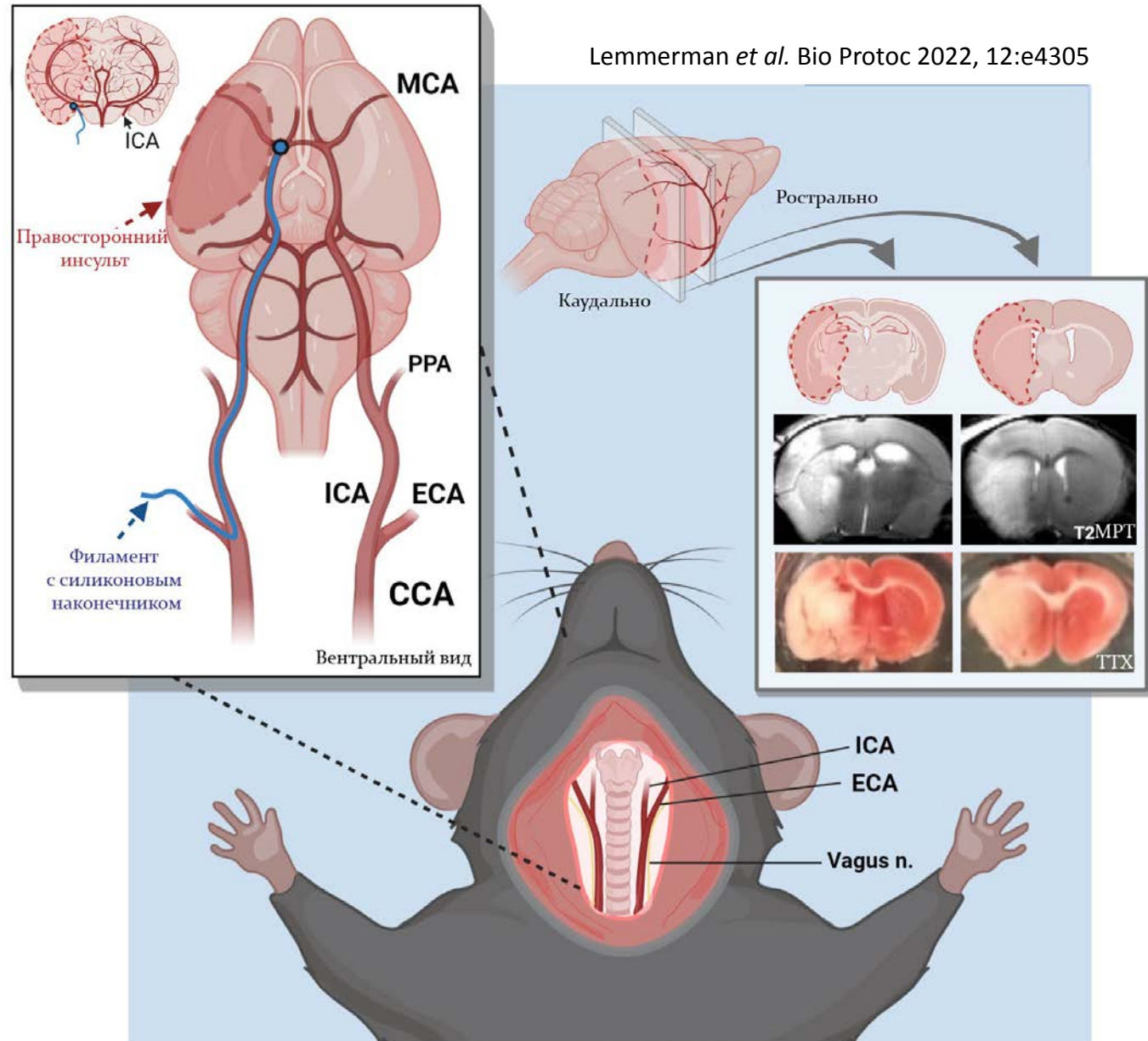


МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ
УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ М.В.ЛОМОНОСОВА

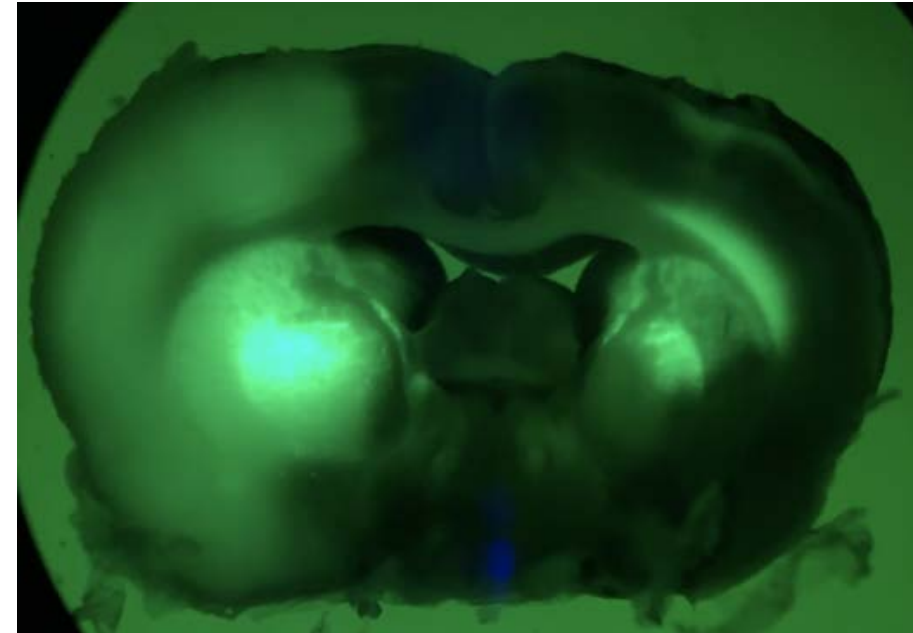
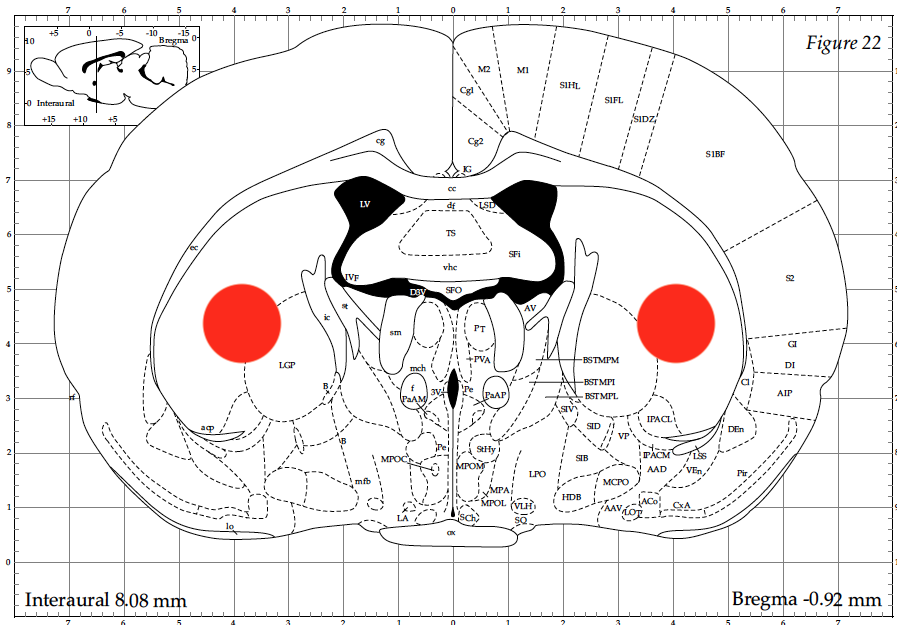
Лаборатория фотоники и
нелинейной спектроскопии



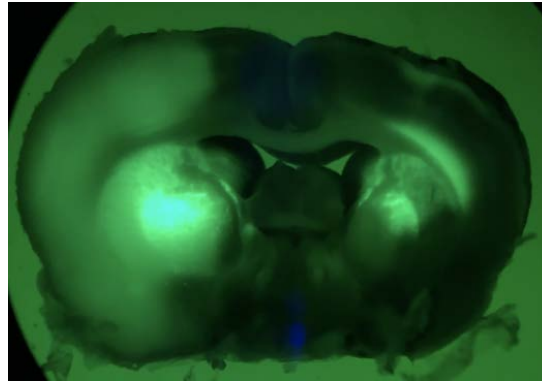
Моделирование ишемического инсульта у крыс путем окклюзии средней мозговой артерии



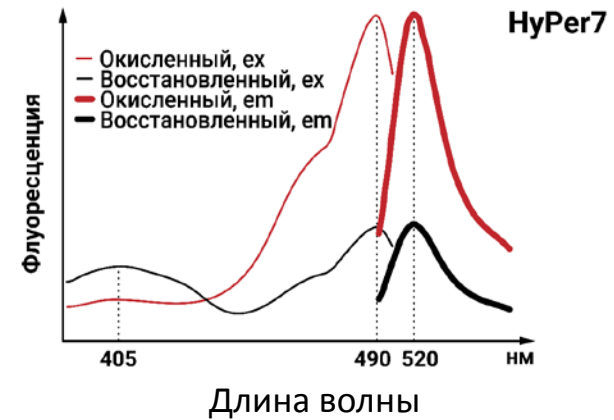
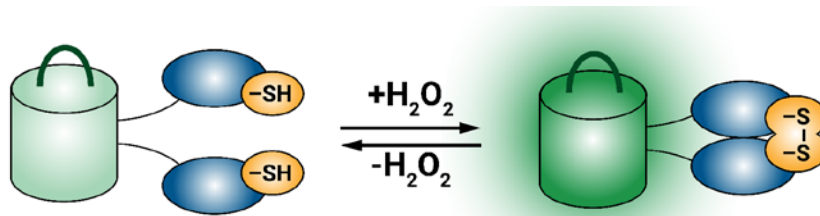
Подбор координат мозга для регистрации событий при развитии ишемического инсульта



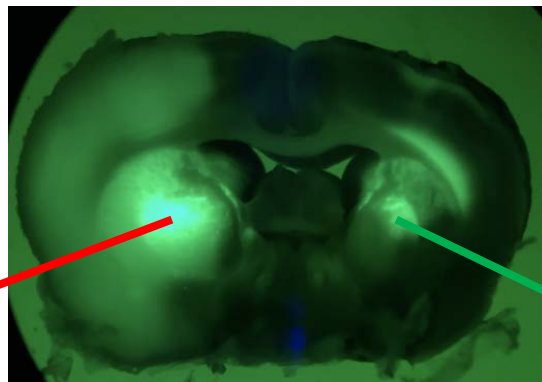
Динамика H_2O_2 в тканях мозга при развитии инсульта



HyPer7 для регистрации H_2O_2



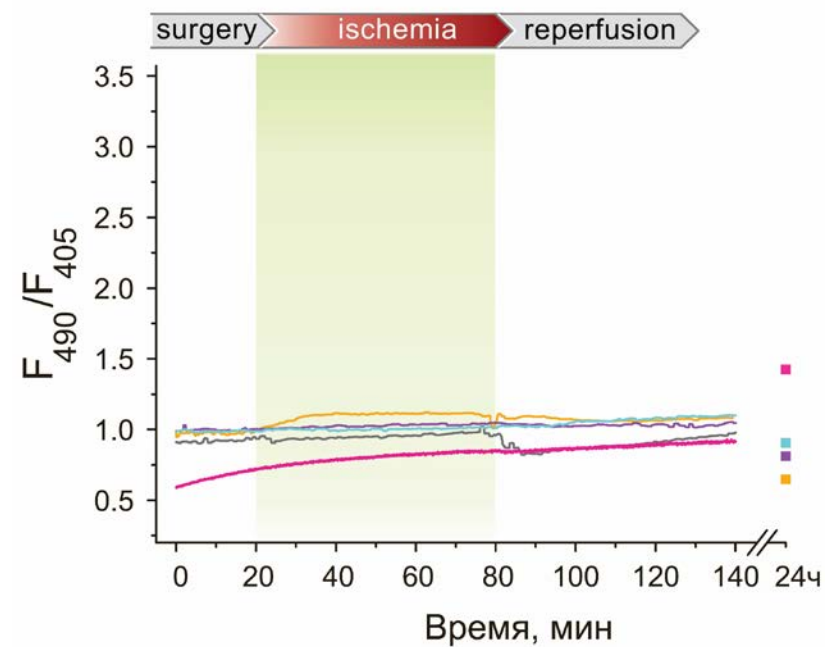
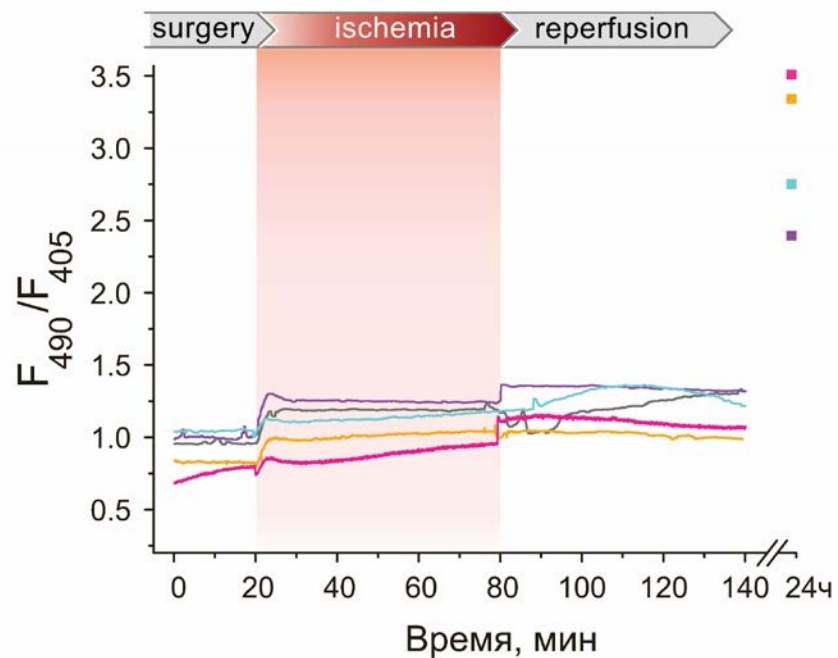
Динамика H_2O_2 в тканях мозга при развитии инсульта



