

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Государственный научный центр Российской Федерации
Институт биоорганической химии
им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова
Российской академии наук

На правах рукописи

Билан Дмитрий Сергеевич

**Редокс-биосенсоры на основе флуоресцентных белков
для *in vivo* исследований**

Специальность: 1.5.3. – молекулярная биология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание учёной степени

доктора биологических наук

Москва 2024

Общая характеристика работы

Актуальность исследования

Большинство внутриклеточных процессов происходит с участием окислительно-восстановительных реакций (далее редокс-). Особую роль в регуляции этих процессов играют низкомолекулярные редокс-активные соединения. В качестве наиболее изученного примера можно назвать представителей активных форм кислорода (АФК), которые на протяжении длительного времени рассматривались исключительно в качестве побочных продуктов аэробного дыхания. Однако догма об исключительно негативной роли АФК в биологии была кардинально пересмотрена. На сегодняшний день АФК, а также активным формам азота и серы приписывают не только повреждающую роль, но и признают их важнейшее значение в качестве редокс-регуляторов, среди них H_2O_2 , $\cdot NO$, H_2S .

Из-за высокой реакционной способности и короткого времени жизни такие участники редокс-регуляции не могут быть определены напрямую с помощью традиционных подходов аналитической химии. Без преувеличения, новая эпоха в области редокс-биологии была ознаменована появлением биосенсоров на основе флуоресцентных белков. Такие биосенсоры белковой природы при взаимодействии с конкретным внутриклеточным параметром меняют спектральные характеристики. На сегодняшний день существует обширная мировая коллекция редокс-биосенсоров для исследования в живых системах динамики с пространственно-временным разрешением многих редокс-параметров, что позволяет изучать *in vivo* динамику ранее неуловимых для исследователей редокс-параметров в контексте глобальных биологических процессов как в норме, так и при патологиях.

Однако не для всех редокс-параметров созданы такие инструменты. Так обстоит дело с гипогалогенными кислотами – самыми сильными биологически значимыми двухэлектронными окислителями. Активные формы галогенов (АФГ) играют роль мощных антимикробных агентов, образующихся в клетках иммунной системы. Кроме того, воспалительные процессы при многих заболеваниях характеризуются развитием гипогалогенного стресса. Гипогалогенные кислоты являются настолько агрессивными окислителями, что создание для них биосенсора

биологической природы считалось невозможным. Однако недавно были обнаружены сразу несколько белковых доменов, которые претерпевают модификации в результате взаимодействия с гипогалогенными кислотами. Это означает, что даже такие мощные окислители, как АФГ, могут модифицировать белковые мишени направленно. Вполне возможно, что уже в скором времени биологическая роль АФГ будет пересмотрена, как в свое время произошло с АФК.

Кроме разработок биосенсоров для регистрации новых редокс-параметров актуальным остается направление по изменению свойств уже существующих биосенсоров. Сочетание нескольких спектрально различающихся биосенсоров в пределах одной системы повышает информативность подхода.

Отсутствие эффективной терапии для некоторых заболеваний обусловлено неполной картиной наших представлений о молекулярных механизмах патогенеза. Общеизвестным и признанным в медико-биологическом сообществе является факт, что окислительный стресс является главным повреждающим фактором при ишемии тканей головного мозга и сердца. Опубликованы сотни работ о роли АФК в клетках при развитии ишемии, однако по-прежнему ведутся дискуссии о системах, которые вносят основной вклад в образование АФК. Применение в *in vivo* моделях патогенеза селективных и высокочувствительных генетически кодируемых биосенсоров нового поколения уже в скором времени позволит выявить подробный сценарий редокс-процессов.

Цели и задачи исследования

Целью настоящей работы является разработка новых генетически кодируемых редокс-биосенсоров на основе флуоресцентных белков, а также исследование динамики редокс-параметров в моделях *in vivo*.

Были сформулированы следующие задачи:

1. Разработать генетически кодируемый биосенсор на основе красного флуоресцентного белка для регистрации динамики редокс-статуса пула глутатиона.
2. Разработать генетически кодируемый биосенсор для регистрации гипогалогенных кислот и их производных.

3. Исследовать динамику H_2O_2 и гипогалогенных кислот *in vivo* в тканях *Danio rerio* при развитии воспалительной реакции, вызванной механическим повреждением.
4. Провести масштабное исследование динамики концентрации H_2O_2 и развития ацидоза в моделях гипоксии/ишемии с использованием различных живых систем (клеточных культур нейронов и кардиомиоцитов, тканей рыб *Danio rerio*, тканей мозга крыс).

Научная новизна и практическая значимость работы

Новые типы генетически кодируемых флуоресцентных биосенсоров, а также применение подобных инструментов в новых биологических моделях исследования являются главными результатами представленной работы.

Мы разработали первый красный флуоресцентный редокс-чувствительный белок на основе mCherry путем внесения в его структуру пары редокс-активных остатков цистеина, расширив, таким образом, спектральную палитру популярного семейства биосенсоров. Для лучшего тиол-дисульфидного обмена модифицированный белок соединили через пептидный линкер с человеческим глутаредоксином 1 человека. Grx1-roCherry может быть применен в комбинации с любыми другими спектрально различающимися биосенсорами, что позволяет проводить исследования на уровне межкомпарментных редокс-взаимодействий.

Мы разработали первый генетически кодируемый биосенсор для регистрации гипогалогенных кислот на основе транскрипционного фактора NemR из *E.coli* и интегрированного в его структуру флуоресцентного белка cpYFP. Биосенсор, который мы назвали Nurocrates, на сегодняшний день не имеет аналогов в мире. Биосенсор чувствителен к (псевдо)гипогалогенным кислотам ($HOCl$, $HOBr$, $HOscn$) и различным производным. Для контрольной версии биосенсора мы расшифровали пространственную структуру. Это сделано впервые для редокс-биосенсора на основе кругового пермутанта флуоресцентного белка, что представляет ценность для понимания механизмов функционирования и поиска путей оптимизации не только полученного, но и других биосенсоров данного типа. С помощью биосенсора Nurocrates мы визуализировали динамику гипогалогенного стресса в клетках *E.coli*, фагоцитируемых нейтрофилами человека, а также в тканях

рыб *Danio rerio in vivo* при развитии воспалительной реакции, вызванной механическим повреждением.

С помощью биосенсора HyPer7 и технологии оптоволоконного нейроинтерфейса мы впервые показали *in vivo* динамику концентрации H_2O_2 в тканях мозга крыс с первых секунд развития ишемического инсульта. Оказалось, что с момента окклюзии артерии в центральной области ишемического повреждения мозга концентрация H_2O_2 медленно нарастает в нейронах и астроцитах, достигая максимальных значений лишь на следующие сутки. Таким образом, подтверждено участие H_2O_2 в патогенезе инсульта, однако продукция H_2O_2 не носит взрывного характера вопреки распространенному мнению о механизмах данной патологии. Высокий гликемический статус крыс усугубляет последствия инсульта, но механизм не обусловлен усилением продукции H_2O_2 .

Мы выявили существенные отличия по редокс-параметрам в неонатальных и зрелых кардиомиоцитах крыс. Для исследования динамики биохимических параметров в тканях сердца *in vivo* в условиях гипоксии мы создали систему с применением модельного объекта рыбы *Danio rerio*. Мы установили, что гипоксия вызывает повышение концентрации H_2O_2 исключительно в матриксе митохондрий; при нормализации условий H_2O_2 нейтрализуется в этом же компартменте, не диффундируя в цитозоль.

Практическая значимость представленной работы состоит в получении двух новых генетически кодируемых биосенсоров Grx1-roCherry и Нурocrates, которые в дальнейшем могут быть использованы исследователями для реализации различных задач в биологических системах разной степени сложности. На основе генетически кодируемых биосенсоров нами была создана исследовательская платформа для изучения воздействия гипоксии на живые системы. Для культивируемых клеток и рыб *D.rerio* мы использовали проточную систему, позволяющую быстро и точно изменять уровень O_2 в среде при одновременной флуоресцентной микроскопии исследуемого объекта. Для исследования динамики процессов в тканях мозга крыс *in vivo* при ишемии мы использовали технику оптоволоконного нейроинтерфейса. Предложенные нами подходы с использованием генетически кодируемых инструментов могут быть применены для исследования других заболеваний, что представляет ценность для поиска новых подходов терапии.

Основные положения, выносимые на защиту

1. Разработан биосенсор Grx1-roCherry для регистрации редокс-статуса пула глутатиона на основе красного флуоресцентного белка. Подход мультипараметрического режима регистрации сигнала Grx1-roCherry в комбинации с любым другим биосенсором, отличающимся спектрально, позволяет эффективно выявлять редокс-отличия разных типов клеток на уровне отдельных компартментов.
2. Разработан биосенсор HyProcates для регистрации динамики (псевдо)гипогалогенных кислот и их производных. Расшифровка пространственной структуры контрольной версии HyProcates представляет интерес как для рациональной оптимизации свойств данного биосенсора, так и понимания общих механизмов функционирования различных биосенсоров на основе круговых пермутантов флуоресцентных белков.
3. В мультифотонном режиме возбуждения флуоресценции охарактеризованы свойства биосенсоров SupHer3s (для регистрации pH), HyPer7 (H₂O₂), HyProcates (гипогалогенные кислоты и их производные). Определение точных характеристик биосенсоров даже на основе одного и того же флуоресцентного ядра имеет важное значение для применения конкретного инструмента в *in vivo* условиях.
4. В области воспаления на модели раны хвостового плавника *Danio rerio* с помощью биосенсоров HyPer-Red и HyProcates визуализирована *in vivo* динамика H₂O₂ и гипогалогенных кислот в первые минуты повреждения тканей. В области раны уровень продуктов гипогалогенного стресса пролонгирован по времени по отношению к H₂O₂.
5. С помощью биосенсора HyPer7 показана динамика H₂O₂ в тканях мозга крыс при развитии ишемического инсульта в режиме реального времени. Уровень H₂O₂ повышается с первых секунд ишемии, но достигает максимальных значений лишь на следующие сутки. В очаге инсульта астроциты характеризуются более окисленным состоянием по сравнению с нейронами, разница обнаружена также на более поздних стадиях патогенеза.
6. У крыс с высоким гликемическим статусом в крови значительно больше объем повреждения тканей мозга при ишемическом инсульте, однако это не влияет на

динамику H_2O_2 ни в острой фазе патогенеза, ни на следующие сутки. Таким образом, гипергликемия усугубляет последствия инсульта, но не через генерацию H_2O_2 .

7. Неонатальные и зрелые кардиомиоциты крыс различаются по редокс-статусу. При гипоксии только зрелые типы клеток демонстрируют продукцию H_2O_2 в матриксе митохондрий.
8. В различных тканях *Danio rerio* показана продукция H_2O_2 *in vivo* при гипоксии в матриксе митохондрий и ее отсутствие в цитозоле клеток. Важно, что при реоксигенации H_2O_2 так и не распространяется за пределы митохондрий и нейтрализуется в этом же компартменте.

Апробация и публикации работы

Результаты работы представлены на более чем 25 ведущих международных и всероссийских научных мероприятиях. По теме диссертации опубликовано 42 статьи в рецензируемых научных журналах, индексируемых базами данных Web of Science и Scopus, из них 15 – обзорные статьи.

Структура диссертации

Диссертационная работа представлена на 351 странице, структура включает следующие разделы: Оглавление, Список сокращений, Введение, Обзор литературы, Материалы и методы, Результаты и обсуждение, Заключение, Выводы, Список цитируемой литературы, включающий 905 источников, и раздел Благодарности. Диссертация содержит 85 рисунков и 5 таблиц.

Личный вклад автора

Биосенсоры Grx1-roCherry и Нурocrates были разработаны и протестированы под руководством автора. Определение кинетических параметров Нурocrates, определение пространственной структуры биосенсора выполнены при сотрудничестве с лабораторией профессора Joris Messens (Бельгия). Модель воспаления в тканях *Danio rerio* реализована в сотрудничестве с лабораторией профессора Sophie Vriz (Франция). Цикл работ, посвященный исследованию редокс-процессов в условиях

гипоксии/реоксигенации в различных моделях (клеточные культуры, *in vivo* в тканях лабораторных грызунов и рыб *D. rerio*) был проведен с личным участием или под руководством автора диссертации. Техника *in vivo* регистрации флуоресцентного сигнала биосенсоров в тканях мозга крыс посредством оптоволоконного интерфейса выполнена в сотрудничестве с лабораторией профессора Алексея Михайловича Желтикова (МГУ). Работа по Рамановской микроспектрометрии клеток выполнена в сотрудничестве с Надеждой Александровной Браже (МГУ, ИБХ РАН). Большинство используемых в работе биосенсоров помимо Grx1-roCherry и Нурocrates были также созданы при участии автора диссертации. Среди них биосенсоры НуPer-3 (работа над биосенсором составила основу кандидатской диссертации автора), НуPer-Red (участие автора в проведении тестов биосенсора на культуре клеток), НуPer7 (участие автора в определении некоторых свойств биосенсора *in vitro*), SupHer3s (тестирование *in vivo* в тканях *Danio rerio* выполнено под руководством автора). Цикл работ, выполненный в сотрудничестве с Алексеем Михайловичем Желтиковым (МГУ) и Александром Александровичем Ланиным (МГУ), посвящен исследованию спектральных характеристик перечисленных биосенсоров, биологическая часть в этих работах выполнена лично или под руководством автора диссертации.

Основное содержание работы

Обзор литературы

Обзор литературы представлен двумя основными разделами. Первый раздел посвящен описанию редокс-регуляции живых систем с участием низкомолекулярных соединений с высокой реакционной способностью. Рассмотрены системы образования в клетках активных форм кислорода, галогенов, азота, серы, их химические свойства, регуляция их концентраций и роли в биологических системах. Второй раздел посвящен генетически кодируемым биосенсорам на основе флуоресцентных белков, представлены основные типы. Проведен полный анализ современной мировой коллекции генетически кодируемых редокс-биосенсоров.