Больное полушарие

H_2O_2 биосенсор HyPer7

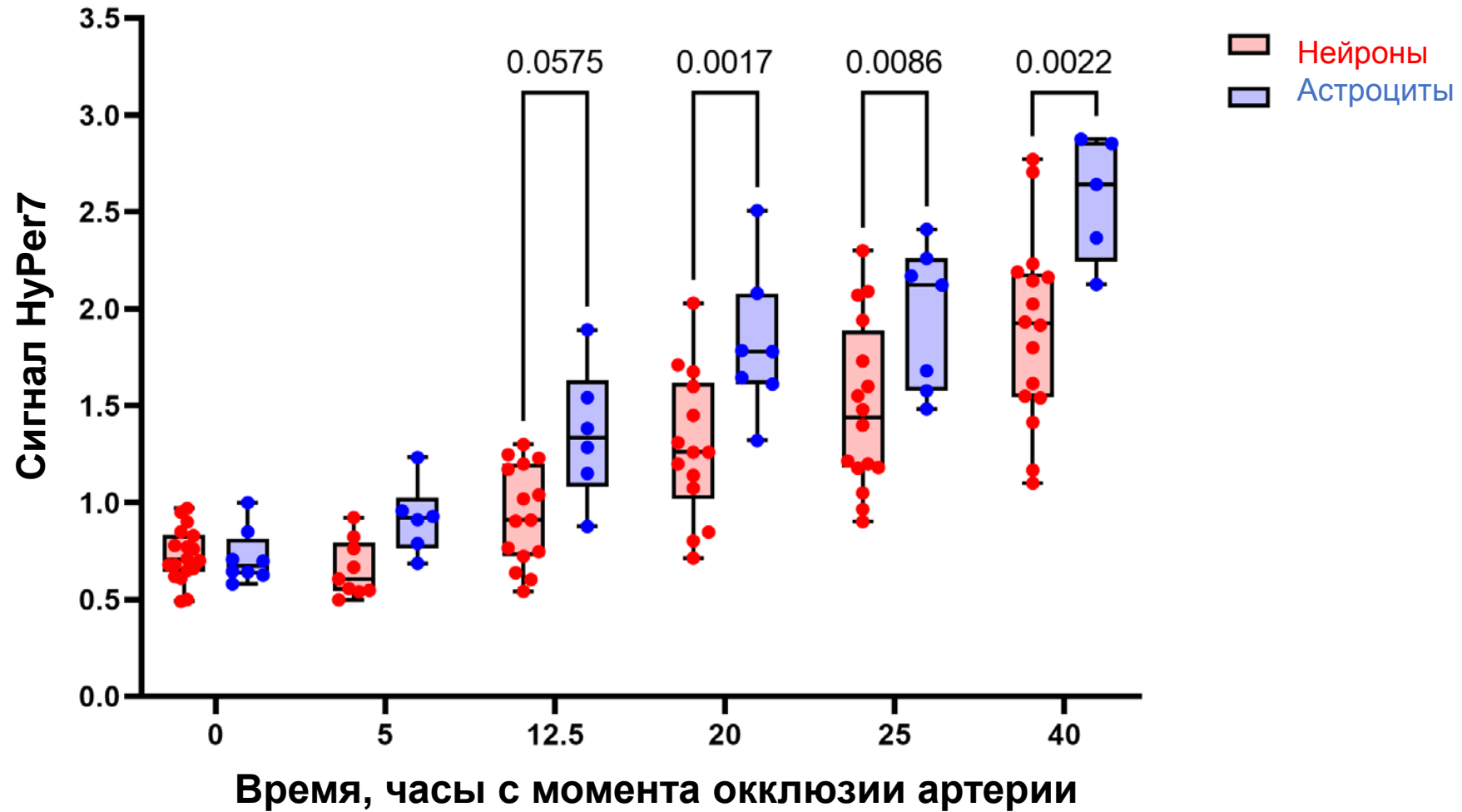
Здоровое полушарие



Динамика H_2O_2 в тканях мозга при развитии инсульта

Сравнение нейронов и астроцитов

Регистрация в центральной зоне инсульта

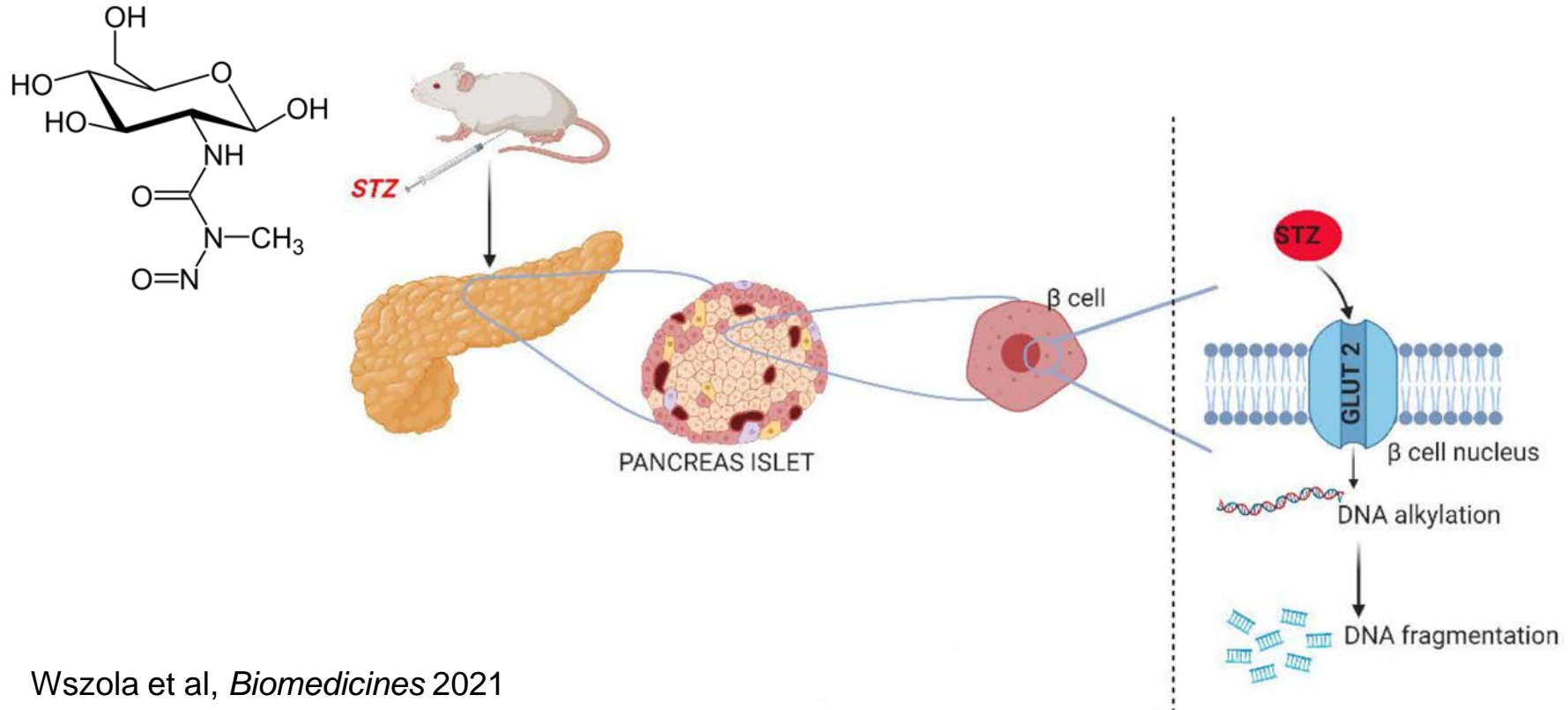


Two-way ANOVA (Mixed-effects model (REML))
Bonferroni correction (Bonferronis multiple comparisons test)

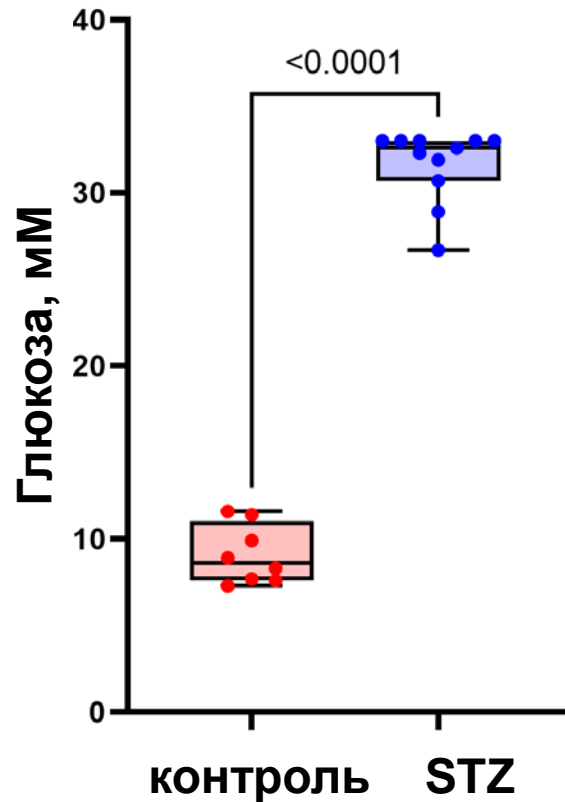
Факт

Гипергликемия ухудшает состояние пациентов с ишемическим инсультом

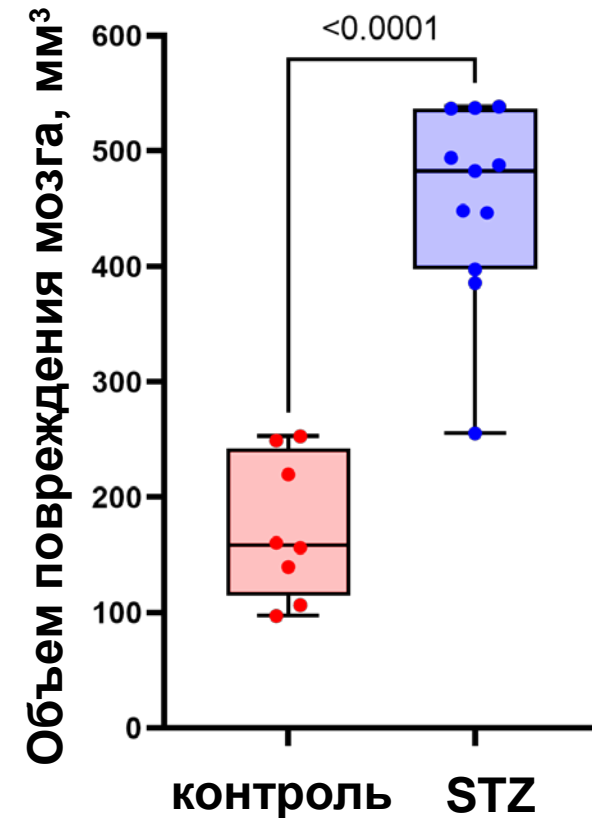
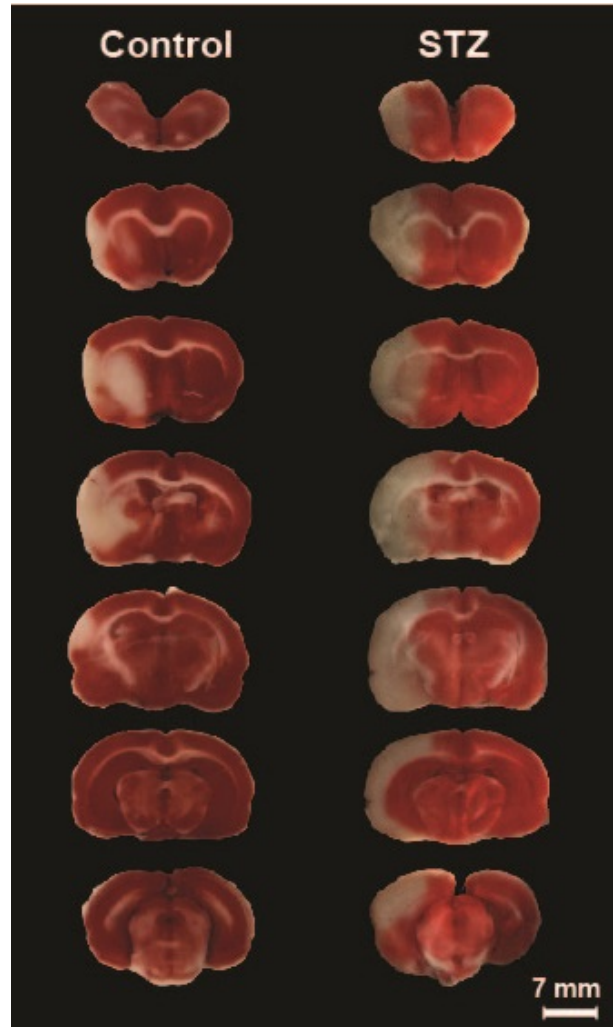
Стрептозотоцин-индуцированная модель диабета



Гипергликемия усугубляет ишемическое повреждение мозга



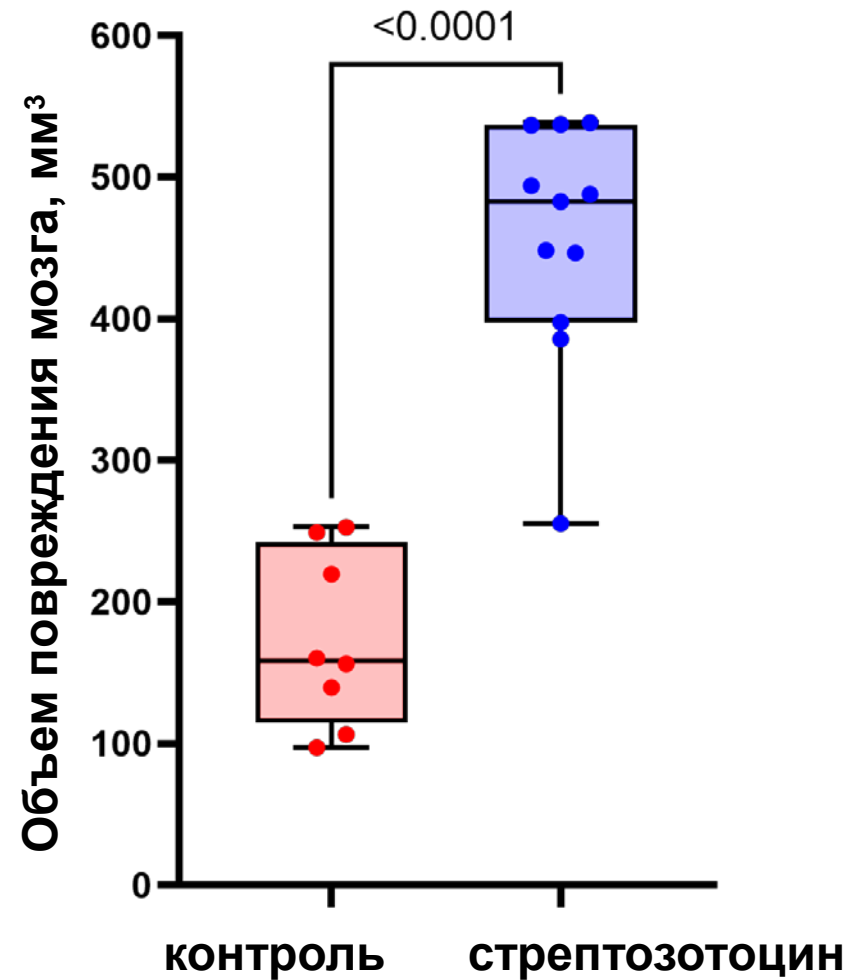
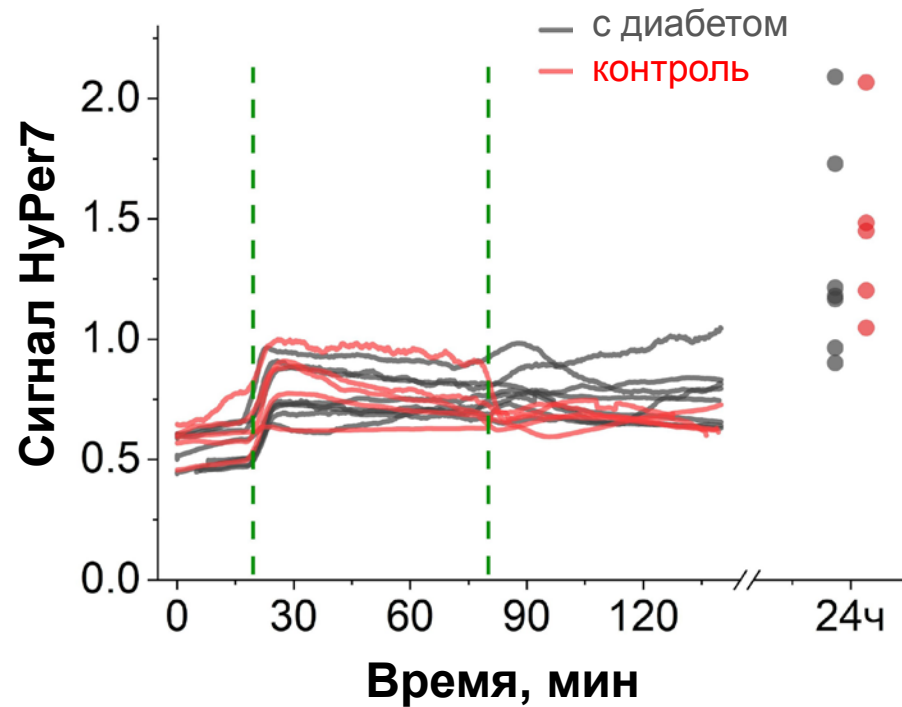
Непарный параметрический t-test



Непарный параметрический t-test

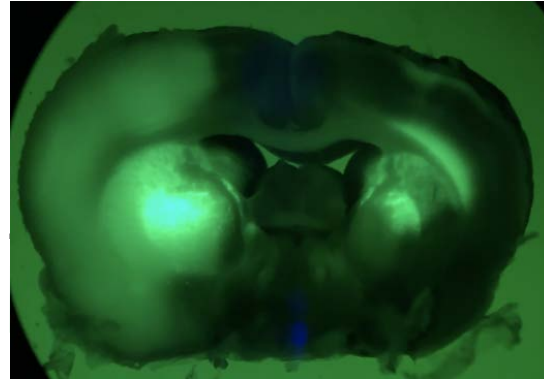
Гипергликемия усугубляет ишемическое повреждение мозга, но не через генерацию H_2O_2

Динамика H_2O_2 в зоне инсульта

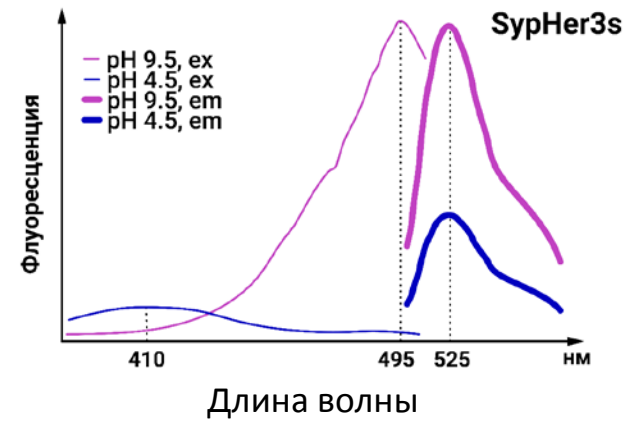
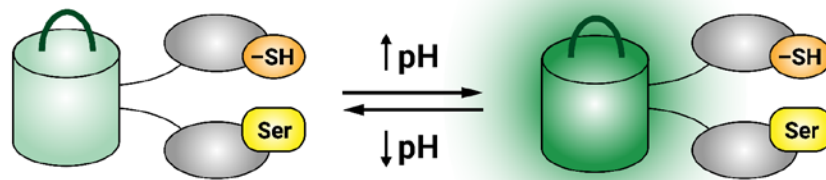