Экспериментальная часть

Первая часть диссертации посвящена разработкам новых редокс-биосенсоров на основе флуоресцентных белков. Эта часть сфокусирована на идеях дизайна новых молекулярных инструментов, их характеристиках и свойствах. Вторая часть диссертации посвящена описанию подходов применения генетически кодируемых биосенсоров *in vivo* на животных моделях (грызуны, рыбы) для исследования динамики редокс-процессов при некоторых патологических состояниях (ишемия, диабет, воспаление).

1. Редокс-чувствительные белки с красной эмиссией флуоресценции

Несколько версий редокс-чувствительных флуоресцентных белков (FP) были получены путем внесения в их структуры близкорасположенных редокс-активных остатков Cys. Такие белки вовлечены в тиол-дисульфидный обмен клетки. Формируемая при окислении дисульфидная связь приводит к структурным изменениям такого модифицированного белка, в том числе на уровне микроокружения хромофора, что приводит к изменению спектральных свойств. Общий редокс-статус клетки отражает редокс-состояние пула глутатиона, которое характеризуется соотношением восстановленной формы глутатиона GSH к окисленной GSSG (2GSH/GSSG). Для улучшения кинетических свойств редокс-чувствительные FP на уровне гена через полипептидные линкеры связывают с глутаредоксинами (Grx), такой подход позволяет существенно увеличить эффективность тиол-дисульфидного обмена. В настоящий момент редокс-чувствительные FP представляют один из самых востребованных и наиболее часто используемых классов биосенсоров в медико-биологических исследованиях. Основная часть полученных версий представлена в основном белками с зеленой эмиссией флуоресценции, также были созданы голубые белки. Неоднократно предпринимались попытки создания редокс-чувствительного белка с красной эмиссией флуоресценции, что позволило бы не только расширить возможности мультипараметрического анализа редокс-событий при комбинации в системе спектрально различающихся биосенсоров, но и принесло бы практическую ценность. Красные FP имеют ряд преимуществ в применении. Например, свет с большей длиной волны для возбуждения флуоресценции менее токсичен для

клеток, по сравнению с коротковолновым фиолетовым светом возбуждения хромофоров голубых белков. Спектральные свойства красных белков находятся в том оптическом окне для исследования биологических объектов, где наблюдается наименьший уровень автофлуоресценции, что увеличивает разрешение сигнала, в том числе в глубоких слоях тканей *in vivo*.

Мы поставили задачу создать первый редокс-чувствительный красный FP с канонической для данного семейства биосенсоров структурой. За основу биосенсора было выбрано несколько вариантов среди мономерных красных белков, а именно mCherry, mRuby2 и mKate2, демонстрирующих высокую яркость флуоресценции. Для улучшения кинетических параметров ко всем выбранным красным белкам на уровне гена мы добавили Grx1 человека к N-концу через линкер, состав которого оптимизировали под каждую перспективную версию. В структуры выбранных FP точечным мутагенезом мы вводили по 2 остатка Cys, располагая их на β -листах вблизи хромофора на достаточном расстоянии друг от друга для образования S-S связи. Для каждого белка нами было получено по несколько версий. Так, для mCherry были получены варианты, содержащие следующие пары остатков Cys: 149/169, 149/203, 150/169, 150/203; для mRuby2: 146/166, 146/203, 147/166, 147/203; для mKate2: 142/198, 142/196, 141/161, 144/196, 141/198, 141/161, 141/196, 107/118, 140/214, 200/214.

В бактериальных клетках *E.coli* штамма XL1 Blue оценивали яркость полученных версий и изменение их спектральных характеристик при окислении, вызванном добавлением в суспензию клеток 5 mM H₂O₂. H₂O₂ является сильным окисляющим агентом, который при больших концентрациях смещает редокс-статус внутриклеточного пула глутатиона в сторону окисления. На этом этапе отбирали версии, которые демонстрировали не менее 10% изменения интенсивности флуоресценции при окислении. Далее их подвергали случайному и направленному мутагенезу с целью оптимизировать свойства, влияя на структуру и окружение хромофора. После этого вновь проводили раунды скрининга, отбирая версии с наибольшей яркостью и амплитудой ответа. В результате на основе mKate2 мы получили биосенсор Grx1-roKate, флуоресцентное ядро которого помимо ключевых остатков цистеина Glu141Cys/Arg198Cys содержит замены Lys12Glu и Asn21Asp, подошедший линкер имеет состав (GGSGG)₆ (**рис. 1A**). На основе mCherry также удалось получить редокс-чувствительный биосенсор Grx1-Cherry путем внесения

редокс-активных цистеинов Ala150Cys/Lys203Cys, внесения дополнительного аминокислотного остатка Thr после Cys150 и мутации Ser151Glu, состав используемого линкера SGTGGNASDGGGSGG (**рис. 1Б**). Получить биосенсор на основе белка mRuby2 не удалось.

Очищенный белковый препарат Grx1-roKate характеризуется одним пиком в спектре возбуждения флуоресценции с максимумом при 585 нм, для эмиссии характерен также один пик с максимумом при 624 нм (**рис. 1В**). Для Grx1-roCherry также характерно по одному пику в спектрах возбуждения и эмиссии флуоресценции с максимумами при 589 нм и 610 нм (**рис. 1Г**). Окисленное и восстановленное состояние Grx1-roCherry и Grx1-roKate хорошо различимы спектрально (**рис. 1Д,Е**). При окислении Grx1-roCherry демонстрирует увеличение интенсивности флуоресценции, а Grx1-roKate, наоборот, снижение. Окисление мы вызывали добавлением к пробам белков избытка GSSG (1 мМ), для восстановления использовали GSH (1 мМ) в присутствии 2 мМ NADPH и 0,5–1,5 U/мл глутатион редуктазы. Мы также убедились, что оба белка не окисляются H₂O₂ напрямую. В клетках эффект воздействия H₂O₂ на эти биосенсоры опосредован именно окислением пула глутатиона.

В эукариотических клетках HeLa Kyoto Grx1-roKate демонстрирует выраженное изменение сигнала при окислении, вызванном избытком H₂O₂ в среде, амплитуда ответа сравнима с наблюдаемой *in vitro*. Grx1 и редокс-активные Cys определяют механизм функционирования Grx1-roKate, при их отсутствии флуоресцентный ответ не развивается. Однако по не установленной нами причине Grx1-roKate окисляется в эукариотических клетках необратимо (**рис. 2А**). Grx1-roCherry в этих же условиях демонстрировал выраженный ответ максимально до 2-х раз, изменение сигнала при этом обратимо. Версия roCherry без Grx1 демонстрировала сниженную амплитуду ответа (**рис. 2Б**).

В дальнейшем мы сосредоточились на биосенсоре Grx1-roCherry, который демонстрирует выраженный и при этом обратимый в клетках млекопитающих ответ на редокс-изменения.

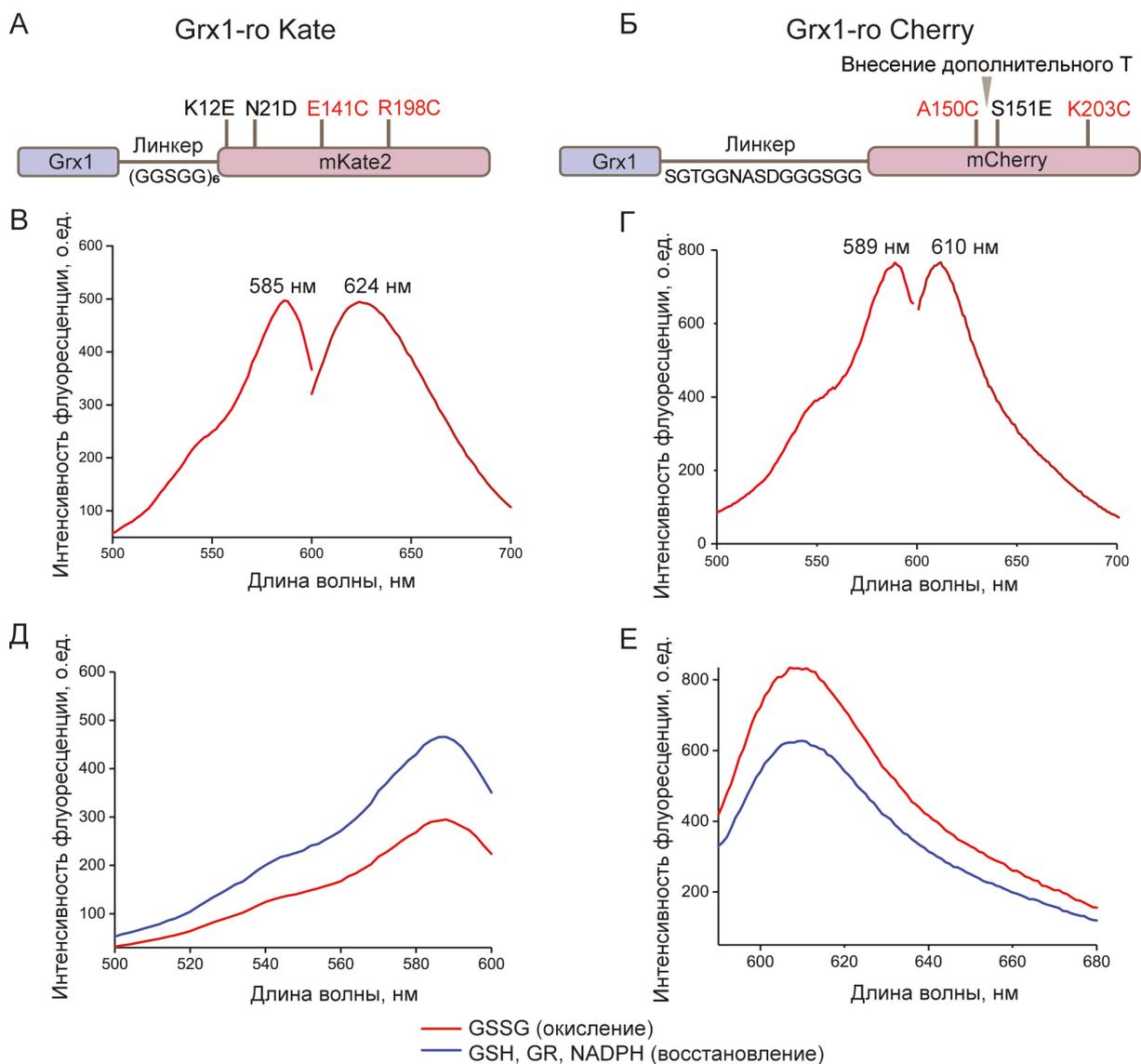


Рисунок 1. Редокс-чувствительные биосенсоры Grx1-roKate и Grx1-roCherry. (А) Схема структуры Grx1-roKate, на которой отмечены составные части биосенсора и внесенные мутации. (Б) Аналогичная схема структуры для Grx1-roCherry. (В и Г) Спектры возбуждения и эмиссии флуоресценции Grx1-roKate (В) и Grx1-roCherry (Г). (Д и Е) Спектры эмиссии флуоресценции Grx1-roKate (100 нМ белка в пробе) (Д) и Grx1-roCherry (40 нМ белка в пробе) (Е) в окисленном состоянии (в присутствии 1 мМ GSSG) и в восстановленном состоянии (в присутствии 1 мМ GSH, 2 мМ NADPH, 0,5–1,5 U/мл глутатион редуктазы (GR)). Спектры эмиссии сняты при возбуждении 580 нм. Пробы приготовлены на основе PBS pH 7,4.

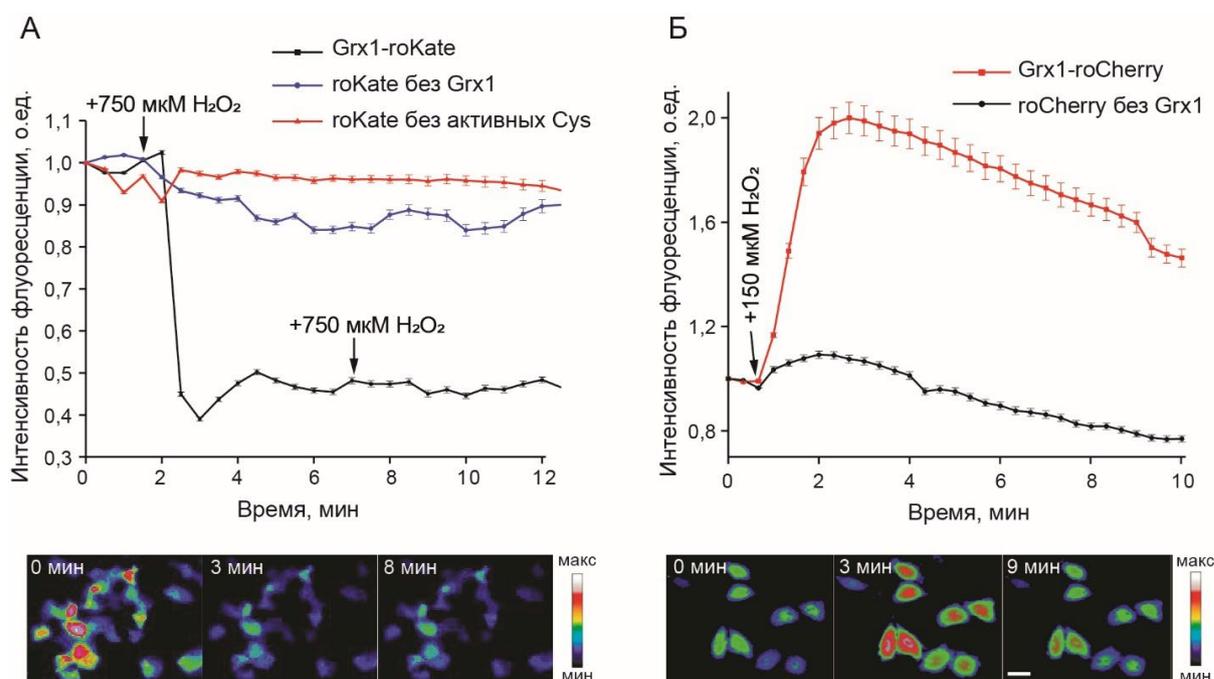


Рисунок 2. Grx1-roKate и Grx1-roCherry в клетках HeLa Kyoto. (А) Динамика изменения флуоресцентного сигнала Grx1-roKate, версии roKate без Grx1 и Grx1-roKate без редокс-активных Cys в цитозоле клеток HeLa Kyoto в условиях окислительного стресса, вызванного H₂O₂. (Б) Динамика изменения флуоресцентного сигнала Grx1-roCherry и версии без Grx1 в цитозоле клеток HeLa Kyoto в условиях окислительного стресса, вызванного H₂O₂.

На графиках значения сигналов биосенсоров в каждой временной точке нормализованы на исходные значения. Планки погрешностей соответствуют стандартной ошибке среднего, в анализе не менее 50 клеток для каждой версии, N=3. Ниже представлены фотографии клеток с экспрессией гена Grx1-roKate (А) и Grx1-roCherry (Б) до и после добавки H₂O₂, указанное время совпадает с временной шкалой на графиках выше. Клетки окрашены в псевдоцвета, соответствующие значениям сигнала биосенсоров. Шкала 40 мкм.

Белковый препарат максимально восстановленного Grx1-roCherry, полученный инкубацией с дитиотреитолом, демонстрирует быстрый ответ на увеличение концентрации GSSG в пробе (рис. 3А). Далее мы проверили, какие биологически значимые окисляющие агенты вызывают окисление биосенсора, для сравнения использовали широко популярную в исследованиях зеленую версию Grx1-roGFP2. К препаратам полностью восстановленных Grx1-roCherry и Grx1-roGFP2, содержащихся в 1 мл PBS в концентрации 40 нМ, мы добавляли различные окисляющие агенты. Для Grx1-roCherry характерен интенсимоетрический сигнал (F₅₈₉), для Grx1-roGFP2 – ратиометрический (F₄₀₅/F₄₈₈). Ожидаемо наибольшую амплитуду ответа для обоих биосенсоров мы наблюдали при добавлении GSSG в конечных концентрациях 10 мкМ и 1 мМ (рис. 3Б). Grx1-roCherry не чувствителен

к H_2O_2 вплоть до высоких концентраций 500 мкМ, что находится за пределами физиологического диапазона. Однако в этих же условиях мы наблюдали низкоамплитудные изменения сигнала Grx1-roGFP2. Grx1-roGFP2 и Grx1-roCherry чувствительны к активным формам хлора, оба проявляют максимальное изменение сигнала при добавлении в пробы 500 мкМ и 10 мкМ N-хлоротаурина (рис. 3Б). Grx1-roCherry и Grx1-roGFP2 демонстрируют изменение сигнала при избыточных концентрациях в системе с ксантиноксидазой (50 мкМ ксантина), продуцирующей $O_2^{\cdot-}$, однако такие концентрации также трудно- или вовсе недостижимы в биологических системах. В отличие от зеленой версии биосенсора, полученный нами Grx1-roCherry демонстрирует чувствительность к избытку в системе NO, продуцируемого донором MAHMA NONOate в концентрации 100 мкМ в пробе, что также лежит за пределами физиологически возможных концентраций (рис. 3Б).

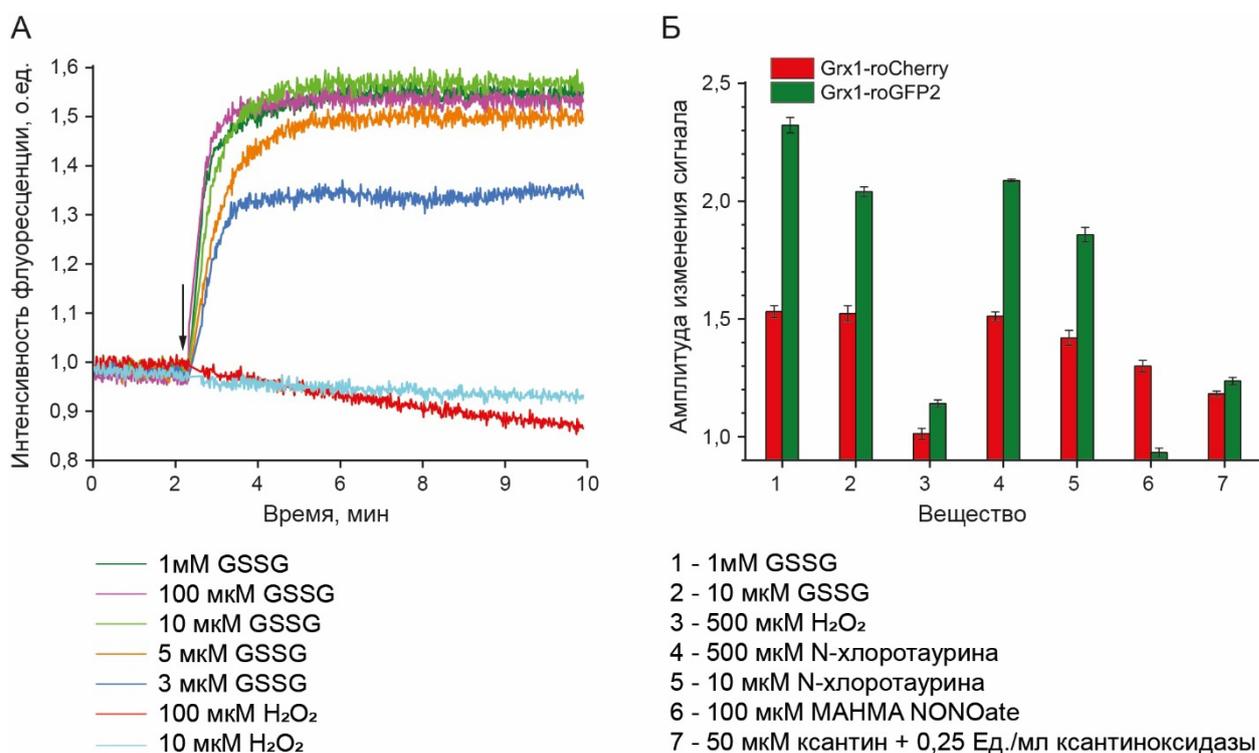


Рисунок 3. Селективность Grx1-roCherry. (А) Динамика изменения интенсивности флуоресценции Grx1-roCherry при добавлении GSSG и H_2O_2 (отмечено стрелкой). Каждый график нормализован к значению сигнала, полученному для образца Grx1-roCherry в отсутствии окислителей. В пробах объемом 1 мл содержалось 40 нМ белка (PBS, pH 7,4). (Б) Амплитуда ответа восстановленного Grx1-roCherry (F_{589}) и Grx1-roGFP2 (F_{405}/F_{488}) при добавлении указанных редокс-активных соединений или их доноров. Сигнал полностью восстановленного Grx1-roCherry и Grx1-roGFP2 принят за 1. Планки погрешностей соответствуют стандартной ошибке среднего, $N=3$. Во всех пробах объемом 1 мл содержалось 40 нМ белка (PBS, pH 7,4).

Селективность редокс-чувствительных FP долгое время была предметом дискуссий. Изначально этот тип биосенсоров рассматривался исключительно в контексте определения редокс-статуса пула глутатиона. В некотором смысле это действительно так, поскольку показатель 2GSH/GSSG зависит от наличия и времени жизни в рассматриваемой системе соединений с высокой реакционной способностью. Таким образом, любой редокс-стимул влияет на общий редокс-баланс клетки, и в этом смысле 2GSH/GSSG является универсальным параметром. Однако нельзя не учитывать тот факт, что некоторые соединения с высокой реакционной способностью могут взаимодействовать с редокс-чувствительными FP напрямую, особенно это актуально в системах с высокой продукцией подобных соединений, например, при окислительном стрессе.

Диапазон pH-чувствительности является еще одной важной характеристикой биосенсора, поскольку все FP чувствительны к изменениям pH, что определяется свойством хромофора. Мы получили график зависимости интенсивности флуоресценции Grx1-roCherry от значения pH среды. В физиологическом диапазоне изменений pH (6,0 – 8,0), интенсивность флуоресценции изменяется ~ в 4 раза (**рис. 4А**).

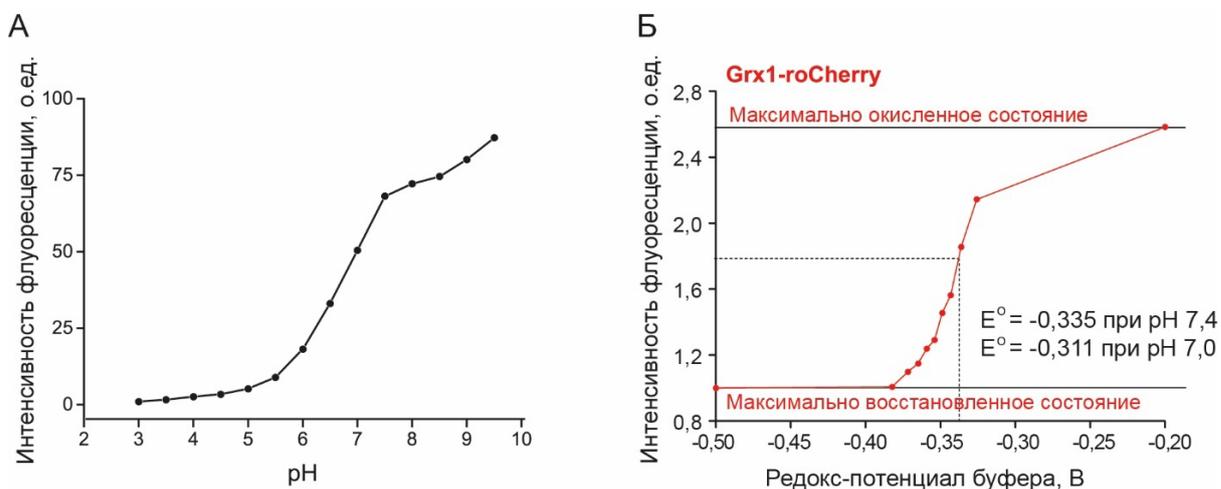


Рисунок 4. Некоторые свойства Grx1-roCherry. (А) Зависимость флуоресцентного сигнала очищенного препарата Grx1-roCherry от значений pH. (Б) Зависимость флуоресцентного сигнала очищенного препарата Grx1-roCherry от редокс-потенциала системы. В качестве редокс-пары использовали DTT_{окисленный} и DTT_{восстановленный} в разных соотношениях, общая концентрация DTT 1 мМ. Инкубация каждой пробы перед измерением составила 3 часа при $t_{комн}$. Все растворы приготовлены на PBS pH 7,4.

Редокс-потенциал для Grx1-roCherry составляет -311 мВ при pH 7,0 и -335 мВ при pH 7,4 (**рис. 4Б**). В этих же условиях потенциал для Grx1-roGFP2 составил -

290 мВ при рН 7,0 и -315 мВ при рН 7,4. Полученные экспериментально значения редокс-потенциала для Grx1-roCherry и Grx1-roGFP2, а также представленная диаграмма селективности (рис. 3Б), указывают на то, что биосенсор Grx1-roCherry по сравнению с Grx1-roGFP2 более чувствителен к окислению.

Свойства полученного нами Grx1-roCherry по большинству параметров сравнимы с популярным биосенсором Grx1-roGFP2. Наличие спектрально различающихся версий биосенсора позволяет использовать мультипараметрический подход исследования, комбинируя в системе разные биосенсоры. Для предварительной проверки мы коэкспрессировали гены Grx1-roCherry и Grx1-roGFP2 в клетках HeLa Kyoto. Через сутки после трансфекции большинство клеток в культуре демонстрировали одновременно красную и зеленую эмиссию флуоресценции, оба типа сигнала равномерно распределялись по клетке. Далее к этим клеткам в среду мы добавляли разные концентрации H_2O_2 , влияя на внутриклеточное соотношение 2GSH/GSSG. Таким образом, мы сравнили ответ Grx1-roCherry и Grx1-roGFP2 при окислении в одних и тех же клетках. Биосенсоры показали схожую чувствительность. Важно отметить, что в диапазоне концентраций H_2O_2 до 100 мкМ график для Grx1-roCherry смещен относительно Grx1-roGFP2 в сторону более низких концентраций, что подтверждает наши данные *in vitro* в пользу того, что Grx1-roCherry более чувствителен к окислению (рис. 5).

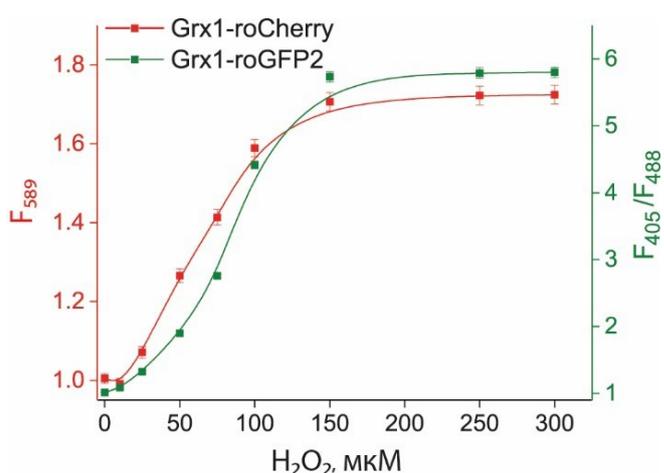


Рисунок 5. Сравнение динамики сигналов Grx1-roCherry (F_{589}) и Grx1-roGFP2 (F_{405}/F_{488}) в клетках HeLa Kyoto при добавке разных концентраций H_2O_2 . Гены биосенсоров коэкспрессированы в одних и тех же клетках. Значение сигнала в каждой временной точке нормализовано на исходное значение сигнала для каждого биосенсора. Планки погрешностей соответствуют стандартной ошибке среднего, не менее 100 клеток для каждой точки, $N=3$.