Непарный параметрический t-test

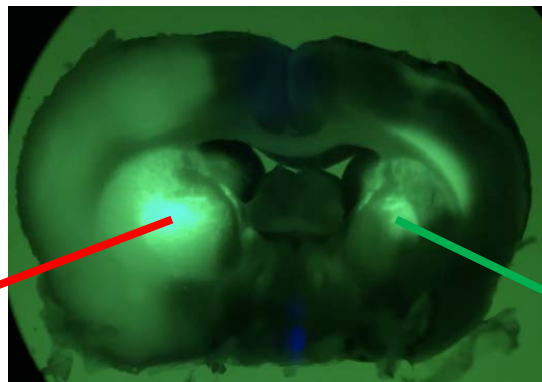
Динамика pH в тканях мозга при развитии инсульта



SypHer3s для регистрации pH



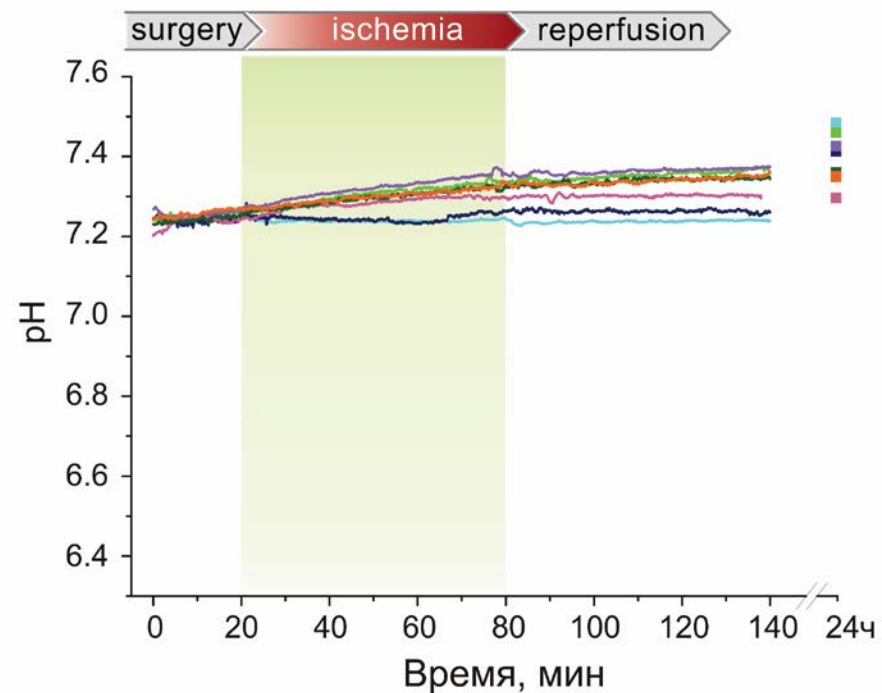
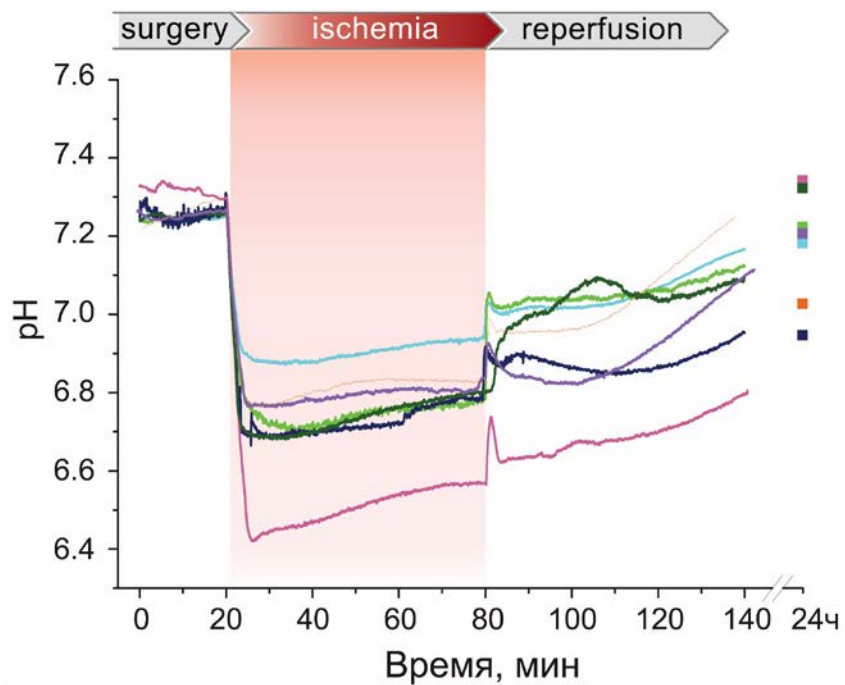
Динамика pH в тканях мозга при развитии инсульта



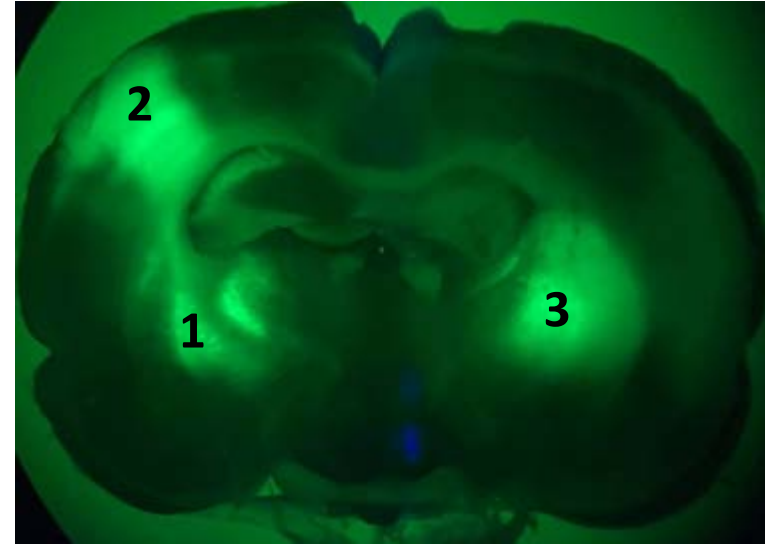
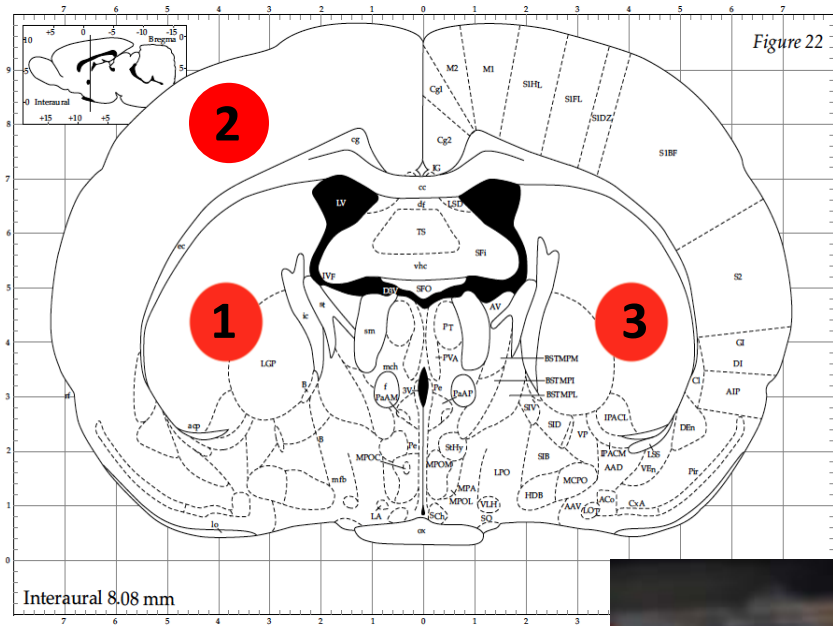
Больное полушарие

pH биосенсор SynHer3s

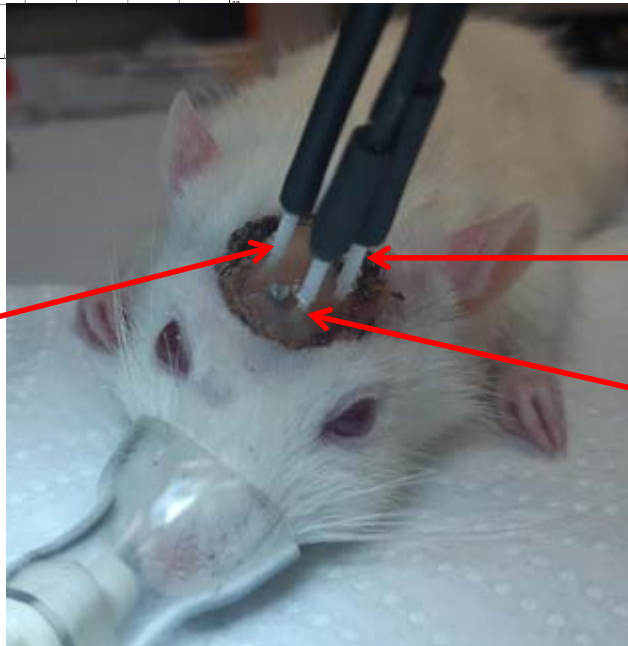
Здоровое полушарие



Регистрация динамики pH одновременно в коре и стриатуме в центральной зоне инсульта

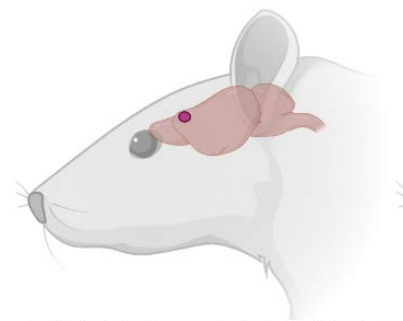
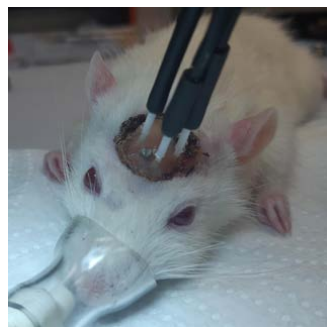


3: Хвостатое ядро –
здоровое полушарие



1: Хвостатое ядро –
центральная зона инсульта

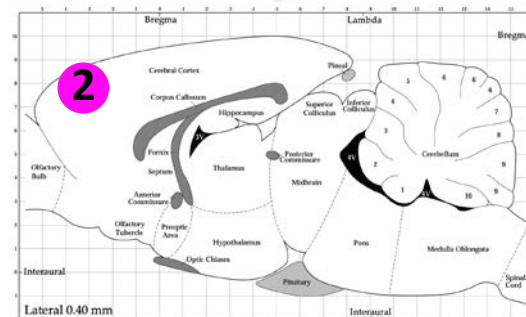
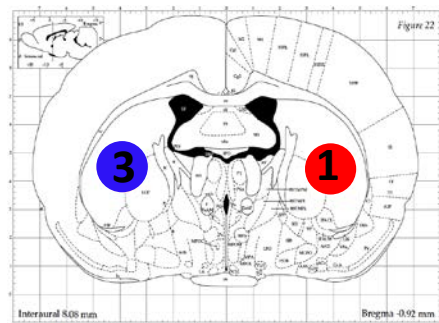
2: Кора
больного полушария



AP +3.2

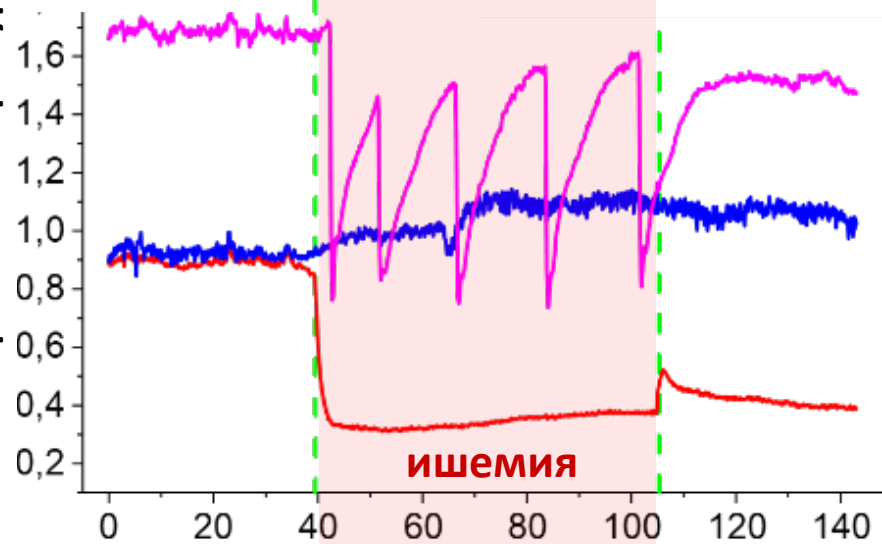
ML -1.0

DV -2.1

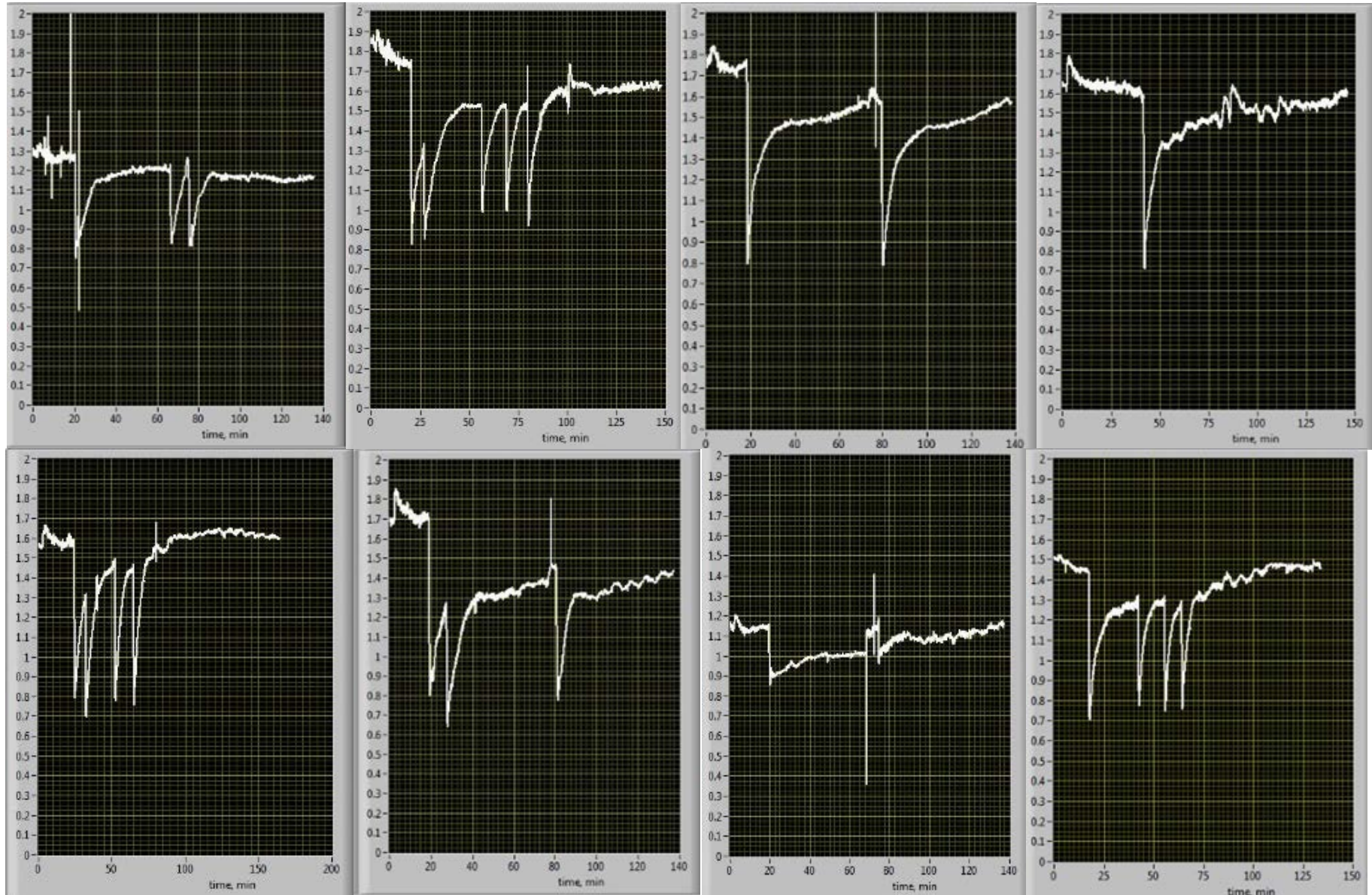


- 1 – рН в стриатуме (эпицентр инсульта)
- 2 – рН в выбранной точке коры
- 3 – рН в стриатуме здорового полушария