В дальнейшем мы применили мультипараметрический подход регистрации сигнала, комбинируя Grx1-roCherry с разнообразными спектрально

различающимися биосенсорами в различных клеточных моделях. Например, мы показали, что диметилфумарат, применяемый в терапии целого ряда заболеваний, демонстрирует восстанавливающий эффект в цитозоле клеток и не влияет на митохондриальный матрикс. С помощью комбинации биосенсоров Grx1-roCherry (GSSG/2GSH), SoNar (NAD⁺/NADH), SypHer-2 (pH) мы показали, что дихлорацетат, для которого известен эффект переключения метаболизма онкоклеток с гликолиза на окислительное фосфорилирование, в цитозоле клеток HeLa Kyoto вызывает окисление пула глутатиона и наоборот восстановление NAD. Подобный эффект не обнаружен в клетках с нормальным метаболизмом на примере HEK293.

Рассмотрим подробнее один из ярких примеров преимущества мультипараметрического подхода. При комбинации Grx1-roCherry и Grx1-roGFP2 мы показали, что клетки разных типов демонстрируют выраженные отличия в межкомpartmentных редокс-взаимодействиях. При окислительном стрессе H₂O₂ является основным фактором, окисляющим пул глутатиона. Однако неизвестно, как продукция H₂O₂ в определенных компартаментах клетки влияет на 2GSH/GSSG в других компартаментах. Например, влияет ли образование H₂O₂ в матриксе митохондрий на редокс-статус пула глутатиона в цитозоле и наоборот? Чтобы ответить на этот вопрос мы применили в качестве молекулярного инструмента оксидазу D-аминокислот (DAAO) – фермент, который катализируют реакцию дезаминирования различных D-аминокислот с образованием H₂O₂ в качестве продукта реакции. D-аминокислоты являются менее распространенными оптическими изомерами в клетках млекопитающих, поэтому DAAO можно использовать для направленной генерации H₂O₂ в системе, индуцируя реакцию внесением в систему какой-либо D-аминокислоты. С помощью сигнальных полипептидных меток мы локализовали DAAO в ядре (DAAO-NLS) и митохондриальном матриксе (DAAO-мито) клеток HeLa Kyoto и кортикальных нейронах мыши первичной культуры. Редокс-статус оценивали в цитозоле указанных типов клеток с помощью Grx1-roCherry-цито и в матриксе митохондрий с помощью Grx1-roGFP2-мито. Индукцию производства H₂O₂ в ядре или митохондриях запускали добавлением в клеточную среду 2 мМ D-норвалина. Мы показали, что образование H₂O₂ в ядре приводит к окислению биосенсоров как в

цитозоле, так и в митохондриях обоих типов клеток (**рис. 6А,Б**). В нейронах первичной культуры также наблюдается выраженное окисление в цитозоле и матриксе митохондрий в случае, если H_2O_2 образуется локально в митохондриях (**рис. 6В**). В отличие от нейронов, в клетках HeLa Kyoto при направленной продукции H_2O_2 в матриксе митохондрий окислительные процессы происходят исключительно в этом компартменте и не распространяются на цитозоль (**рис. 6Г**).

Клетки HeLa Kyoto по своей природе представляют онкотип. Такие клетки обладают высокой антиоксидантной активностью, причем у большинства клеток она основана на Trx-зависимой системе. В частности, наблюдается повышенная экспрессия Trx и TrxR, именно поэтому Trx-зависимую систему рассматривают в качестве перспективной мишени для терапии. Чтобы подтвердить роль Trx-системы в качестве основного фактора, ограничивающего распространение межкомpartmentного окисления в клетках HeLa Kyoto, мы применили ингибитор TrxR ауранофин. Клетки HeLa Kyoto предварительно инкубировали ночь в среде с добавлением 2,5 мкМ ауранофина (подобрано экспериментально по оценке активности TrxR), после чего проводили эксперимент с генерацией H_2O_2 в матриксе митохондрий с помощью локализованной в этом компартменте ДААО. При ингибировании TrxR в клетках HeLa Kyoto мы наблюдали окисление не только в митохондриях, но и в цитозоле (**рис. 6Д**). Добавление к клеткам DMSO в качестве контроля, так как в нем растворяли ауранофин, не оказывало подобного эффекта на сигнал биосенсоров (**рис. 6Е**). Таким образом, Trx-зависимая система играет ключевую роль в контроле распространения редокс-сигналов между внутриклеточными компартментами.

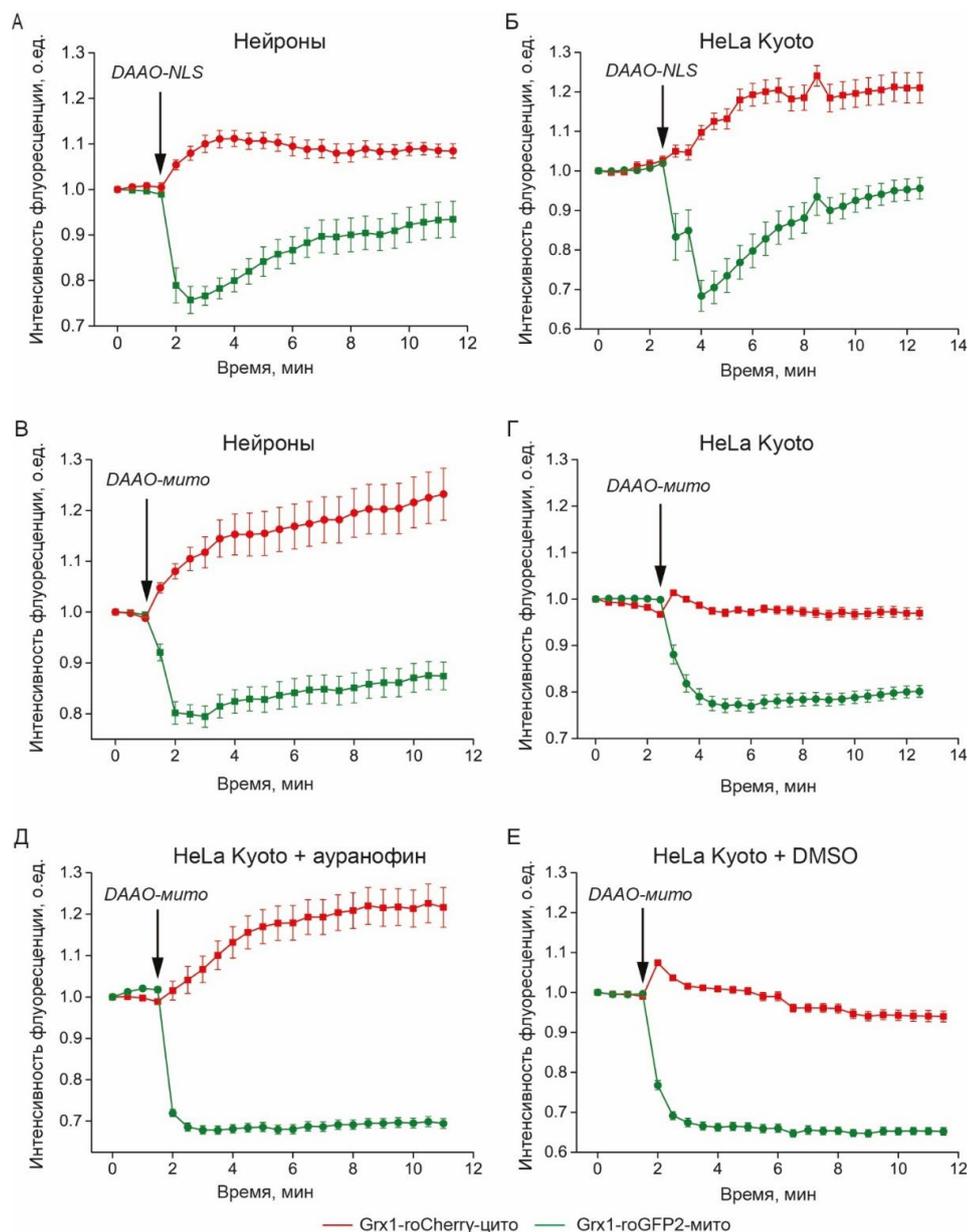


Рисунок 6. Динамика изменений редокс-статуса цитозоля (красные линии, измерено биосенсором Grx1-roCherry, сигнал F_{589}) и матрикса митохондрий (зеленые линии, измерено Grx1-roGFP2, сигнал F_{488}) в условиях локальной продукции H_2O_2 в митохондриях и ядре клеток HeLa Kyoto и нейронах смешанной эмбриональной культуры, полученной из кортексов эмбрионов мышей. Оксидаза D-аминокислот (DAAO) локализована в ядре (А) нейронов и (Б) клеток HeLa Kyoto (DAAO-NLS). DAAO локализована в матриксе митохондрий (В) нейронов и (Г) клеток HeLa Kyoto (DAAO-мито). Для исследования эффекта ингибирования TrxR клетки HeLa Kyoto инкубировали в течение ночи (Д) с 2,5 мкМ ауранофина и (Е) DMSO.

На всех графиках стрелками обозначен момент добавки в среду 2 мМ D-норвалина – субстрата DAAO, что запускает продукцию H_2O_2 . Значения сигналов Grx1-roCherry и Grx1-roGFP2 в каждой точке нормализованы на исходные. Планки погрешностей соответствуют стандартной ошибке среднего. В каждой серии данные усреднены по >10 нейронам и >40 клеткам HeLa Kyoto в 3-х независимых экспериментах. При окислении наблюдается увеличение сигнала F_{589} и снижение F_{488} .

2. Биосенсор для регистрации гипогалогенных кислот

В настоящее время гипогалогенные кислоты представляют собой класс наименее изученных биологически значимых соединений с высокой реакционной способностью. При дизайне нового биосенсора мы рассмотрели все известные на тот момент транскрипционные факторы бактерий, для которых были получены сведения об их модификациях (псевдо)гипогалогенными кислотами. В литературе нами было найдено четыре таких белка, три из которых, HupT (YjiE), RclR (YkgD) и NemR, были обнаружены в *E.coli* и один, HupR (YubR), в клетках *B.subtilis*. Когда мы уже остановили свой выбор и уже работали над созданием биосенсора на основе белка NemR, список подобных сенсорных белков продолжал пополняться. Мы выбрали белок NemR из *E.coli*, поскольку на тот момент он был наиболее охарактеризован. Для этого белка известна пространственная структура и предложен механизм функционирования. В условиях повышенной концентрации HOCl Cys106 подвержен хлорированию и является электрофильной мишенью для аминокислотной группы Lys175, с которой остаток сближается и формирует сульфенамидную связь благодаря подвижной петле в этой области (а.о. 97-105). Мы решили интегрировать cpYFP в эту подвижную область, предполагая, что локальные конформационные изменения, вызванные взаимодействием с HOCl, будут передаваться на FP, меняя микроокружение хромофора и спектральные характеристики.

Выбранная нами область в структуре NemR оказалась небольшой (с 97 а.о. по 105 а.о.), поэтому мы проверили все возможные позиции для интеграции FP. В качестве линкеров между NemR и cpYFP мы выбрали пары с последовательностями SAG/G и SAG/GT, которые также успешно зарекомендовали себя при построении целого ряда биосенсоров. В общей сложности нами было получено 12 версий NemR-cpYFP с разными вариациями. Полученные версии тестировали в клетках *E.coli* штамма XL1 Blue, оценивая яркость и изменение спектральных свойств при добавлении к клеткам NaOCl до конечной концентрации 80 мкМ. Наибольшие изменения показала версия 102-105 (SAG/GT) (рис. 7), и в итоге была отобрана нами для дальнейших тестов. Новый биосенсор мы назвали Hypocrates (от **Hypochlorite Ratiometric Sensor**), что также созвучно с именем

античного врача Гиппократ (англ. Hippocrates), который одним из первых в истории начал описывать воспалительные процессы в организме человека.

Свойства нового биосенсора мы охарактеризовали на очищенном препарате белка. Биосенсор Нурocrates характеризуется двумя пиками в спектре возбуждения флуоресценции с максимумами при 425 нм и 500 нм и одним пиком с максимумом при 520 нм в спектре эмиссии (рис. 8А). Как и в клетках бактерий, добавление к белку NaOCl приводит в спектре возбуждения флуоресценции к выраженному увеличению интенсивности депротонированной формы хромофора при пропорциональном падении интенсивности протонированной (рис. 8Б). Таким образом, Нурocrates демонстрирует ратиометрическое поведение сигнала, который рассчитывается как соотношение E_{x500}/E_{x425} . Изменение флуоресцентного сигнала обратимо, при инкубировании этой же пробы с избытком дитиотреитола DTT происходит восстановление спектра (рис. 8Б).