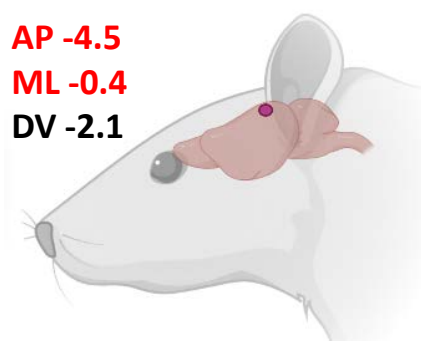
Сигнал рН-биосенсора SурНer3s



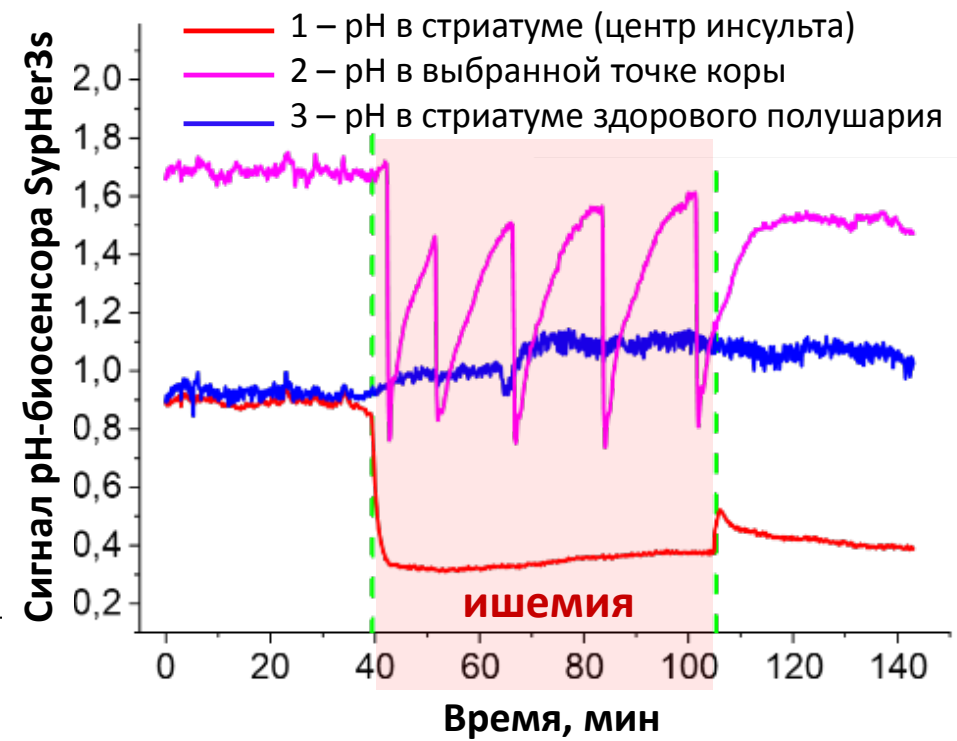
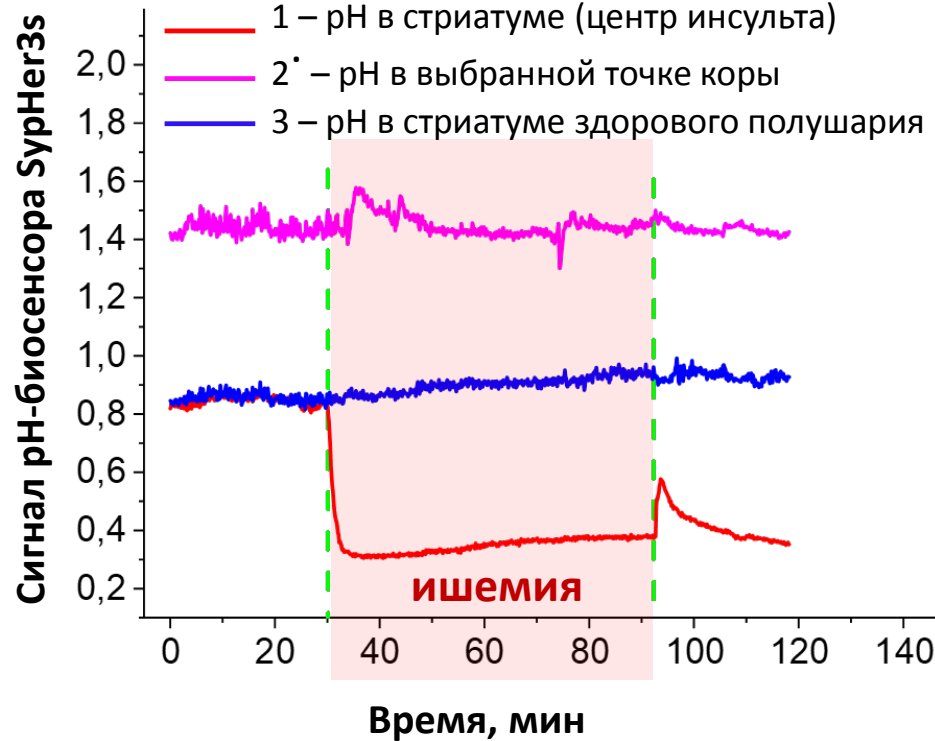
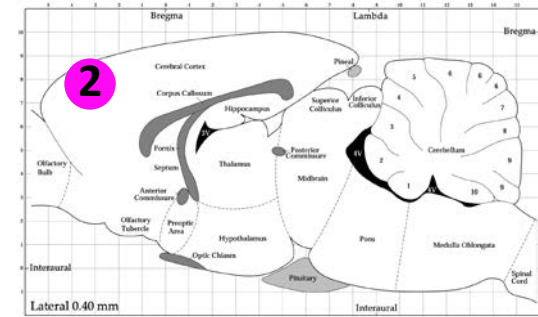
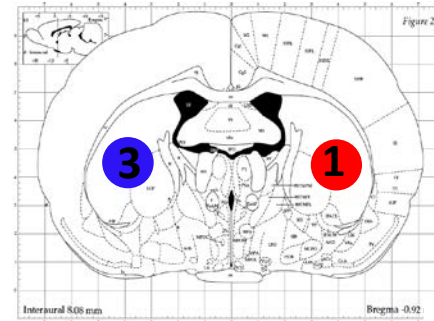
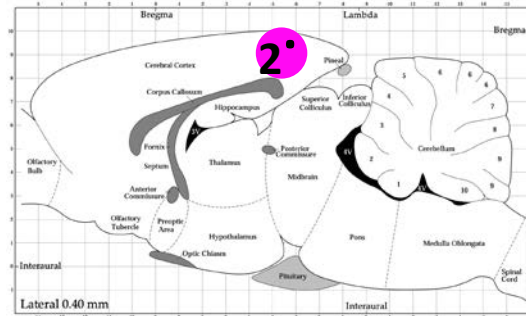
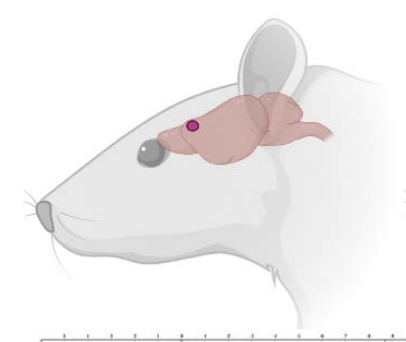
Примеры «ацидозных пиков» в тканях коры, входящих в зону пенумбры ишемического инсульта



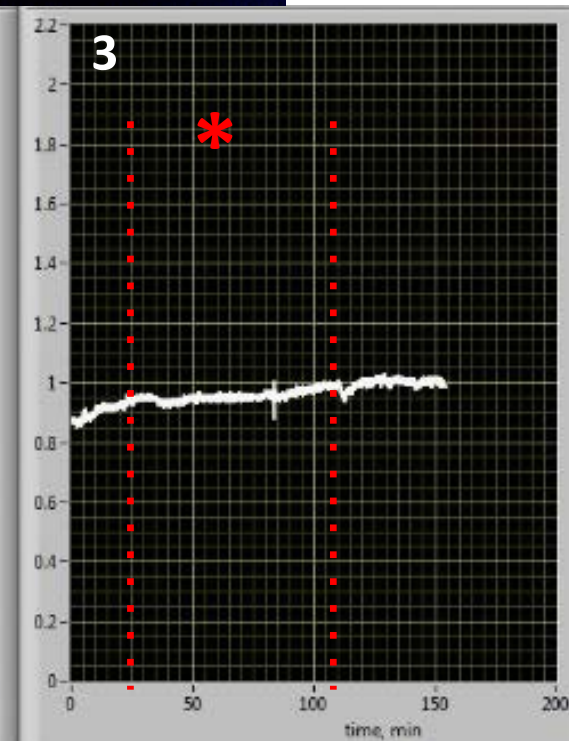
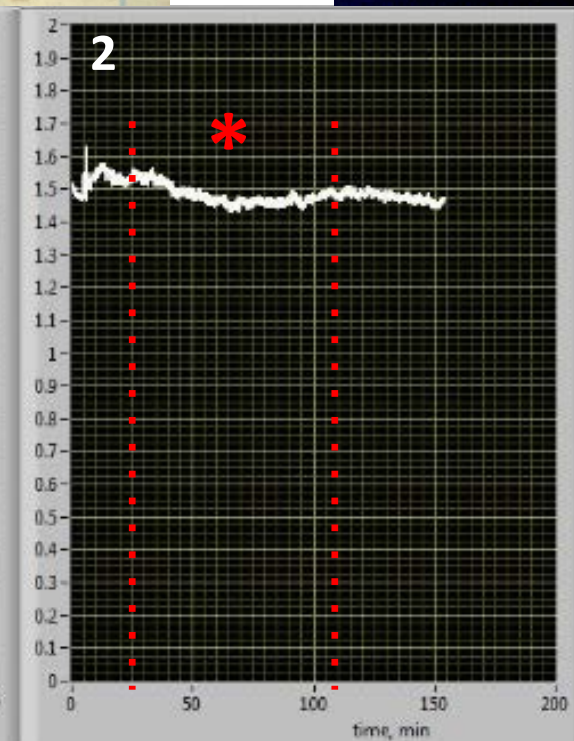
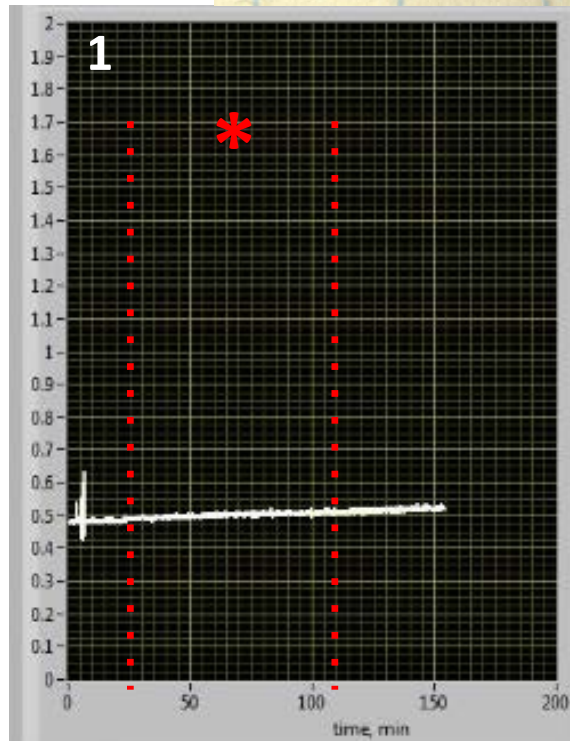
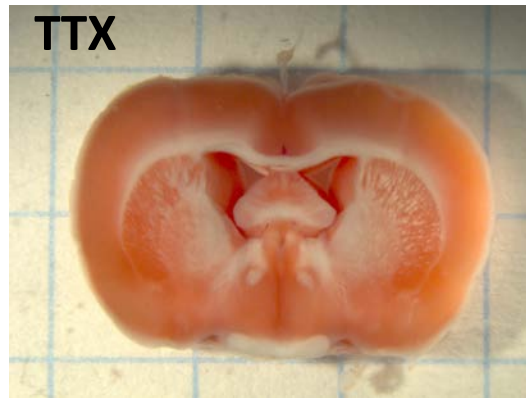
AP -4.5
ML -0.4
DV -2.1



AP +3.2
ML -1.0
DV -2.1



Отсутствие выраженных изменений флуоресцентного сигнала у ложнооперированных животных



* Оклюдер вводится во внутреннюю сонную артерию, но без перекрытия средней мозговой артерии

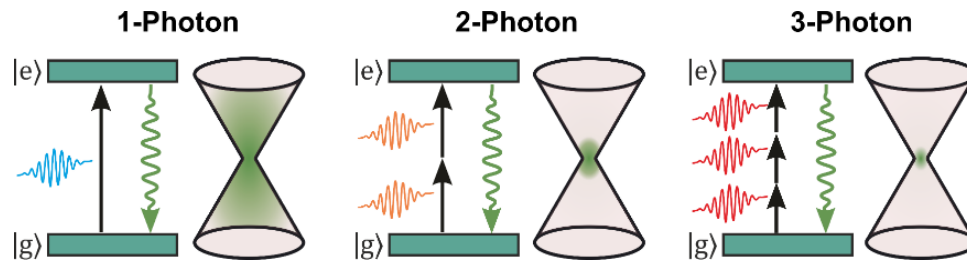
SypHer3s-cyto-Neurons in vivo

Эксперименты на живых анестезированных мышах

Совместно с Александром Ланиным
Лаборатория фотоники и нелинейной спектроскопии

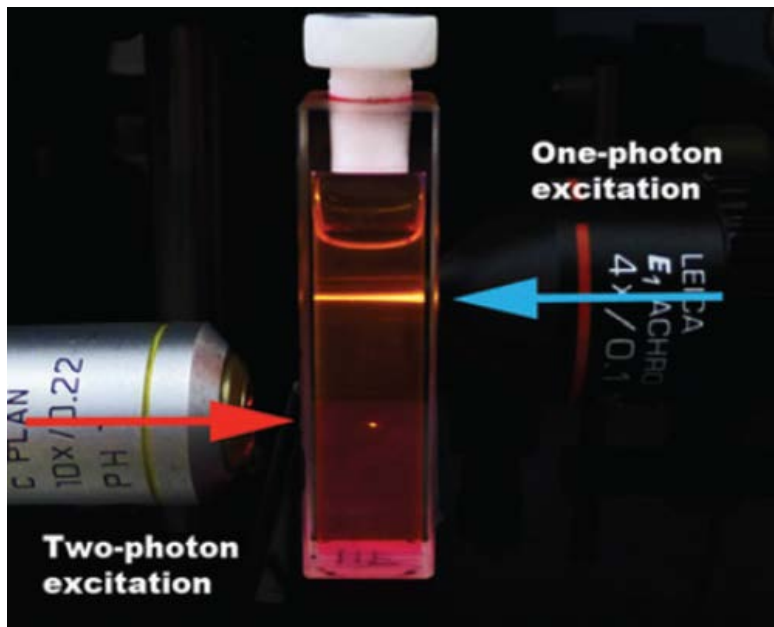


Нелинейно-оптическая многофотонная микроскопия



Преимущества:

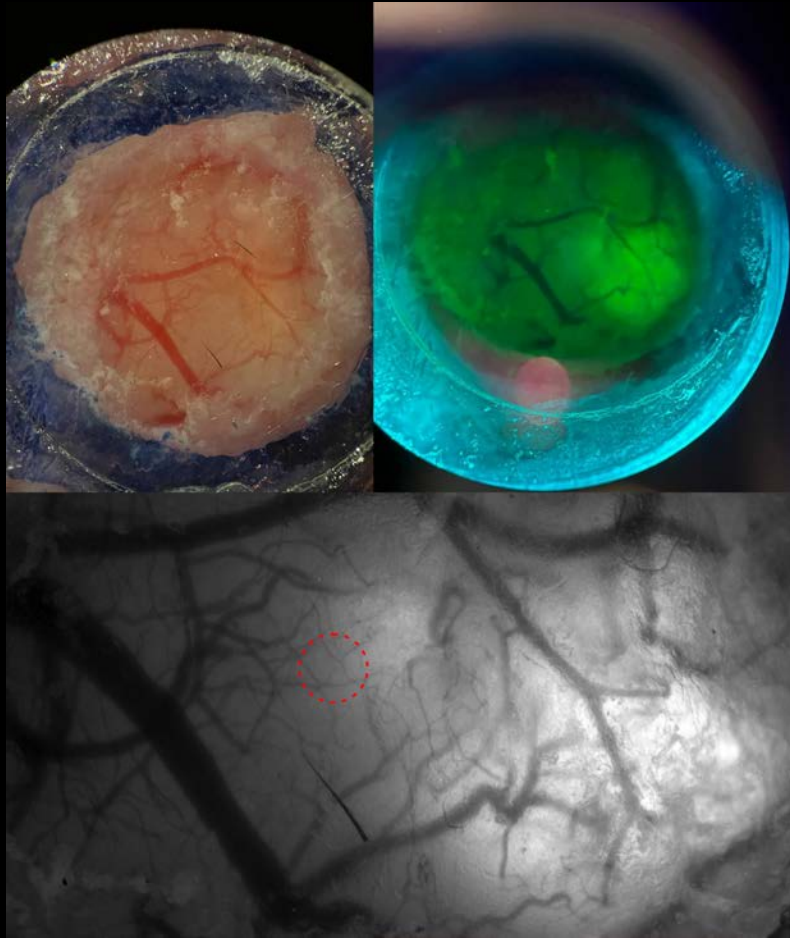
- Локальность отклика
- Глубина визуализации (до 2 мм)
- Мультимодажность
- Спектральная селективность



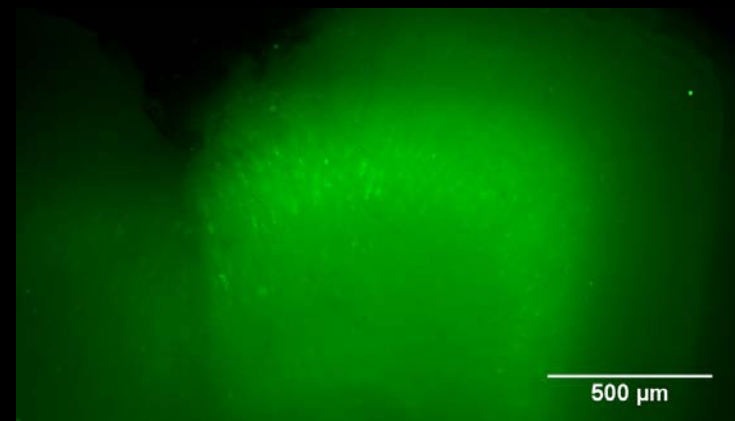
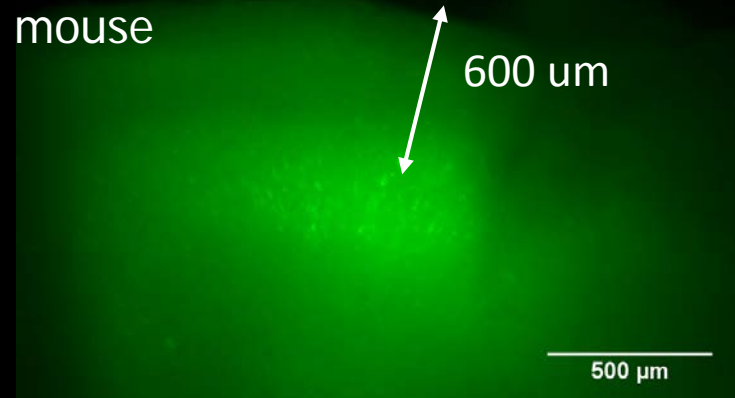
Модальности:

- Двух- и трехфотонная флуоресцентная микроскопи
- Безмаркерная микроскопия генерации второй и третьей гармоник, когерентная рамановская микроскопия

Hyper7 *in vitro*, *ex vivo*, *in vivo*



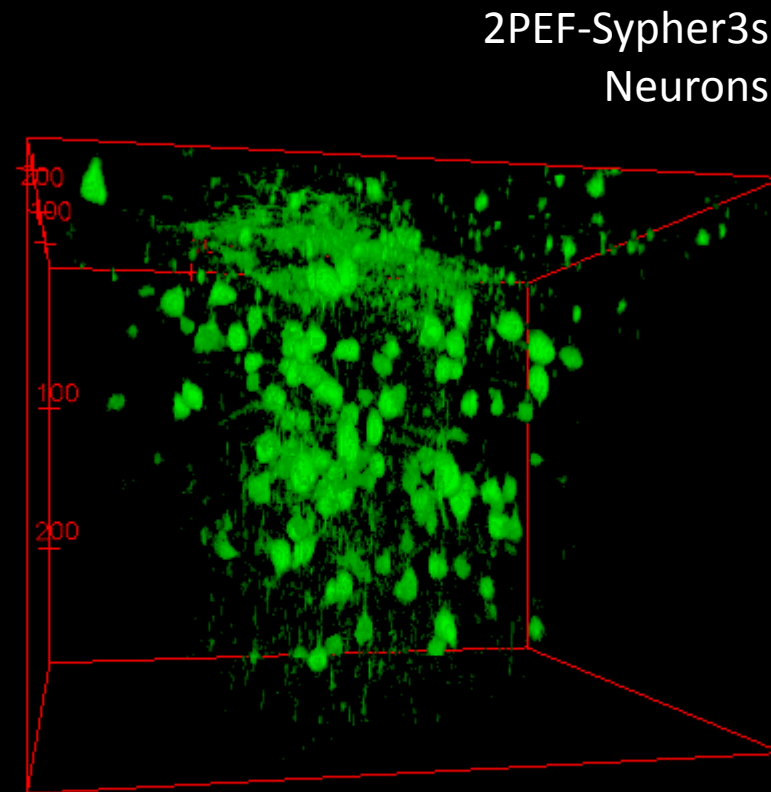
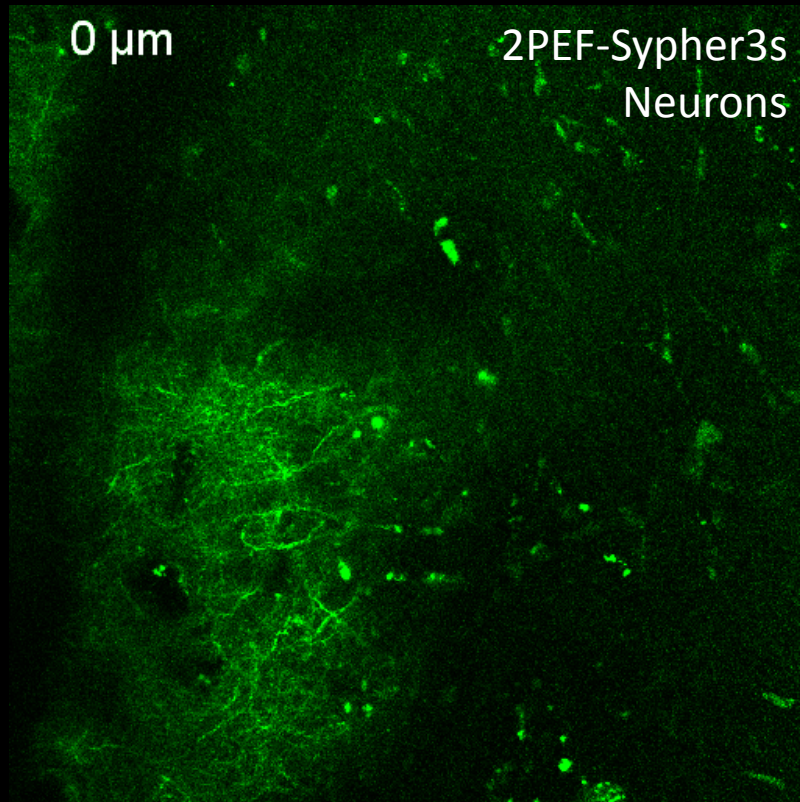
mito-Hyper7-neurons expression in a mouse



SypHer3s-cyto-Neurons in vivo: Deep microscopy

Experiments with alive anesthetized animals

OPO @980 nm, II/III layer of neocortex

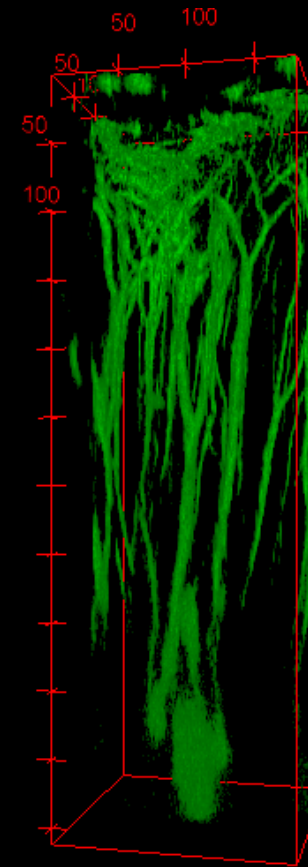
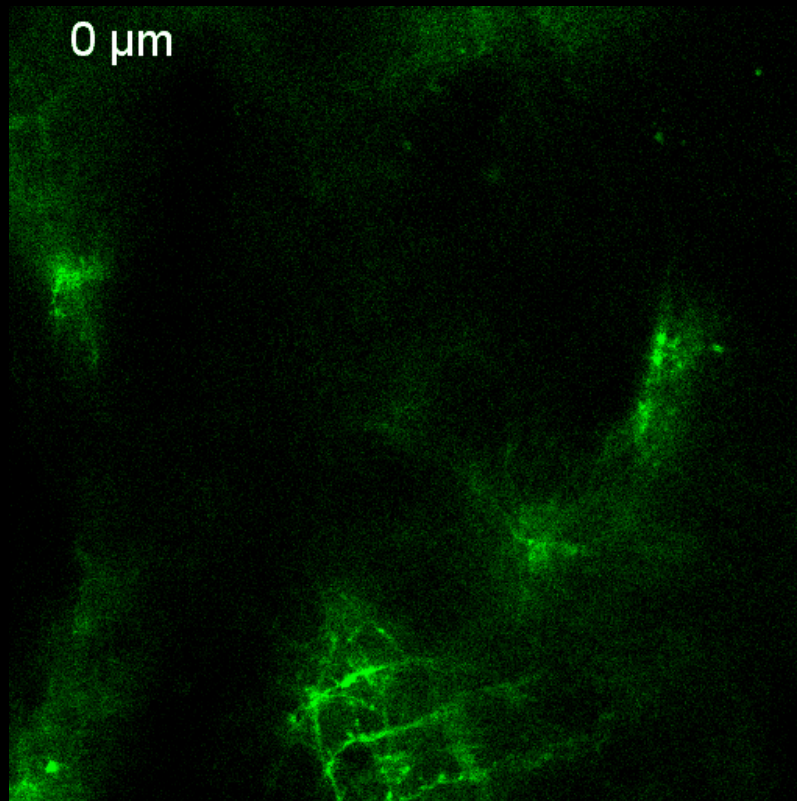


SypHer3s-cyto-Neurons in vivo: Deep microscopy

Experiments with alive anesthetized animals

OPO @980 nm, up to pyramidal neurons

700 μm depth



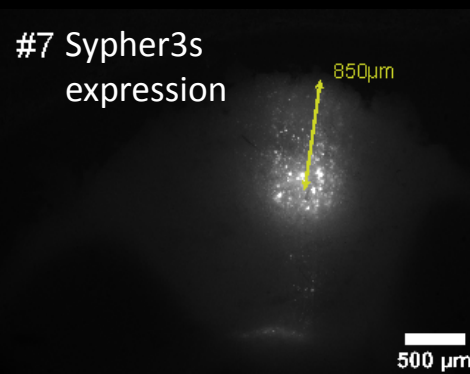
SypHer3s-cyto-Neurons in vivo: фотоиндуцированный инсульт

Photo-induced occlusion of blood vessels in mouse brain tissues

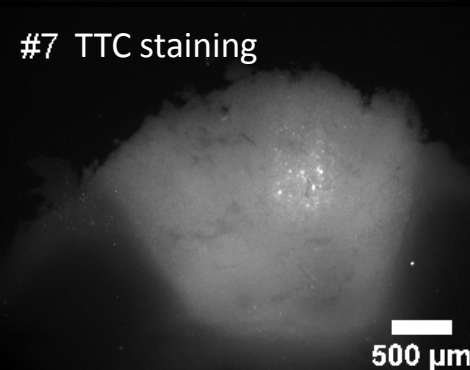
- Dye **Bengal Rose** injection in mouse stomach
- Intense irradiation of **Bengal Rose** at 550 nm

Transfection and damage controls

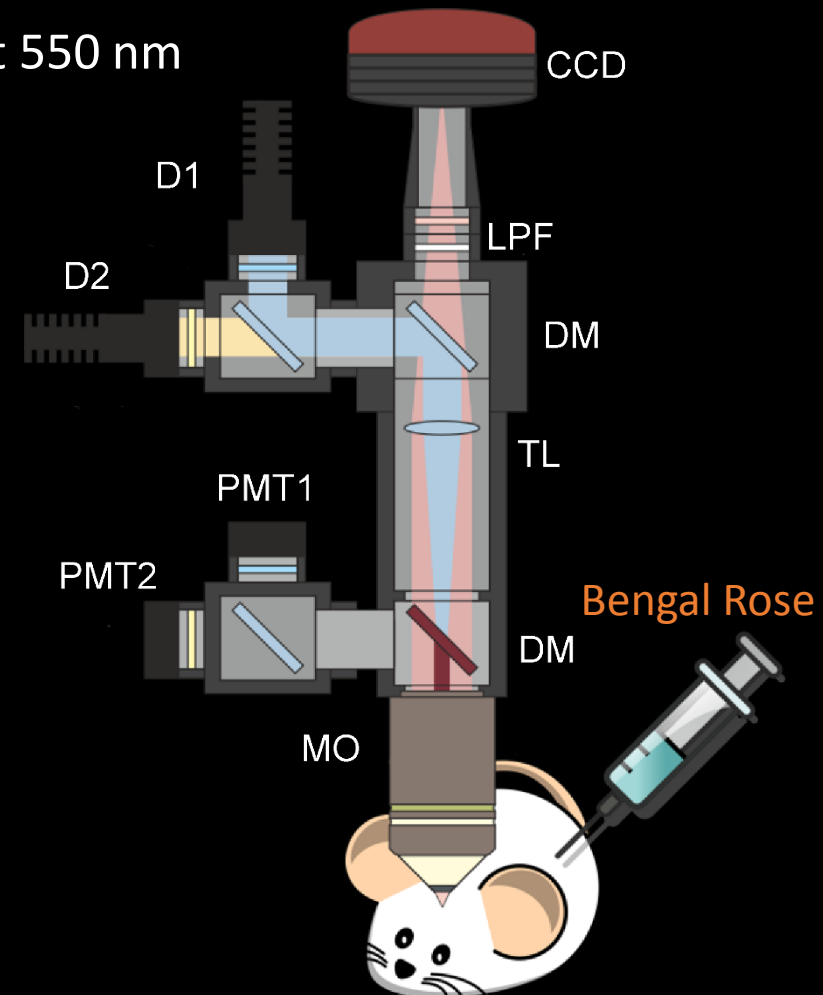
#7 Sypher3s expression



#7 TTC staining



Vessels occlusion

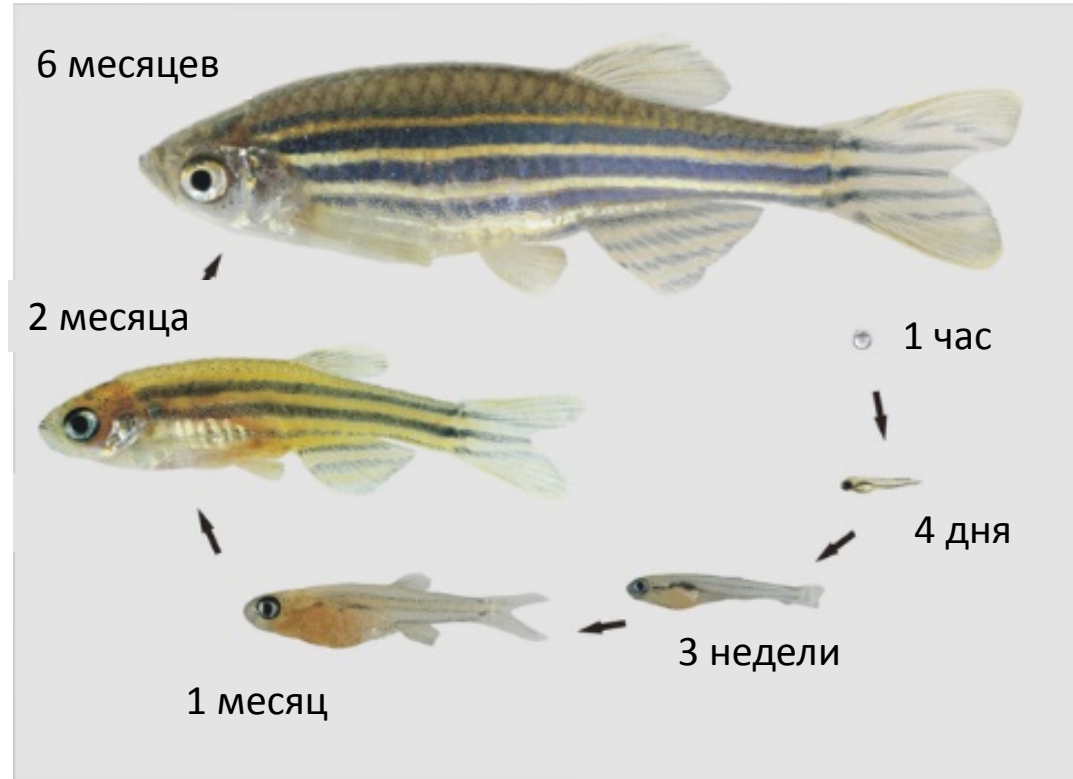


**Исследование метаболизма в норме и
патологии возможно не только на
млекопитающих**

Модельный организм – рыба *Danio rerio*

Характеристики:

- Большое количество потомства
- Быстрое развитие
- Простое и недорогое содержание
- Легко вносить модификации в геном
- Идеально для микроскопии
- Можно использовать для моделирования заболеваний человека