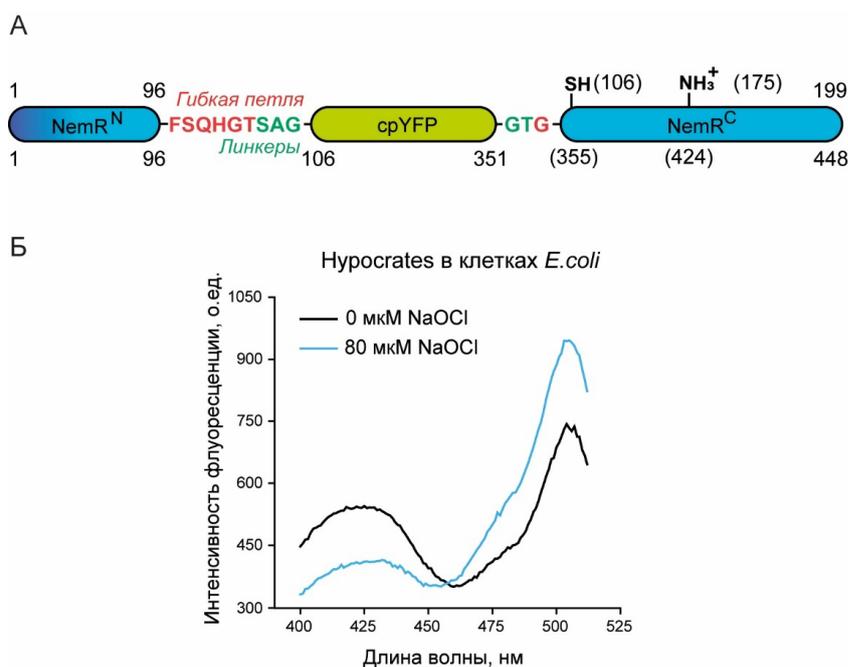


Рисунок 7. Биосенсор Нурocrates. (А) Структура Нурocrates: голубым отмечены части $NemR^{C106}$, желтым – $cpYFP$, линкеры SAG и GT обозначены зеленым, последовательность красных букв обозначает подвижную петлю в $NemR$. Нумерация ключевых а.о. относительно последовательности $NemR$ обозначена сверху. Снизу те же а.о. указаны относительно последовательности общей химерной конструкции. (Б) Спектр возбуждения флуоресценции биосенсора Нурocrates в клетках *E.coli* в восстановленной и окисленном состояниях.

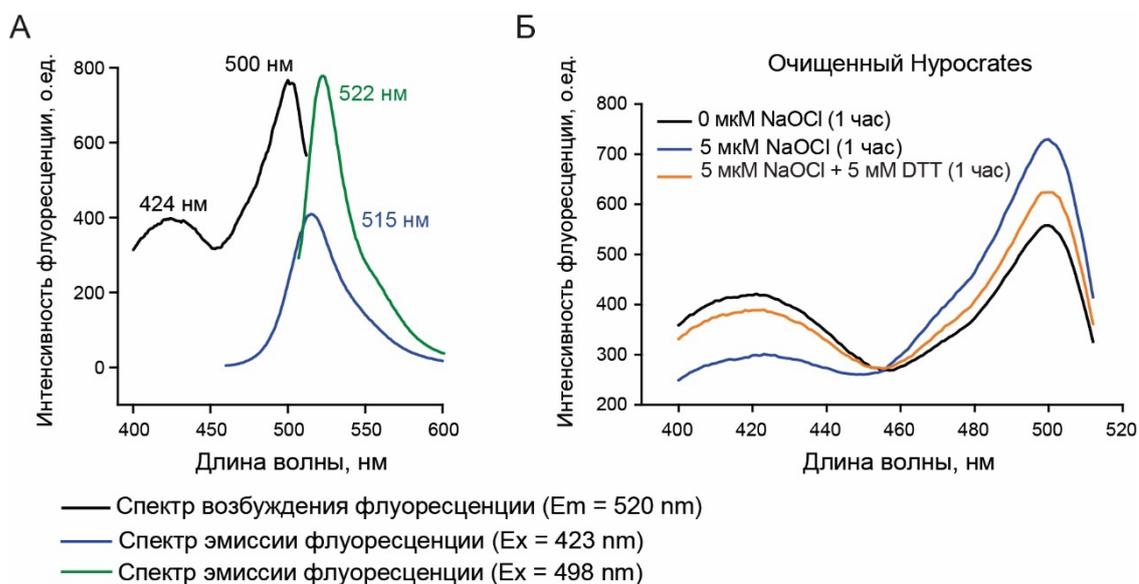


Рисунок 8. Спектральные характеристики биосенсора Hupocrates. (А) Спектры возбуждения и эмиссии флуоресценции Hupocrates. (Б) Изменения в спектре возбуждения флуоресценции Hupocrates при добавлении NaOCl и последующей инкубации с восстановителем DTT. Измерения сделаны в PBS, концентрация белка в пробе 0,5 мкМ. Для максимально выраженного ответа каждую пробу инкубировали в течение 1 часа перед измерением.

Активные формы галогенов представлены целым классом соединений. Добавления к пробе Hupocrates NaOBr, HOCl, которую относят к так называемой псевдогипогалогенной кислоте за сходства химических свойств с HOCl и HOBr, вызывают сравнимые с NaOCl изменения в спектре возбуждения флуоресценции (рис. 9А,Б). Мы также проверили влияние на сигнал биосенсора производных гипогалогенных кислот. Наиболее интересными такими производными являются хлорамины, мы выбрали N-хлоротаурин (NCT). Таурин представляет собой одну из самых распространенных аминокислот во многих тканях. Например, именно в нейтрофилах NCT является одним из наиболее распространенных производных HOCl. При взаимодействии с NCT Hupocrates также демонстрирует обратимое изменение сигнала (рис. 9В). Таким образом, мы позиционируем Hupocrates как биосенсор на (псевдо)гипогалогенные кислоты и их производные. Важно отметить, что в биологических системах при функционировании гемовых пероксидаз Hupocrates в основном и будет находиться в условиях образования смеси различных активных форм галогенов и их производных.

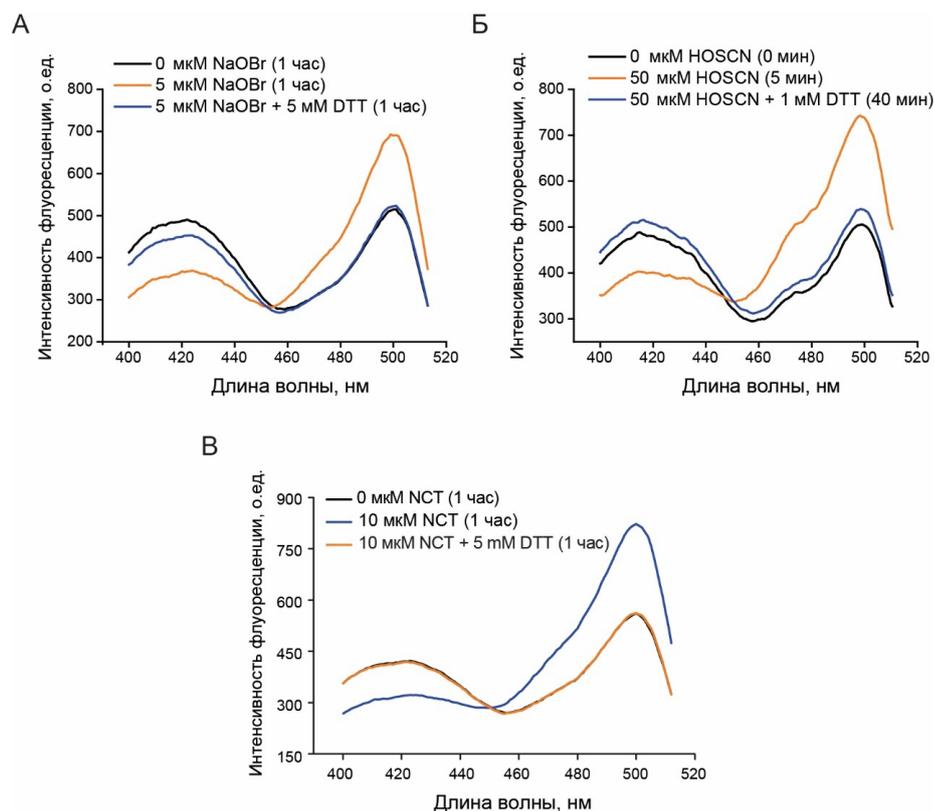


Рисунок 9. Изменения в спектре возбуждения флуоресценции биосенсора Нуросcrates в присутствии (А) NaOBr (Б) HOSCN (В) N-хлоротаурина (NCT) при последующей инкубации всех проб с восстановителем DTT. Концентрация белка в пробе с HOSCN 2 μM , в остальных – 0,5 μM . Для максимально выраженного ответа каждую пробу инкубировали в течение 1 часа перед измерением.

Для определения чувствительности биосенсора мы титровали белок (0,5 μM белка Нуросcrates в пробе) целевыми аналитами в разных концентрациях (до 15 μM). Нуросcrates демонстрировал максимальную амплитуду ответа (E_{x500}/E_{x425}) при взаимодействии с NaOBr – в 2 раза; чуть ниже (в 1,8 раз) при взаимодействии с NaOCl и HOSCN; в 1,7 раз – с NCT (**рис. 10**). Мы также установили минимальные концентрации гипогалогенных кислот, которые может регистрировать Нуросcrates. Пределы регистрации составляют ~330 нМ для NaOCl, ~290 нМ для NCT, ~100 нМ для NaOBr, ~120 нМ для HOSCN. Учитывая, что в тканях при воспалении концентрации продуктов гипогалогенного стресса могут достигать локально нескольких мМ, чувствительность биосенсора Нуросcrates является достаточной для применения данного инструмента в биологических моделях.

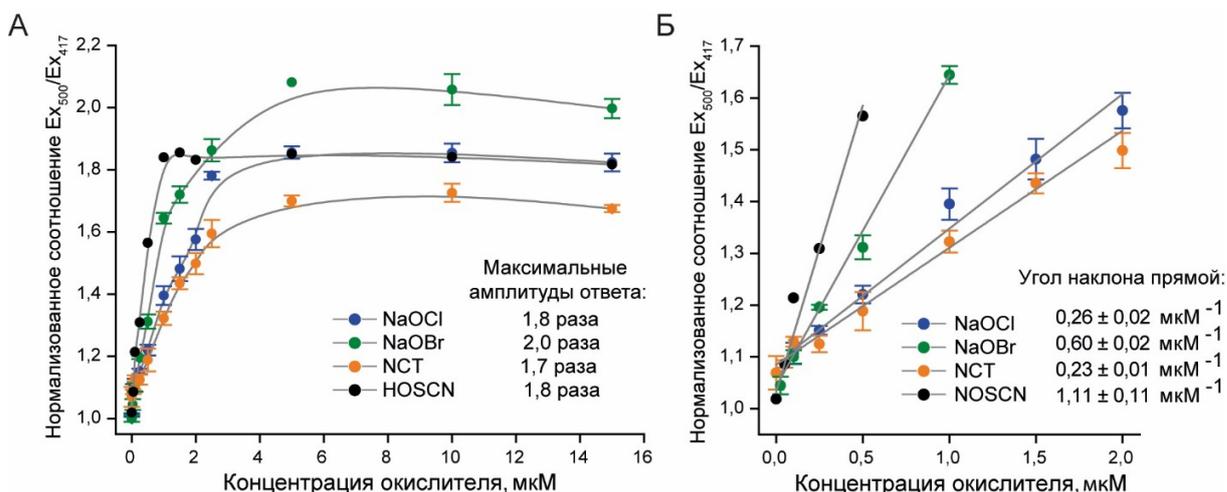


Рисунок 10. Чувствительность биосенсора Нурocrates. (А) Кривые титрования Нурocrates (0,5 мкМ в пробе) в натрий-фосфатном буфере при добавлении NaOCl, NaOBr, HOSCN или NCT. Данные представлены в виде среднего, планки погрешностей обозначают стандартную ошибку среднего, $N \geq 2$. Максимальные амплитуды ответа составляют 2,0 для HOBr, 1,8 для HOSCN и NaOCl, 1,7 для NCT. В присутствии NaOBr, NaOCl и NCT биосенсор в концентрации 0,5 мкМ насыщается при ~5 мкМ, а в случае HOSCN – при ~1 мкМ. На рисунке (Б) представлены те же данные, что и в (А), но в удобном масштабе графика для анализа низких концентраций указанных аналитов.

Активные формы галогенов обладают высокой реакционной способностью и поэтому быстро взаимодействуют с широким спектром внутриклеточных мишеней. Важно, чтобы разрабатываемый инструмент в условиях живой клетки не проигрывал различным мишеням в скорости взаимодействия. В коллаборации с лабораторией Joris Messens (Бельгия) мы определили кинетические свойства Нурocrates, применив метод остановленной струи (a stopped-flow instrument). Нурocrates ~ в 100 раз быстрее реагирует с NaOBr ($\sim 4,5 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) и NaOCl ($\sim 1,4 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) по сравнению с NCT ($\sim 6,1 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$). Биосенсор демонстрирует необычно высокое значение константы по отношению к NCT. Причем Нурocrates ($6,1 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) реагирует с NCT даже быстрее, чем исходный NemR ($4,4 \times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$). Таким образом, Нурocrates чувствителен к различным (псевдо)гипогалогенным кислотам и их производным, что в биологических условиях будет отражать общую динамику продуктов гипогалогенного стресса. Однако благодаря своим кинетическим особенностям в условиях живых систем Нурocrates, вероятнее всего, будет предпочтительнее взаимодействовать с более селективными и стабильными производными такими, как хлорамины.

Мы также установили влияние на сигнал Hupocrates других редокс-активных соединений. Среди биологически значимых редокс-активных компонентов мы проверили влияние H_2O_2 , GSH и GSSG, $O_2^{\cdot-}$ (продуцируемый в реакции ксантин/ксантин оксидаза), $\cdot NO$ (донор MAHMA NONOate), $ONOO^-$, Na_2S , ряда активных электрофилов, среди которых глиоксаль, метилглиоксаль, формальдегид. Hupocrates продемонстрировал выраженный радиометрический ответ помимо целевых аналитов лишь в присутствии $ONOO^-$ (рис. 11). На данный момент трудно сказать, является ли это свойством Hupocrates, или исходно белок NemR может взаимодействовать с $ONOO^-$. Однако в системах, где оценивается высокая вероятность продукции $ONOO^-$, может потребоваться проведение дополнительных контролей, например, ингибирование $\cdot NO$ -синтаз.