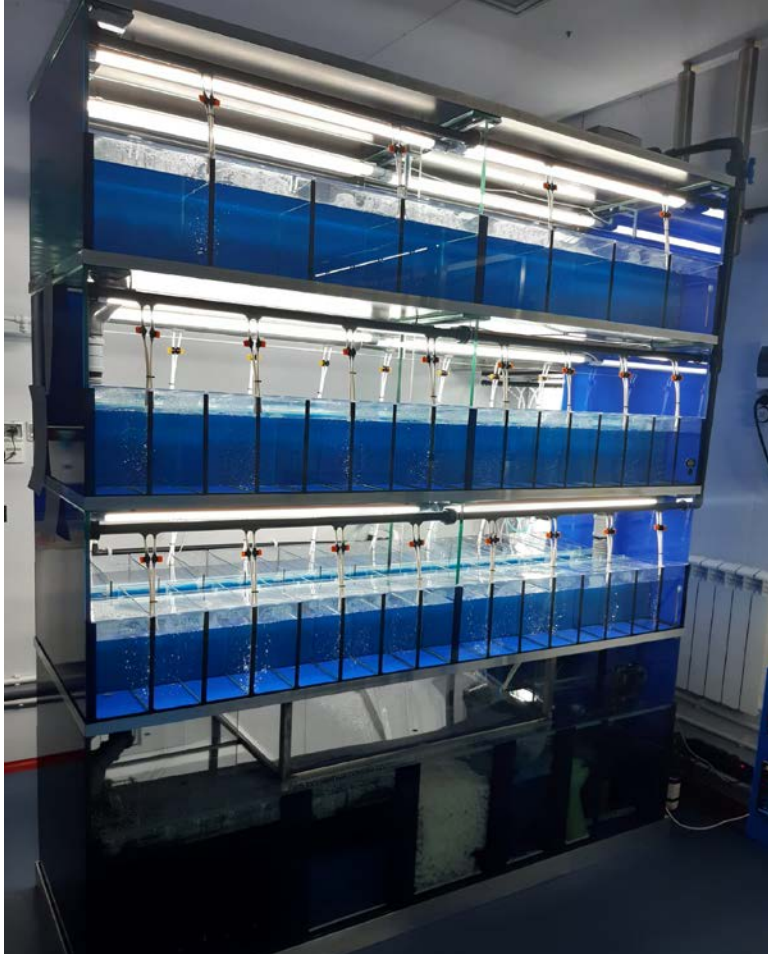
<https://www.eb.tuebingen.mpg.de/emeriti/research-group-colour-pattern-formation/>



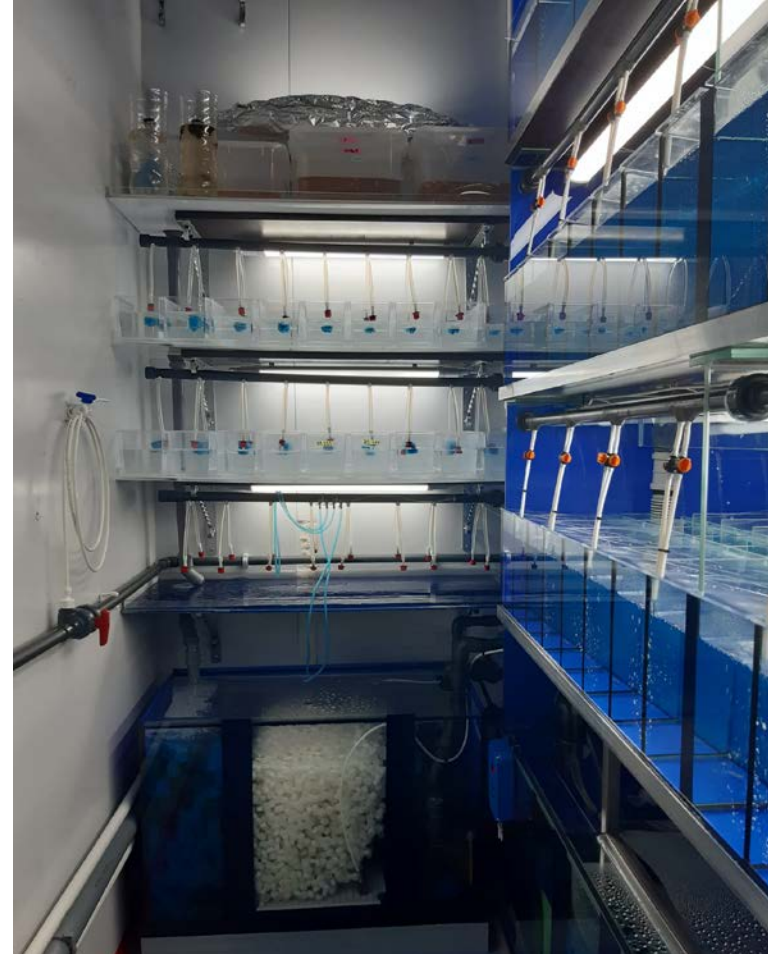
Содержание рыб *Danio rerio*

Опыт в обустройстве помещений для рыб, постройка систем жизнеобеспечения

Установка для взрослых рыб

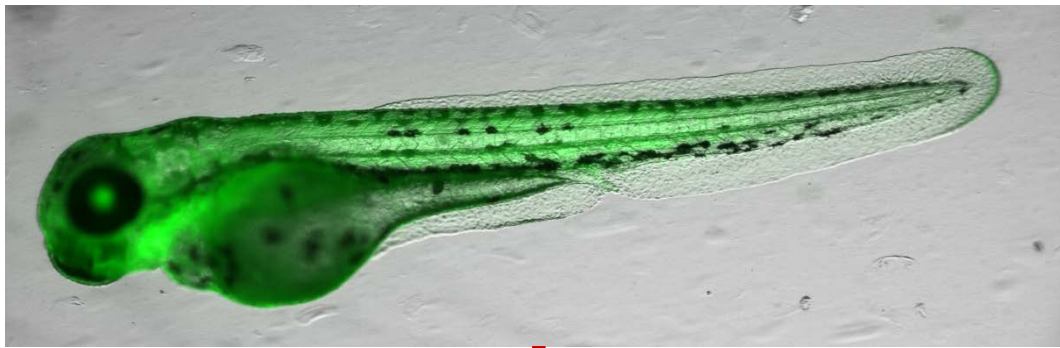


Установка для мальков



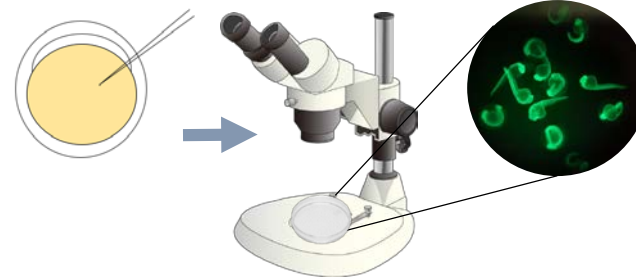
D. rerio содержатся в комнате, оборудованной климат-контролем, в собранных в нашей лаборатории аквариумных установках.

Параметры воды строго контролируются и поддерживаются в оптимальном диапазоне.



1

Инъекция мРНК биосенсора



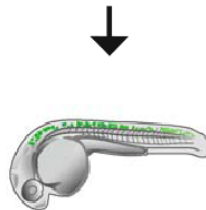
2 ↓

Трансгенез с помощью системы Tol2 транспозонов

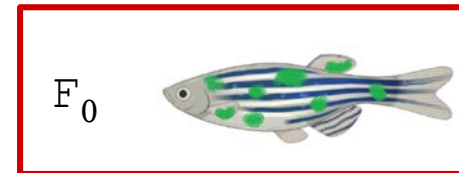
мРНК Tol2 транспозазы Плазмидная ДНК с геном биосенсора, промотором и элементами для транспозиции



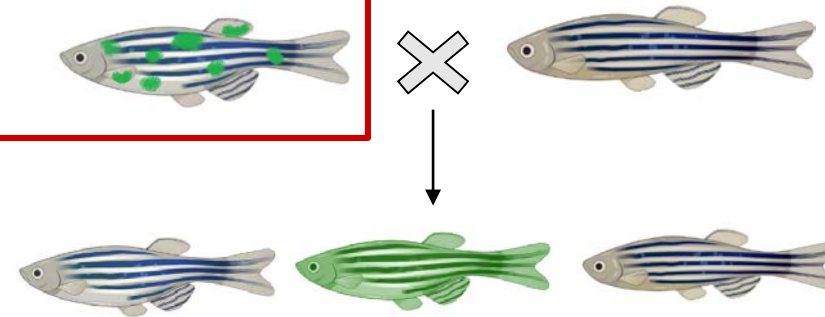
Микроинъекция в оплодотворенное яйцо



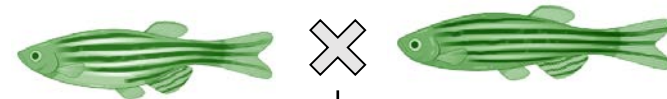
Фаундеры с мозаичной экспрессией



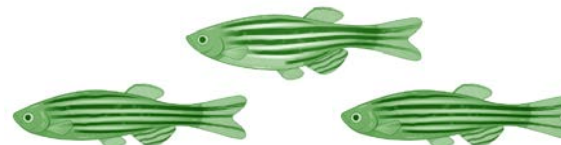
F₀



F₁

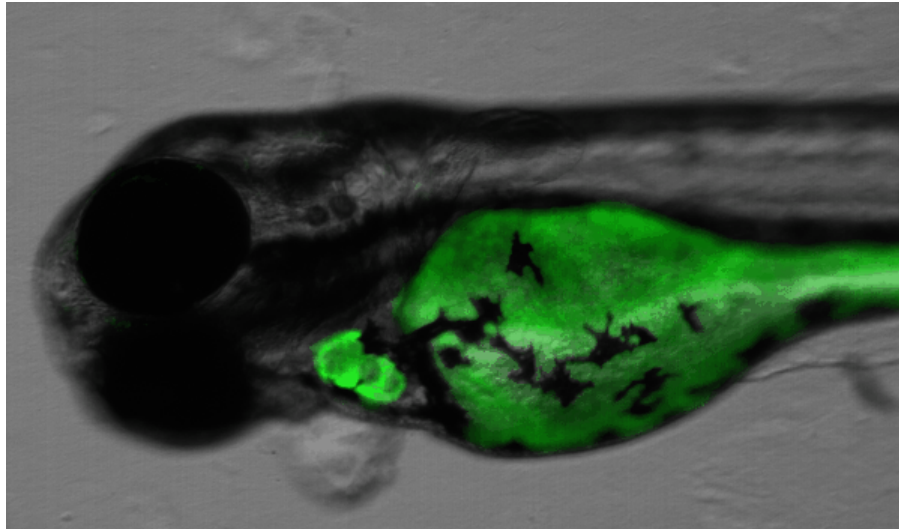


F₂



Модель гипоксии тканей сердца

D. rerio с экспрессией в сердце гена биосенсора на основе srYFP
На примере рН-биосенсора SypHer3s

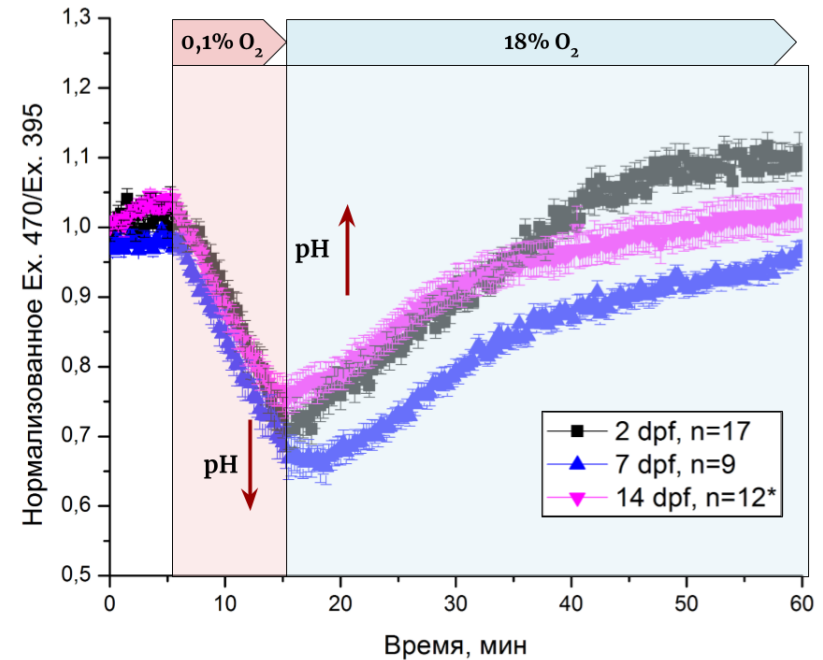


Cmlc2-SypHer3s

Упрощенная схема установки для моделирования гипоксии

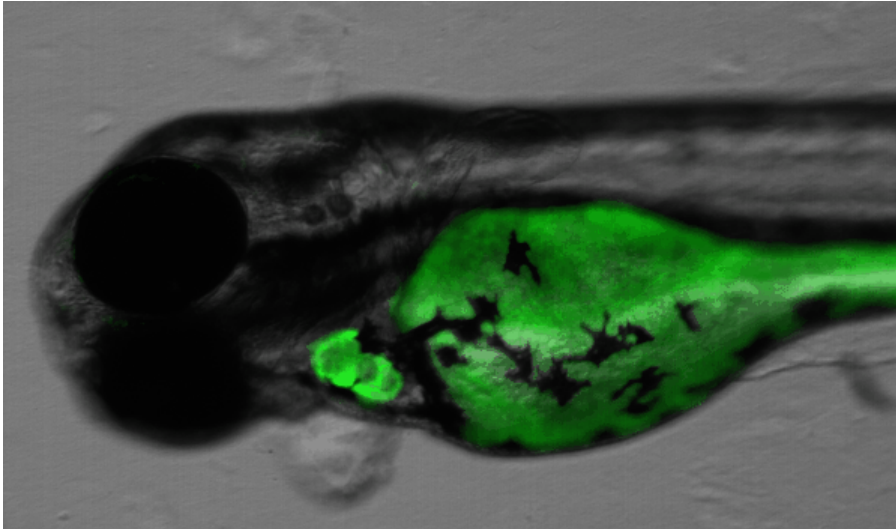


Динамика рН в тканях сердца

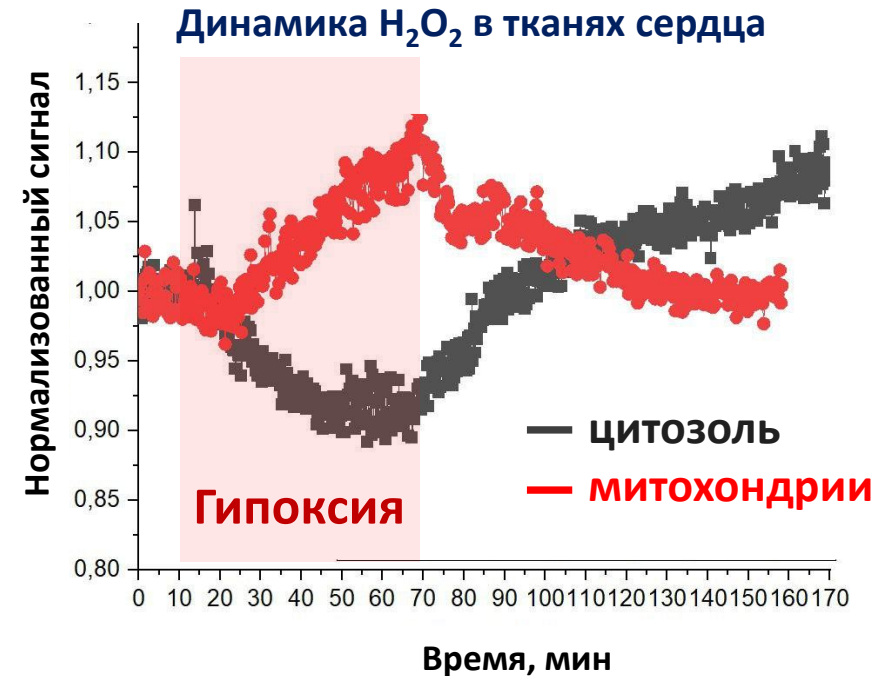
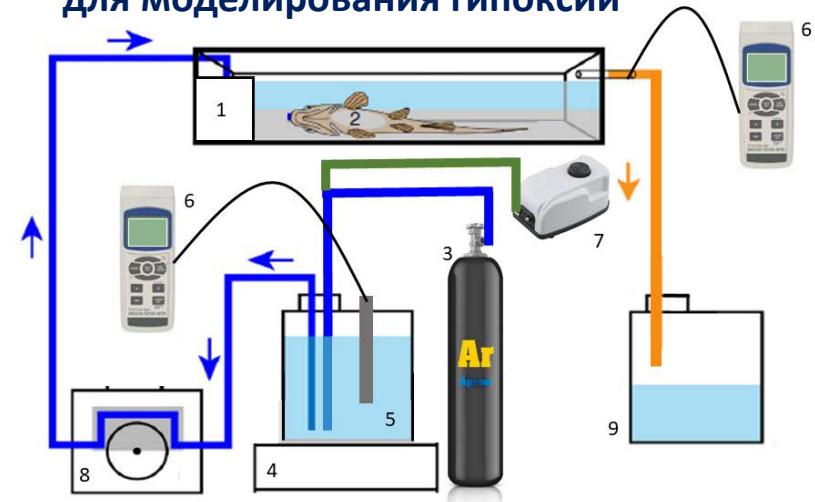