Путем замены ключевого аминокислотного остатка Cys355 в Hupocrates мы создали контрольную версию биосенсора. Версия Hupocrates-Cys355Ser (HupocratesCS) в клетках *E.coli* демонстрирует схожие спектральные характеристики, однако не демонстрирует изменения сигнала при добавлении NaOCl (рис. 12А). Контрольная версия не только подтверждает механизм функционирования биосенсора, но и рекомендована нами к применению в исследованиях, чтобы оценивать воздействие неспецифических воздействий на сигнал инструмента. В частности, Hupocrates и HupocratesCS демонстрируют высокую степень сходства по чувствительности к изменениям pH (рис. 12Б).

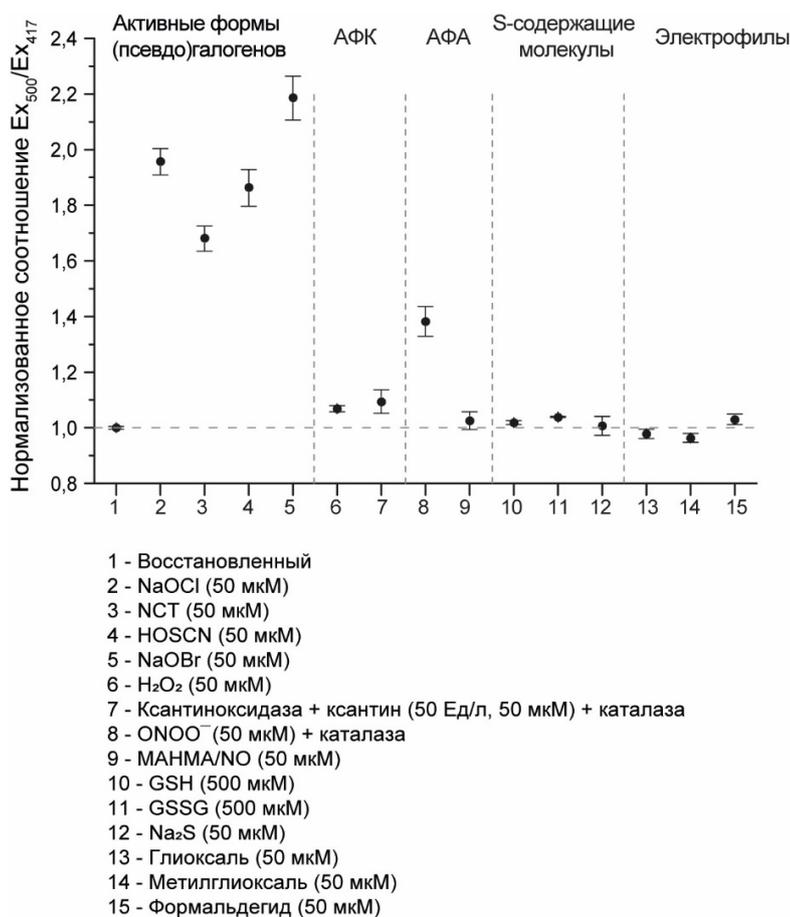


Рисунок 11. Профиль селективности очищенного препарата биосенсора Hyprocrates (2 мкМ в пробе) по отношению к различным редокс-компонентам.

Представлены средние значения, планки погрешностей обозначают стандартное отклонение среднего, $N \geq 3$.

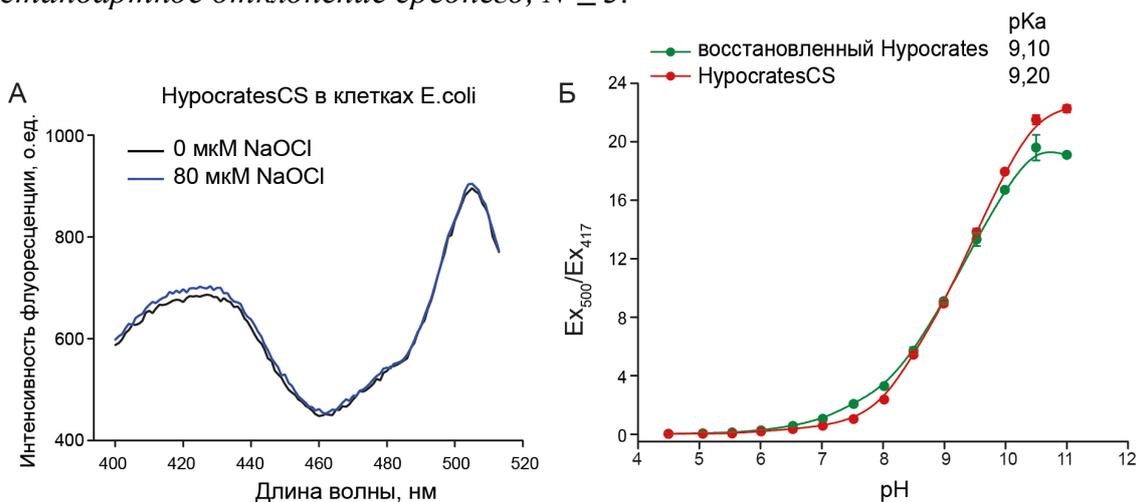


Рисунок 12. Контрольная версия HyprocratesCS. (А) Спектр возбуждения флуоресценции версии HyprocratesCS в суспензии клеток E.coli до и после добавления NaOCl. (Б) Сравнение чувствительности восстановленного Hyprocrates и его контрольной версии HyprocratesCS к изменению pH среды. Концентрация белка в пробе 0,5 мкМ. Представлены средние значения, планки погрешностей обозначают стандартное отклонение среднего, $N \geq 3$.

Для лучшего понимания механизма функционирования биосенсора Нурocrates мы совместно с коллегами из лаборатории под руководством Joris Messens (Бельгия) попытались расшифровать его пространственную структуру. Мы полагаем, что результаты данной работы будут полезны для дальнейшей оптимизации биосенсора, например, для получения версий с увеличенной амплитудой ответа, или помогут выявить особенности структуры, определяющие чувствительность к рН и ONOO^- . Мы планировали получить кристаллы для рентгеноструктурного анализа для обеих форм Нурocrates (окисленной и восстановленной), а также контрольной версии НурocrateCS. Однако лишь НурocrateCS формировал орторомбические кристаллы ($C222_1$, $a = 90,23$; $b = 95,44$; $c = 106,25$; $\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$), которые содержали одну молекулу белка на ассиметричную единицу с достаточной дифракцией (разрешение $2,2 \text{ \AA}$). При наложении структур исходного белка NemR и этого же белка в составе НурocratesCS мы выявили выраженное сходство их пространственных организаций со среднеквадратичным отклонением 0.506 \AA для 159 атомов (**рис. 13**). Таким образом, интеграция cpYFP оказала минимальный эффект на структуру NemR в составе биосенсора Нурocrates.

Интерес представляет остаток Asn95, который расположен на связывающей NemR и cpYFP подвижной петле и при этом сопряжен с хромофорным окружением. В частности, Asn95 взаимодействует с Gln96 и Phe97, принадлежащих NemR части, и консервативным для FP Ser166, который вовлечен в организацию пути переноса протона в возбужденном состоянии (Excited State Proton Transfer (ESPT)) (**рис. 13Г**). Возможно, окисление Нурocrates приводит к конформационным перестройкам как раз с участием Asn95, расположенного в подвижной области и в сопряжении с хромофором. Примечательно, что другие контакты между аминокислотными остатками cpYFP и NemR, судя по всему, представлены в небольшом количестве. Так, например, возможны гидрофобные π - π взаимодействия между кольцами остатков Phe184 и Phe429, Tyr67 и Tyr106. На основе анализа расстояний водородные связи могут быть образованы между Gln91 и Gln165, Gln19 и Asn131, Arg24 и Glu13. Нам неизвестно, насколько данные взаимодействия могут участвовать в механизмах функционирования биосенсора Нурocrates. Однако в будущем это может стать предметом отдельного исследования при поиске улучшенных версий инструмента.

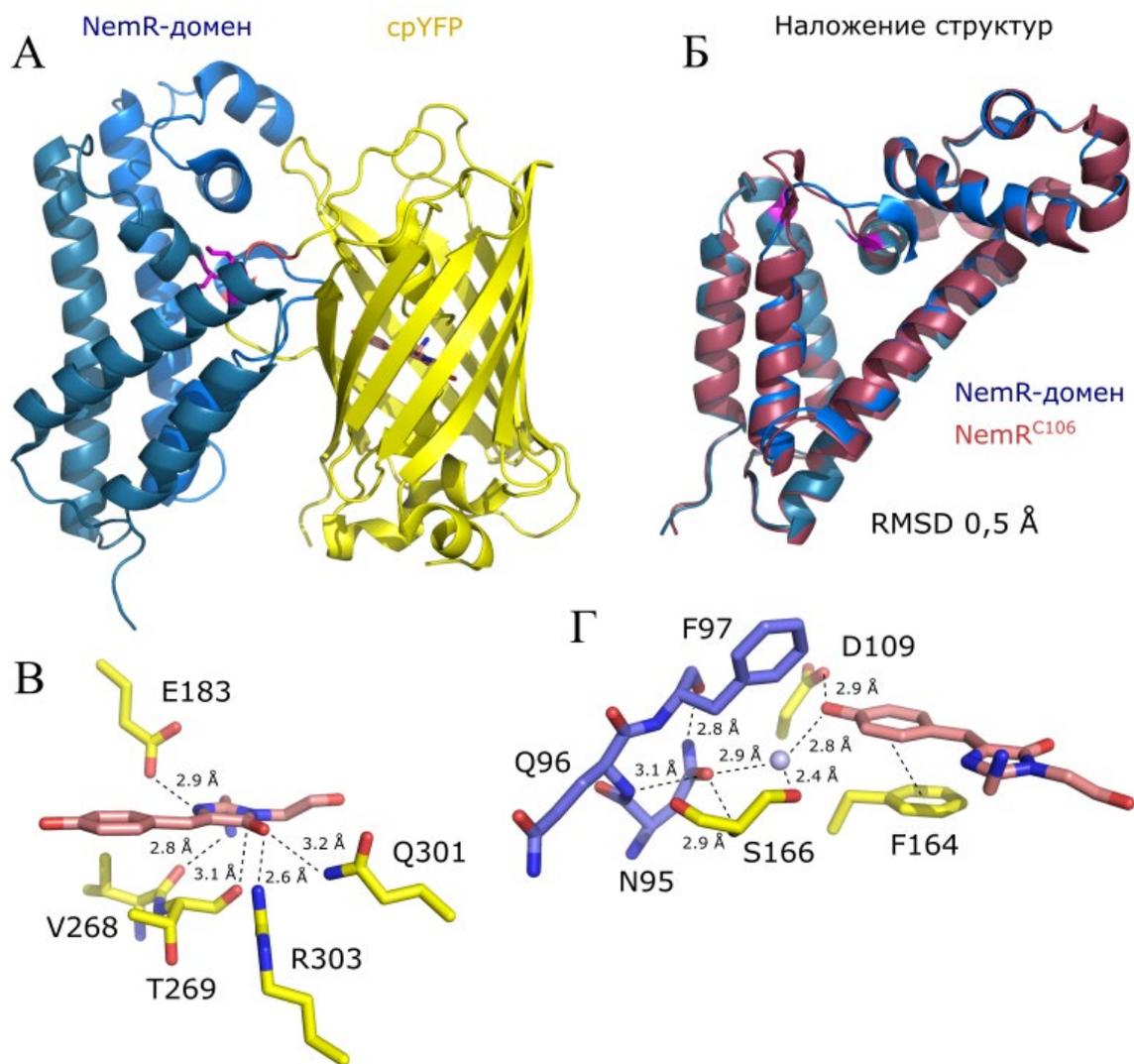


Рисунок 13. Пространственная структура HurocratesCS. (А) Вид общей структуры HurocratesCS. Синим цветом отмечена сенсорная часть NemR, в структуре которой розовым отмечены ключевые остатки Ser355 и Lys424; желтым – флуоресцентный домен cpYFP; красным – линкерные части между NemR и cpYFP. (Б) Наложение структуры NemR^{S106} из HurocratesCS и NemR^{C106} (PDB ID: 4YZE), демонстрирующее высокую степень сходства. RMSD обозначает среднеквадратичное отклонение. (В) Окружение хромофора (розовым) HurocratesCS. (Г) Сопряжение остатков подвижной петли NemR (синие) с остатками хромофорного окружения cpYFP (желтые). Скоординированная молекула H₂O обозначена голубым шариком.

Важно отметить, что Hurocrates представляет первый редокс-биосенсор на основе кругового пермутанта FP с расшифрованной пространственной структурой.

Мы также протестировали биосенсор в клетках эукариот. При добавлении в клеточную среду NaOCl биосенсор в клетках HeLa Kyoto демонстрировал радиометрическое изменение E_{x500}/E_{x425} с максимальной амплитудой в 1,8 раз

(рис. 14А). Минимально детектируемые изменения сигнала Нурocrates мы наблюдали при концентрации $4 \text{ нмоль}/10^5$ клеток (рис. 14Б). Важно отметить, что в клетках HeLa Kyoto Нурocrates демонстрирует обратимый ответ, т.е. биосенсор способен восстанавливаться антиоксидантными системами. Мы провели серию нескольких раундов окисления/восстановления, добавляя новую порцию NaOCl в среду после каждого последующего восстановления. При каждой добавке Нурocrates демонстрировал быстрый ответ хоть и с меньшей амплитудой при каждой последующей добавке, что вероятно связано с окислительным повреждением как клеток, так и биосенсора (рис. 14В). Мы также провели параллельную серию экспериментов с инактивированной версией НурocratesCS и рН-биосенсором *SypHer3s*. В аналогичных условиях при максимально возможной концентрации NaOCl мы показали, что в клетках HeLa Kyoto гипогалогенный стресс не вызывает изменений рН в цитозоле. Контрольная версия НурocratesCS в этих же условиях также не демонстрировала даже минимальных изменений сигнала (рис. 14Г).

Для проверки функционирования Нурocrates в условиях эндогенной продукции гипогалогенных кислот мы выбрали нейтрофилы – клетки с высоким уровнем содержания миелопероксидазы. Клетки получали из крови здоровых добровольцев. К свежесыведенным нейтрофилам мы добавляли суспензию клеток *E.coli*, экспрессирующих ген Нурocrates и предварительно подвергнутых опсонизации человеческой сывороткой. Далее визуализировали активный фагоцитоз нейтрофилами, при этом каждая фагоцитируемая бактерия демонстрировала выраженное изменение сигнала Нурocrates (рис. 15). Свободные бактерии, которые не были поглощены лейкоцитам, никак не изменяли флуоресцентного сигнала. Для версии НурocratesCS в бактериях мы также обнаружили изменение сигнала при попадании в фагосому, при этом сигнал изменялся в меньшей степени: увеличение сигнала ~ в 1,9 раз для НурocratesCS и ~ в 3,1 раза для Нурocrates. Это объясняется тем, что в условиях фагосомы бактерии испытывают не только гипогалогенный стресс, но и выраженное защелачивание. Известно, что по мере созревания фагосомы внутреннее значение рН изменяется. Причем рН повышается именно в первые несколько минут после интернализации.

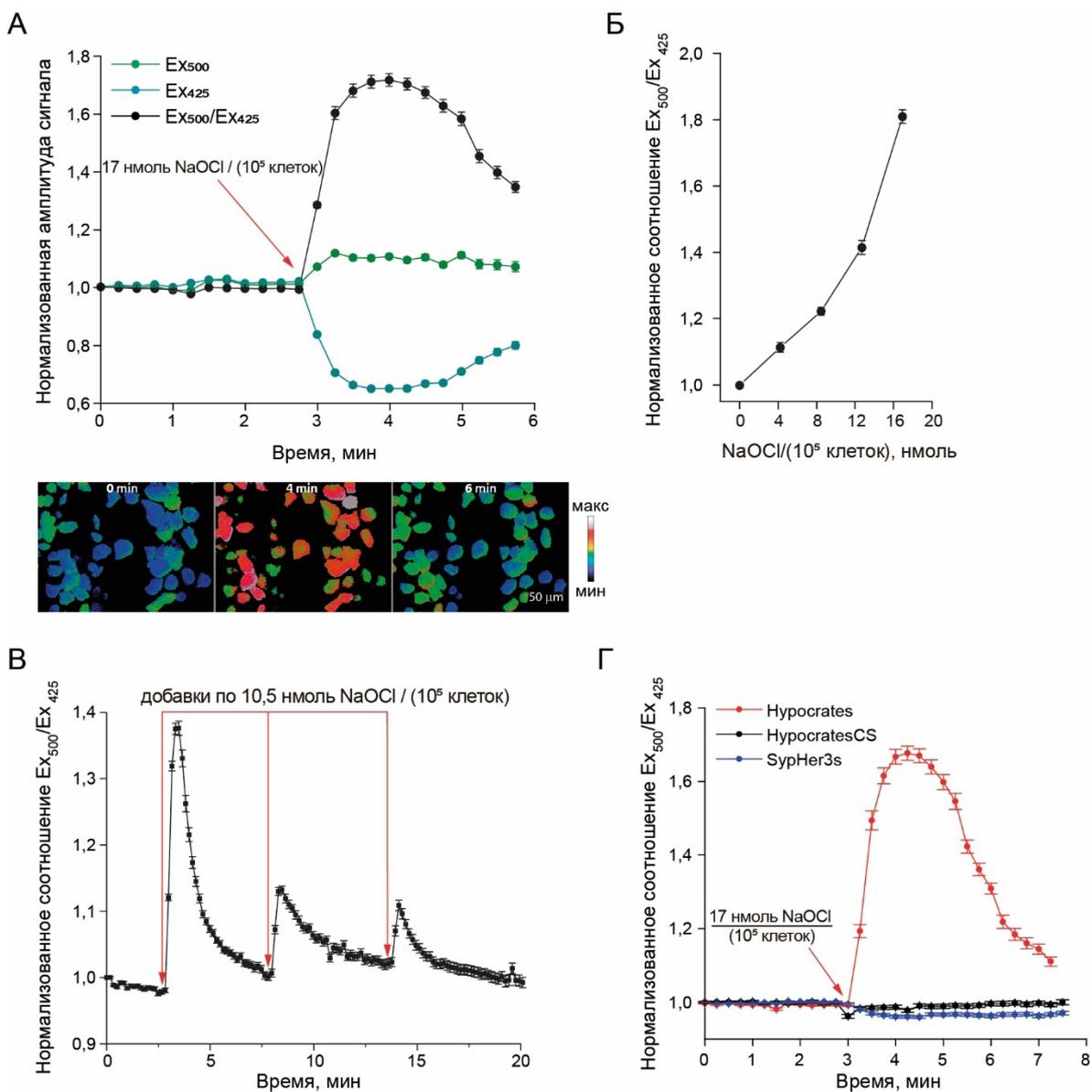


Рисунок 14. Биосенсор Нурocrates в эукариотических клетках линии HeLa Kyoto.

(А) Динамика сигнала Нурocrates в отдельных флуоресцентных каналах Ex₅₀₀, Ex₄₂₅ и в соотношении Ex₅₀₀/Ex₄₂₅ при добавлении к клеткам HeLa Kyoto в среду NaOCl из расчета 17 нмоль/ 10^5 клеток. Ниже представлены фотографии клеток с экспрессией гена Нурocrates, подвергнутых воздействию NaOCl 17 нмоль/ 10^5 клеток. Представлены разные временные точки, которые совпадают со значениями на графиках выше. Псевдоцвета соответствуют значениям сигнала Нурocrates: от минимального синего до максимальных красных оттенков. Линейка масштаба 50 мкм. **(Б)** График кривой титрования Нурocrates в клетках HeLa Kyoto при разных концентрациях NaOCl. **(В)** Обратимое изменение сигнала Нурocrates в клетках HeLa Kyoto при повторных добавках NaOCl в концентрации 10,5 нмоль/ 10^5 клеток. **(Г)** Динамика сигнала биосенсоров Нурocrates, контрольной версии НурocratesCS и SypHer3s в клетках HeLa Kyoto при добавлении NaOCl в концентрации 17 нмоль/ 10^5 клеток. На всех графиках указаны средние значения, планки погрешностей обозначают стандартное отклонение среднего, $N \geq 2$ при более 25 клеток в каждом эксперименте.

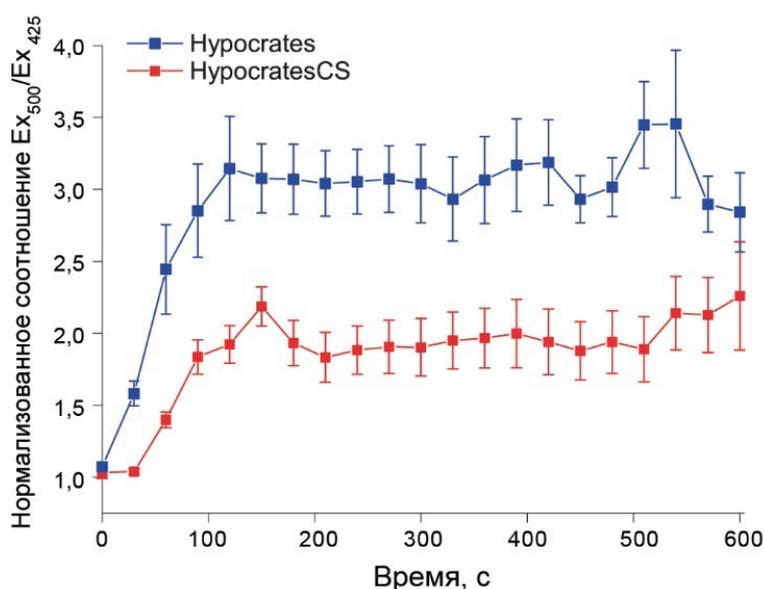
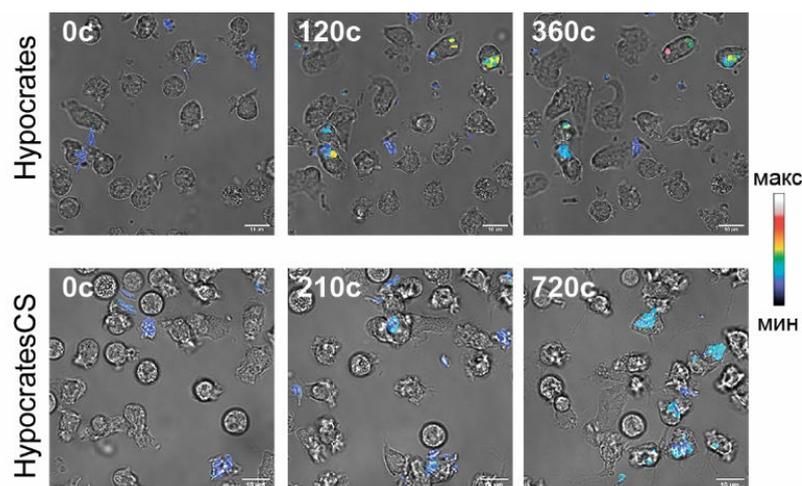


Рисунок 15. Динамика биосенсора *Hypocrates* в клетках *E.coli*, фагоцитируемых нейтрофилами человека. Сверху изображены человеческие нейтрофилы, фагоцитирующие клетки *E.coli* с экспрессией гена *Hypocrates* или контрольной версии *HypocratesCS*. Псевдоцвета соответствуют значениям сигнала *Hypocrates*: от минимального синего до максимальных красных оттенков. Линейка масштаба 10 мкм. Внизу представлен график динамики сигналов *Hypocrates* и *HypocratesCS* в фагоцитируемых нейтрофилами клетках *E.coli*. Начальная точка на графике соответствует моменту фагоцитоза нейтрофилами отдельных бактерий. На графике указаны средние значения, планки погрешностей обозначают стандартное отклонение среднего, $N = 3$ (35 клеток).

Таким образом, мы разработали и охарактеризовали биосенсор *Hypocrates*, который может быть использован в качестве надежного инструмента для визуализации динамики продуктов гипогалогенного стресса в живых системах в режиме реального времени.

3. Исследования редокс-процессов в моделях *in vivo* с помощью генетически кодируемых биосенсоров

Главное и неоспоримое преимущество генетически кодируемых биосенсоров на основе FP заключается в возможности их применения в тканях живых организмов, что позволяет визуализировать динамику интересующих процессов *in vivo*. Регистрация биохимических событий в режиме реального времени в тканях живых объектов особенно актуальна при изучении острых динамичных процессов, когда в клетках даже в секундной шкале могут происходить существенные перестройки в метаболизме и сигналинге. Мы сосредоточились на изучении воздействия на ткани модельных организмов (рыбы, грызуны) гипоксии и воспалительных процессов.

Несмотря на то, что уже известны многие особенности биохимических процессов в клетках, вызванных условиями гипоксии, по-прежнему в патогенезе таких заболеваний, как ишемический инсульт головного мозга и инфаркт миокарда, достаточно «белых пятен», затрудняющих разработку эффективных терапевтических подходов. Например, какова роль окислительного стресса в этих патологических процессах? Когда и в каком количестве происходит образование АФК в тканях, подвергнутых гипоксии/ишемии?

Мы разработали несколько исследовательских платформ для визуализации динамики биохимических параметров в условиях гипоксии/ишемии с применением разных биологических объектов. Для работы с клеточными культурами и рыбами *Danio rerio* мы разработали установку, которая обеспечивает быстрое и при этом точное изменение уровня O_2 в среде, в котором находится объект исследования. Объект помещается в чашку для микроскопии, что позволяет визуализировать динамику флуоресцентного сигнала выбранного биосенсора при изменении концентрации O_2 в режиме реального времени. Схема установки представлена на **рисунке 16**. Разработанная система позволяет за несколько секунд снизить в среде O_2 в диапазоне от $pO_2 \sim 150$ мм рт. ст. ($\sim 20\%$ O_2) до $pO_2 < 5$ мм рт. ст. ($< 1\%$ O_2) с последующим быстрым возвращением к исходному значению.

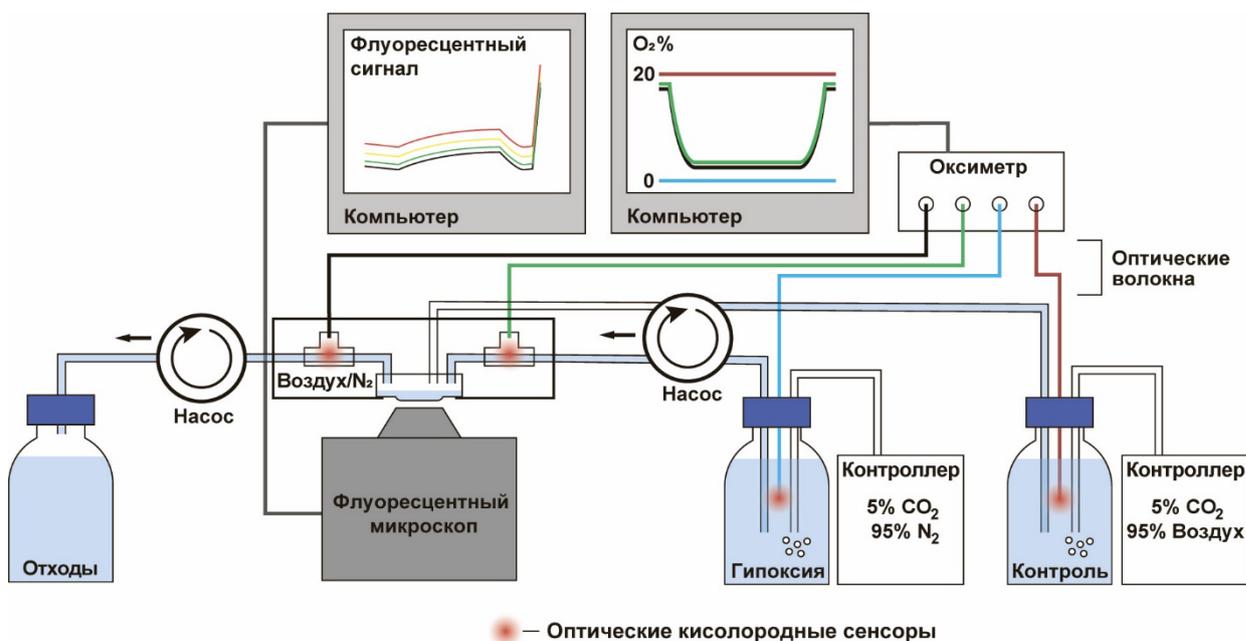


Рисунок 16. Схема установки для моделирования условий гипоксии/реоксигенации. При нормоксии раствор с высоким содержанием O_2 ($pO_2 \sim 150$ мм рт.ст., регистрируется кислородным датчиком и поддерживается газовым контроллером) подается через трубку в камеру, в которой находится чашка с исследуемым образцом. В камере также поддерживается нормальная атмосфера. При создании условий гипоксии подача жидкости переключается на сосуд с деоксигенированным раствором ($pO_2 < 5$ мм рт. ст.), в этом случае кислородный датчик установлен на входную трубку. Одновременно с этим в камеру также подается N_2 . Уровень O_2 регистрируется также в выходящей из камеры жидкости на выводящей трубке. В режиме реального времени происходит запись со всех кислородных датчиков, а также ведется регистрация флуоресцентного сигнала от исследуемого объекта с помощью микроскопа через подведенный к камере объектив.