Модель гипоксии тканей сердца

D. rerio с экспрессией в сердце гена биосенсора на основе srYFP
На примере pH-биосенсора SypHer3s

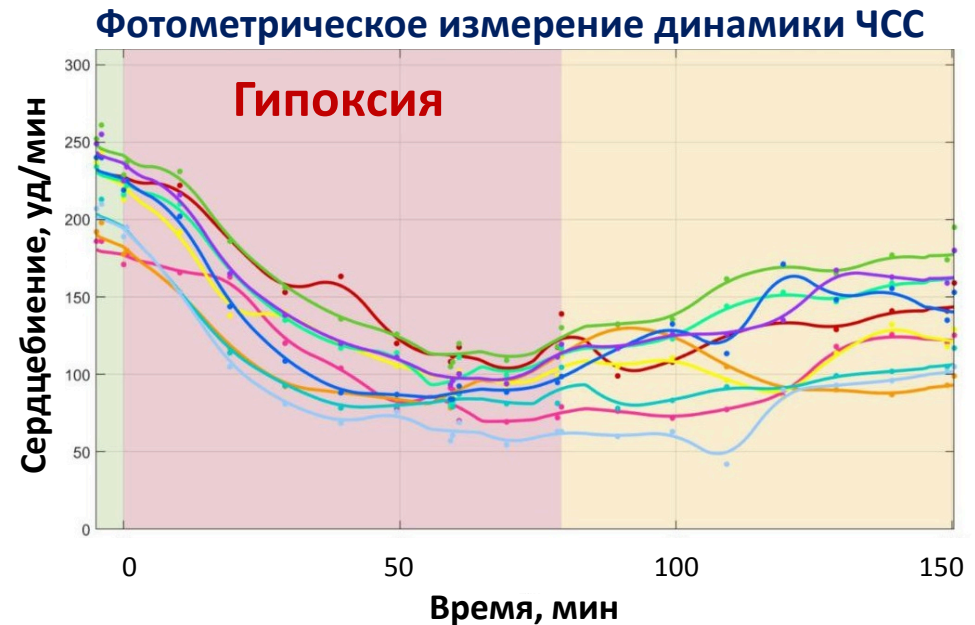
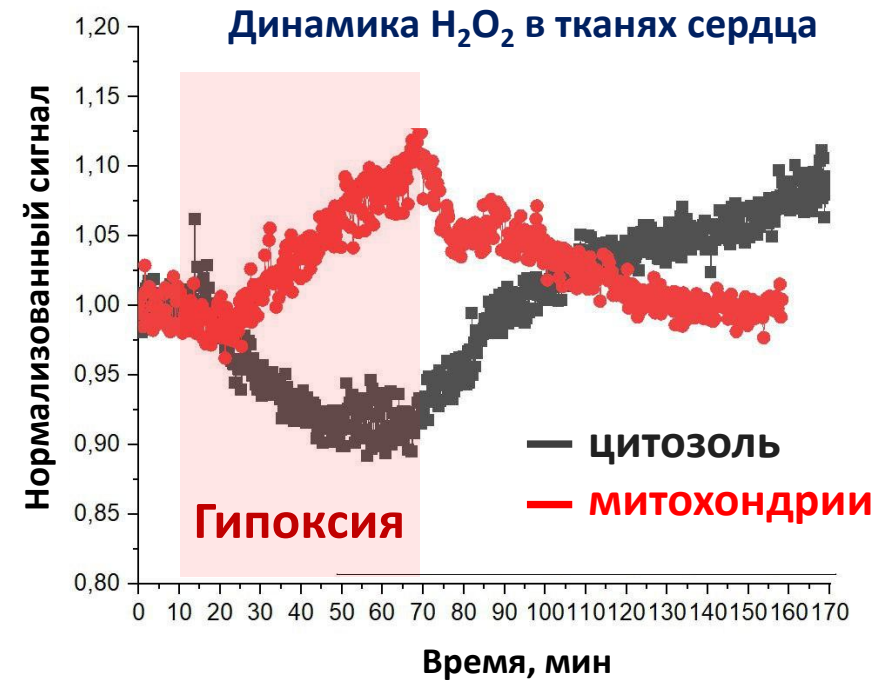
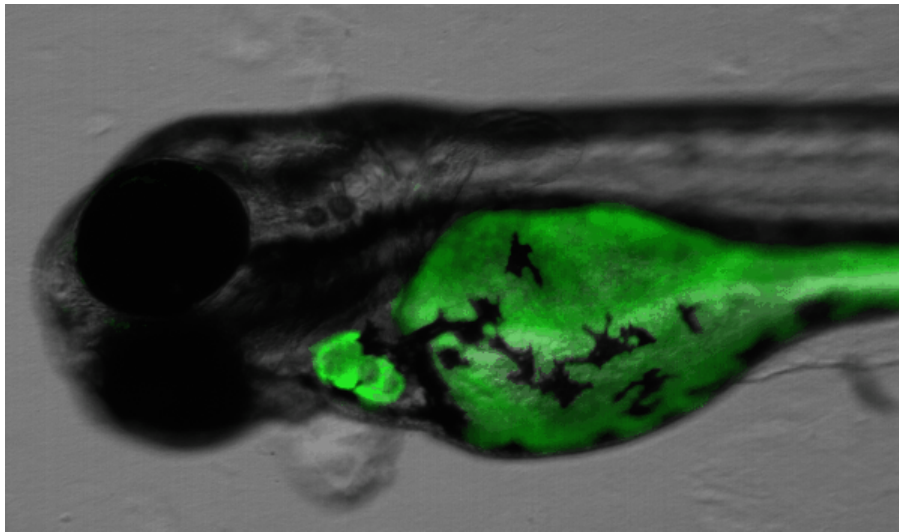


Упрощенная схема установки для моделирования гипоксии

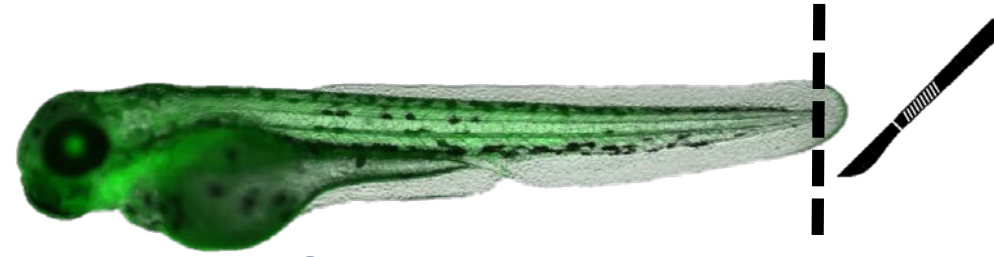


Модель гипоксии тканей сердца

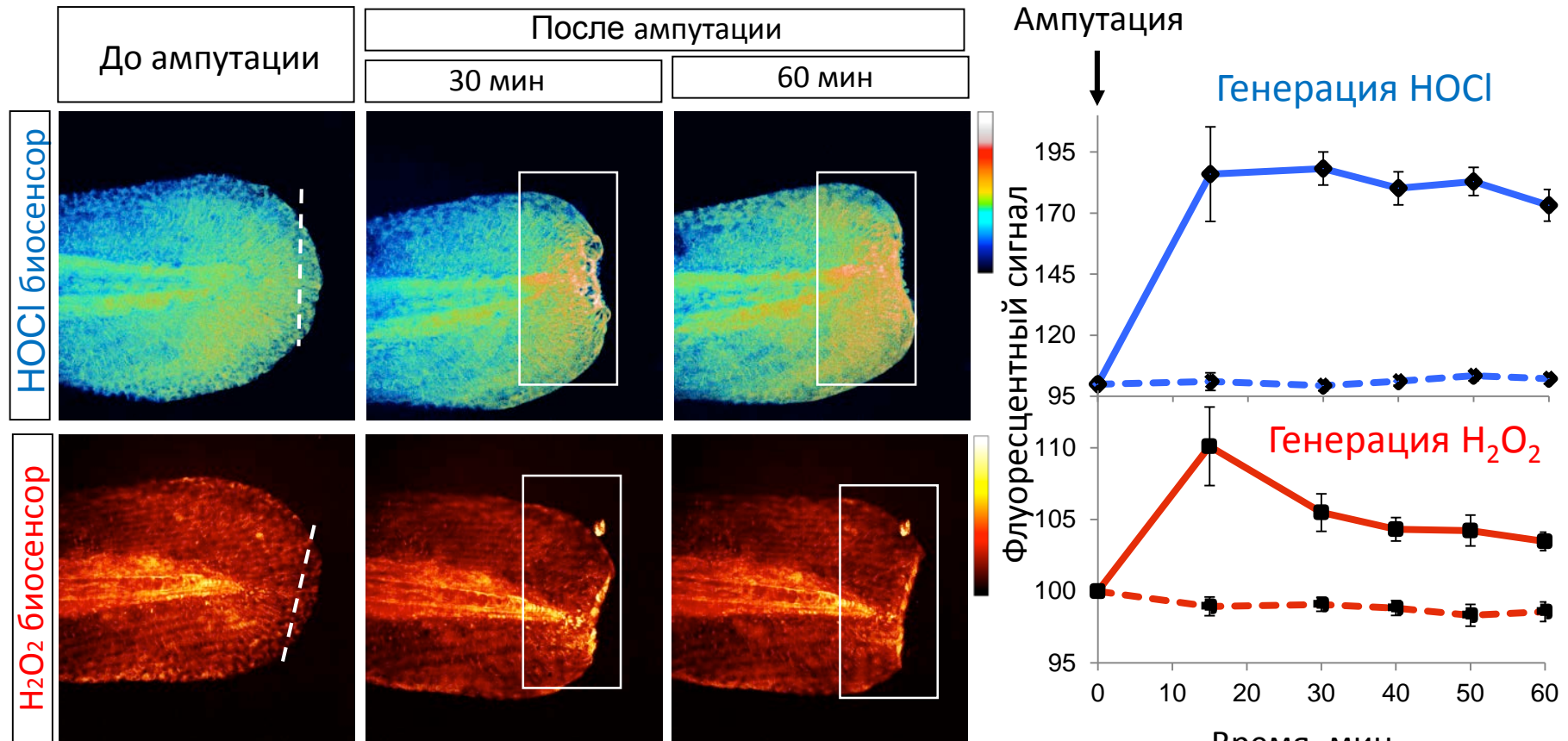
D. rerio с экспрессией в сердце гена биосенсора на основе *cpYFP*
На примере pH-биосенсора *SypHer3s*



Модель воспаления, вызванного повреждением



Ампутация хвостового плавника



Модель воспаления, вызванного повреждением

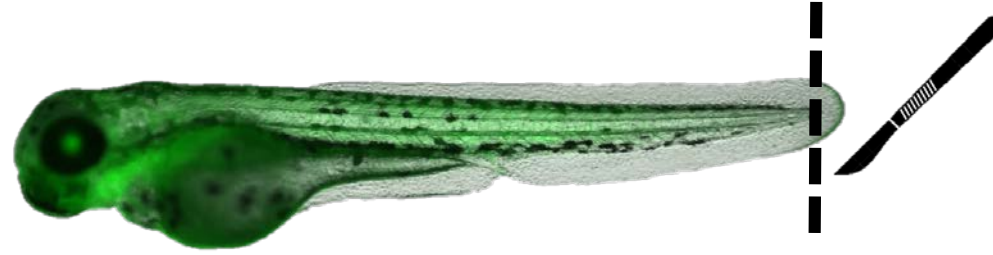
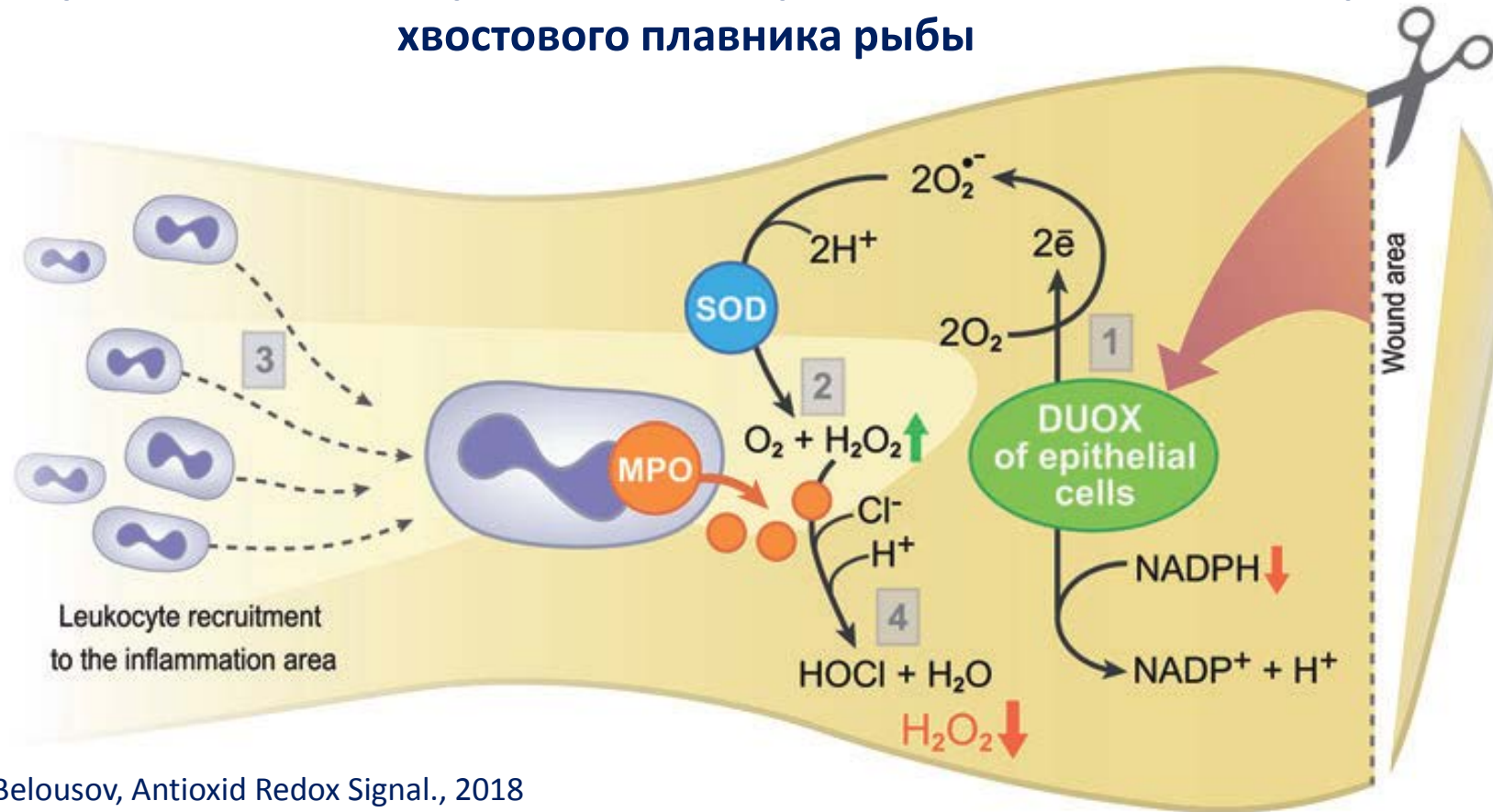
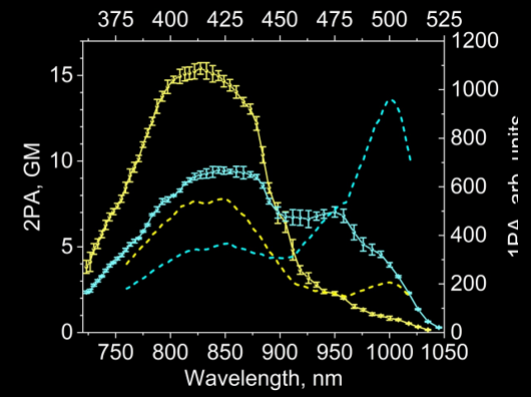


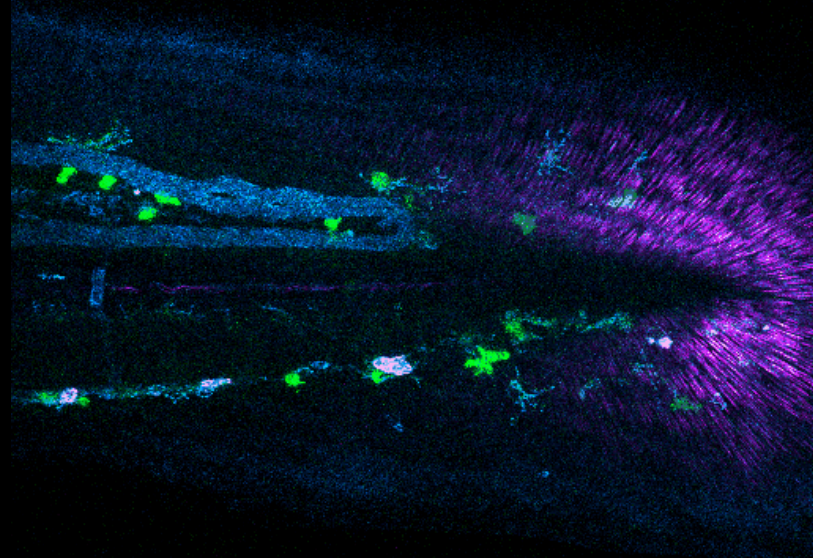
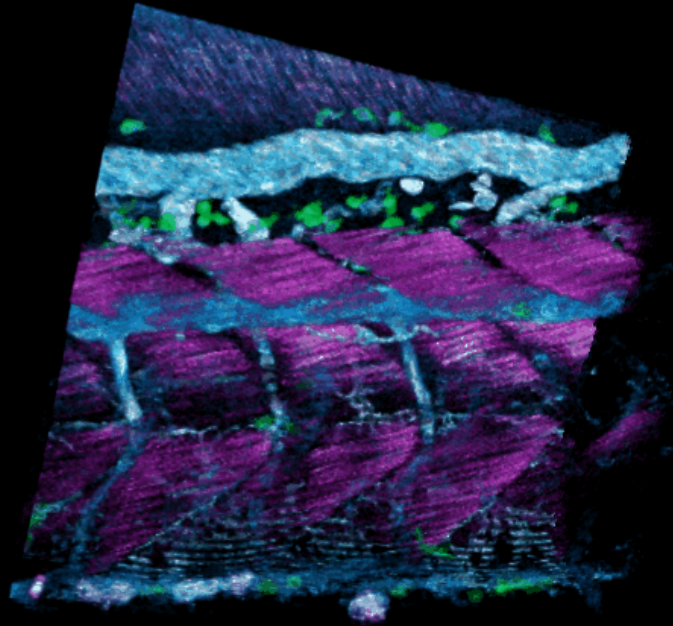
Схема редокс событий, происходящих при воспалении на модели раны хвостового плавника рыбы



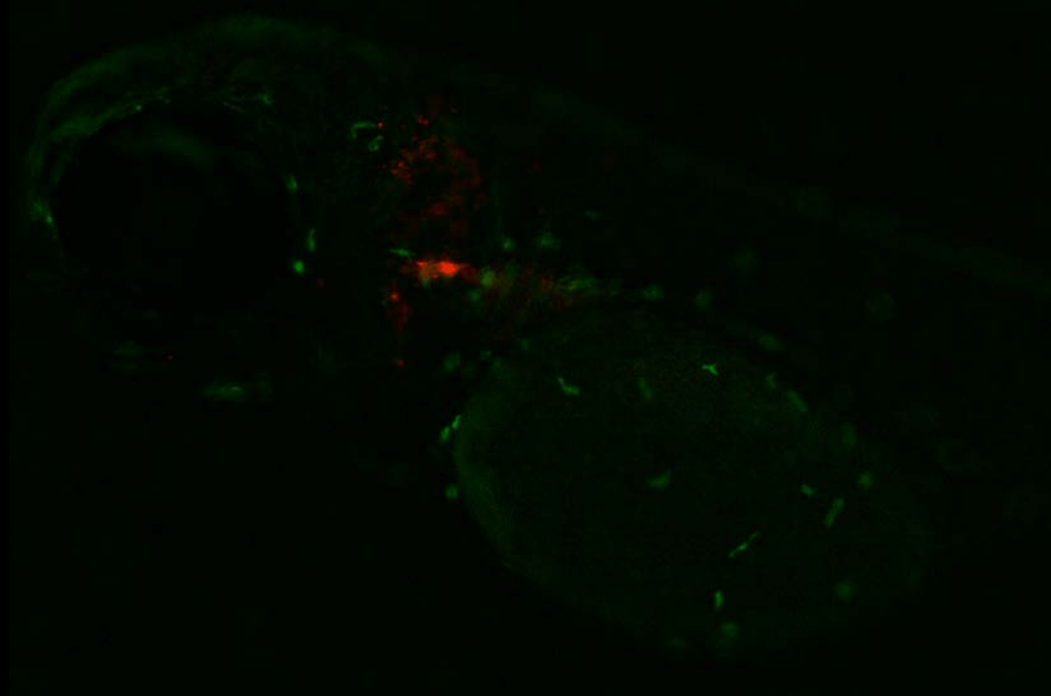
Hypocrates2 *danio rerio* in vivo



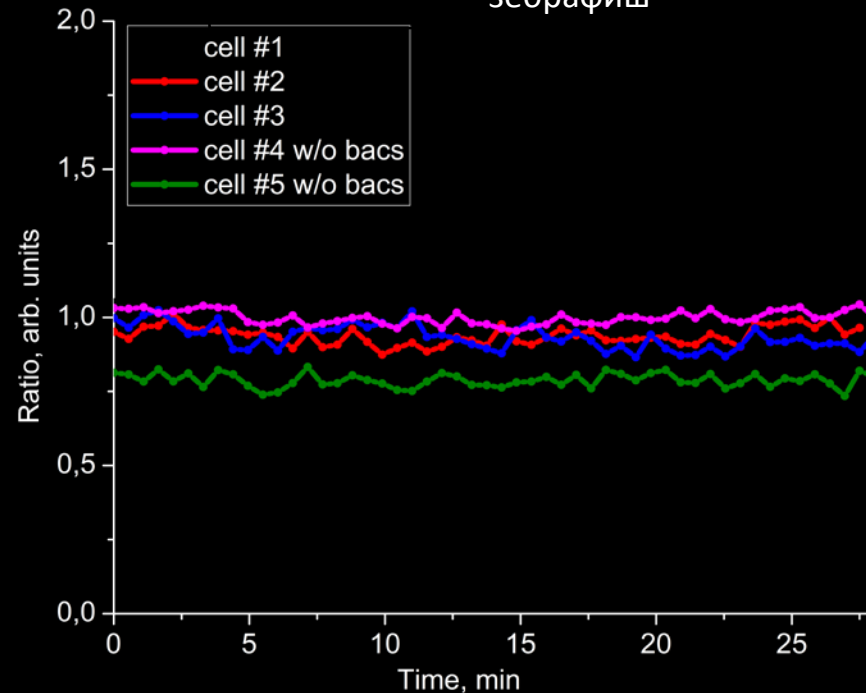
Hypocrates2 *danio rerio* in vivo



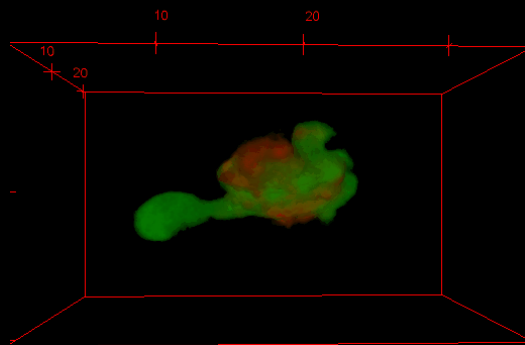
Трансгенный малёк *D. rerio*
с экспрессией биосенсора **Hypocrates2** в нейтрофилах.
Инъекция бактерий *E. coli* с экспрессией **mCherry** во внутреннее ухо.



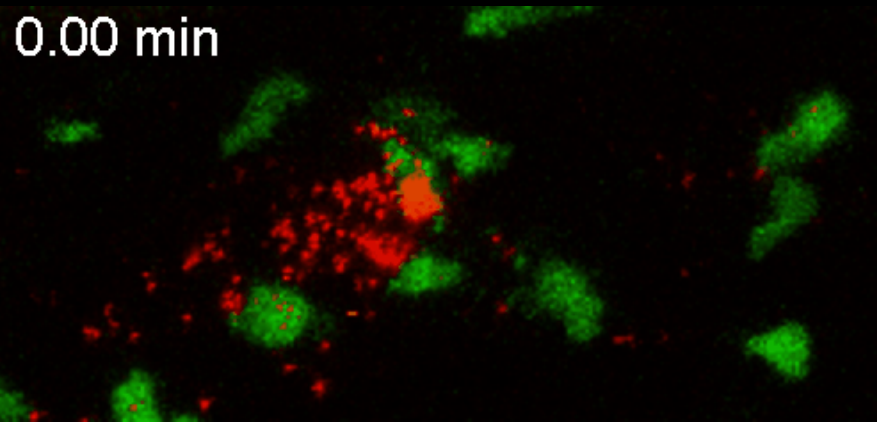
Сигнал **Hypocrates2** в нейтрофилах
зебрафиш



Нейтрофил с множеством фагосом

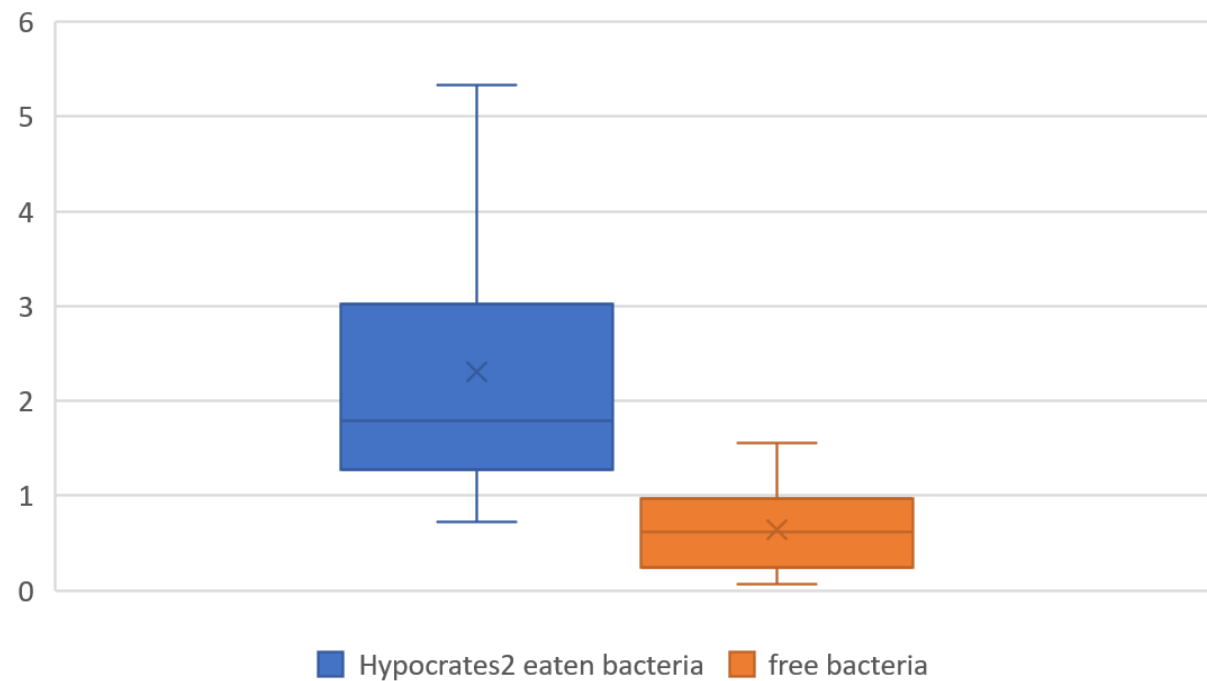
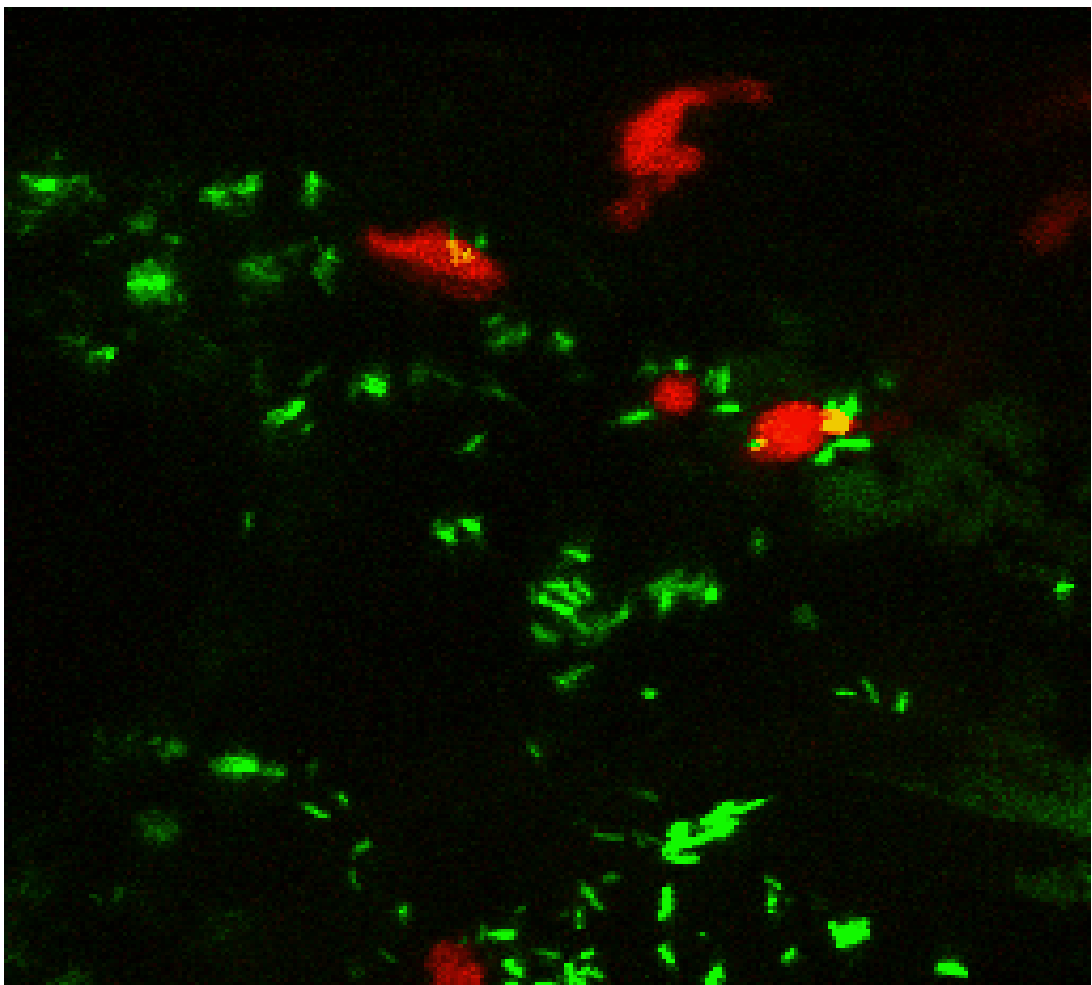


Приближенное изображение

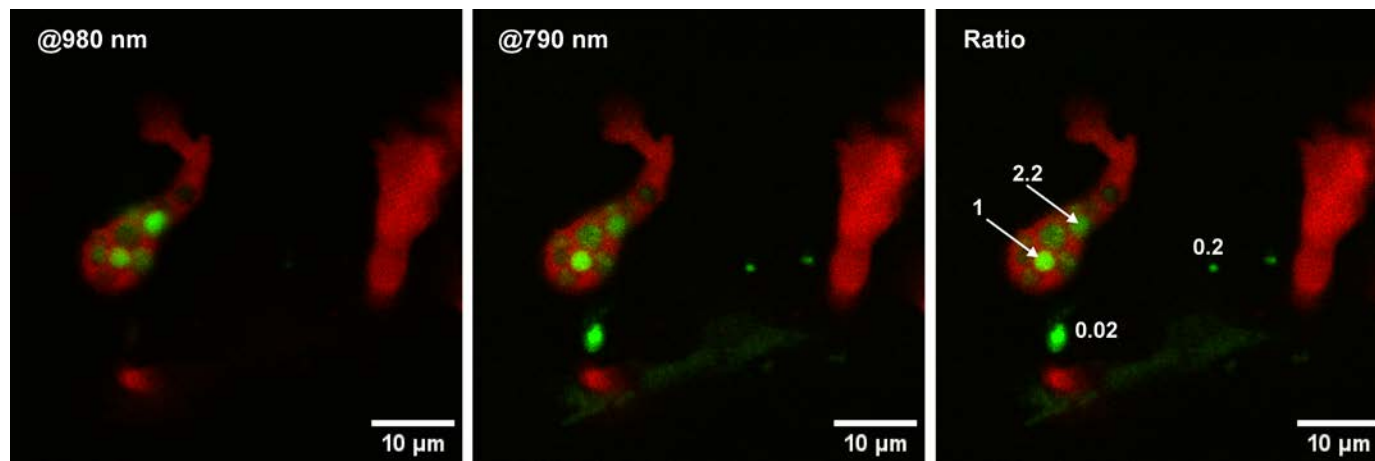


Нейтрофил не
испытывает
гипогалогенного стресса
при фагоцитозе

Трансгенный малёк *D. rerio*
с экспрессией **mCherry** в нейтрофилах.
Инъекция бактерий *E. coli* с экспрессией
биосенсора **Hypocrates2**
во внутреннее ухо.



Бактерии, попавшие в фагосому, испытывают гипогалогенный стресс.



Наши коллабораторы



МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ
УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ М.В.ЛОМОНОСОВА



Финансирование:



приоритет2030[^]
лидерами становятся
Нейрокампус 2030



МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ
УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ М.В.ЛОМОНОСОВА

Генетически кодируемые инструменты для исследования биологических процессов

Дмитрий Билан
d.s.bilan@gmail.com