Мы также разработали подход на основе оптоволоконного интерфейса и генетически кодируемых флуоресцентных биосенсоров, который позволяет регистрировать динамику интересующего процесса в тканях мозга лабораторных грызунов *in vivo* с первых секунд развития ишемического повреждения. Установка была разработана на базе лаборатории фотоники и нелинейной спектроскопии МГУ им. М.В. Ломоносова под руководством Желтикова А.М. На **рисунке 17** представлена схема созданной установки. Уникальность системы в том, что регистрация флуоресцентного сигнала биосенсора осуществляется по нескольким координатам мозга и двум независимым флуоресцентным каналам, что позволяет считывать радиометрический сигнал биосенсоров на основе $srYFP$.

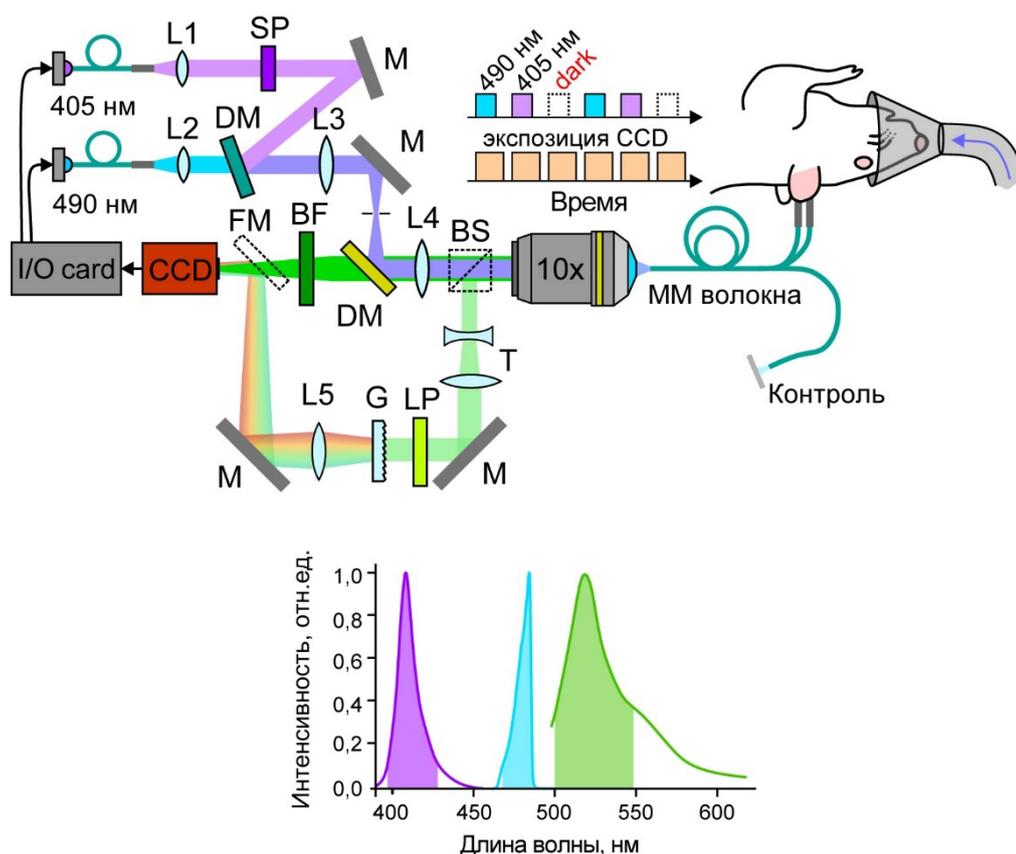


Рисунок 17. Схема оптоволоконной оптической установки для регистрации ратиометрического флуоресцентного сигнала биосенсора в тканях мозга крыс *in vivo* по двум координатам. Обозначения: *M* (dielectric mirrors) – диэлектрические зеркала; *DM* (dichroic mirrors) – дихроичные зеркала; *I/O card* – многофункциональное устройство ввода-вывода; *CCD* (Charge-Coupled Device) камера; *BF* (bandpass filter) – полосовой фильтр; *SP* (shortpass filter) – коротковолновой фильтр; объектив микроскопа (10X); *MM Fibers* (multimode fibers) – многомодовые волокна. На вкладке сверху представлена диаграмма считывания флуоресценции с разделением по длинам волн с временным разрешением. Снизу представлены спектры возбуждающего флуоресценцию света, подаваемого светодиодными источниками (405 нм изображен фиолетовым, 490 нм – голубым), а также спектр эмиссии флуоресценции (зеленым) для биосенсоров на основе *srYFP*.

Мы работали с гипертензивной линией крыс SHR (Charles River), применяя модель ишемического инсульта путем окклюзии средней мозговой артерии, для этого вводили специальный окклюдер через внутреннюю сонную артерию. Примерно за месяц до эксперимента животным инъецировали в ткань мозга суспензию AAV вирусных частиц, несущих ген выбранного биосенсора. По этим же координатам в мозг имплантировали оптические волокна, которые фиксировали на черепе через керамический адаптер с помощью акрилового стоматологического цемента (Stoelting Co). Через месяц в мозге формировалась флуоресцирующая

область, соответствующая области заражения вирусом. Координаты мозга выбирали таким образом, чтобы область флуоресценции перекрывалась зоной будущего ишемического повреждения при перекрытии средней мозговой артерии. Экспериментально нами было установлено, что наиболее оптимальной областью является структура мозга хвостатое ядро, которое попадает в центральную часть инсульта (длина имплантируемого оптического волокна 5,2 мм) (рис. 18). Животных вводили в наркоз (изофлуран), подключали волокна к оптической схеме и проводили хирургическую манипуляцию по моделированию инсульта, регистрируя динамику флуоресцентного сигнала во время операции, а также в течении ишемии и последующей реперфузии.

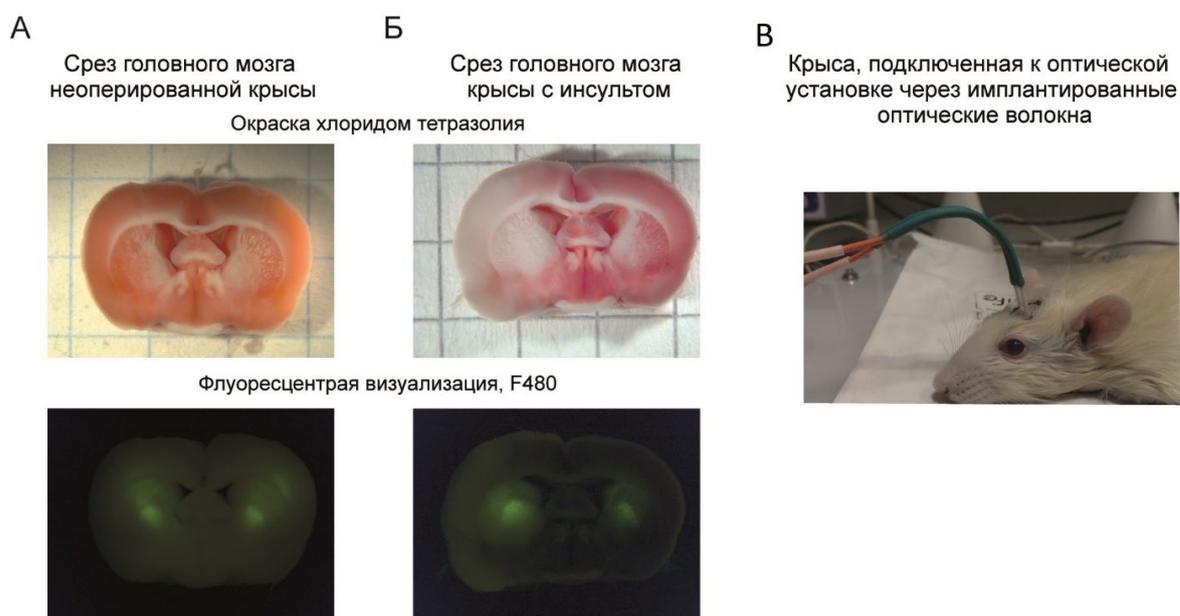


Рисунок 18. Регистрация флуоресцентного сигнала биосенсора в тканях мозга крыс с помощью оптоволоконного интерфейса. Представлены срезы мозга (А) ложнооперированной крысы (выполнены все хирургические манипуляции за исключением окклюзии средней мозговой артерии) и (Б) крысы с ишемическим инсультом через 24 часа с момента окклюзии сосуда. Сверху представлены фотографии срезов, которые прокрашены красителем 2,3,5-трифенилтетразолием хлористым, визуализирующим поврежденную область (здоровая ткань красится розовым, поврежденная остается не прокрашенной). Ниже изображения этих же срезов получены с помощью флуоресцентного стереомикроскопа. Зеленые флуоресцирующие области в тканях на срезе соответствуют области экспрессии гена биосенсора (на примере *HuPer7*), доставленного с помощью вируса. Область экспрессии гена биосенсора перекрывается областью ишемического повреждения. (В) Фотография животного с имплантированными оптическими волокнами в структуру хвостатое ядро каждого полушария мозга и подключенными к ним оптическими кабелями, ведущими в установку для измерения флуоресцентного сигнала.

3.1. Динамика ацидоза в культуре нейронов при гипоксии и в тканях мозга крыс при ишемическом инсульте

Мы исследовали, как изменятся рН в цитозоле и матриксе митохондрий гиппокампальных нейронов мыши в условиях гипоксии и последующей реоксигенации. Для этого клеточную культуру нейронов с экспрессией гена биосенсора *SypHer3s* или его локализованной в митохондриях версии *SypHer3s-МИТО* мы подвергали условиям гипоксии с помощью проточной системы, схема которой представлена на **рисунке 16**. При резком снижении O_2 в среде с первых же секунд мы наблюдали в клетках развитие ацидоза, который затрагивал оба исследуемых компартмента. В цитозоле *SypHer3s* демонстрировал гораздо больший диапазон ответа по сравнению с сигналом этого же биосенсора, локализованном в митохондриальном матриксе (**рис. 19**). При восстановлении уровня O_2 к норме мы наблюдали возвращение сигнала *SypHer3s* к исходным значениям в обоих компартментах примерно за 5 минут.

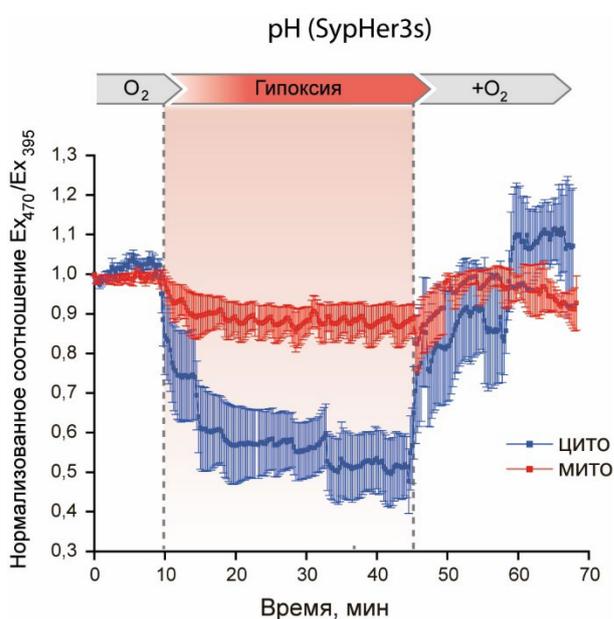


Рисунок 19. Динамика рН в культуре гиппокампальных нейронов в условиях гипоксии/реоксигенации. Сигнал *SypHer3s* (F_{470}/F_{395}) нормализован и усреднен суммарно по 184 нейронам с локализацией в цитозоле и 94 нейронам с локализацией в митохондриях. Планки погрешностей обозначают стандартное отклонение среднего, проведено не менее 6 независимых экспериментов для каждой локализации. Снижение флуоресцентного сигнала соответствует снижению рН.

In vivo в центральной зоне инсульта головного мозга у крыс значение рН в цитозоле нейронов при норме $7,25 \pm 0,08$ (s.d.) в течение нескольких минут с момента окклюзии артерии снижается до значений $6,7 \pm 0,15$ (s.d.) (**рис. 20**).

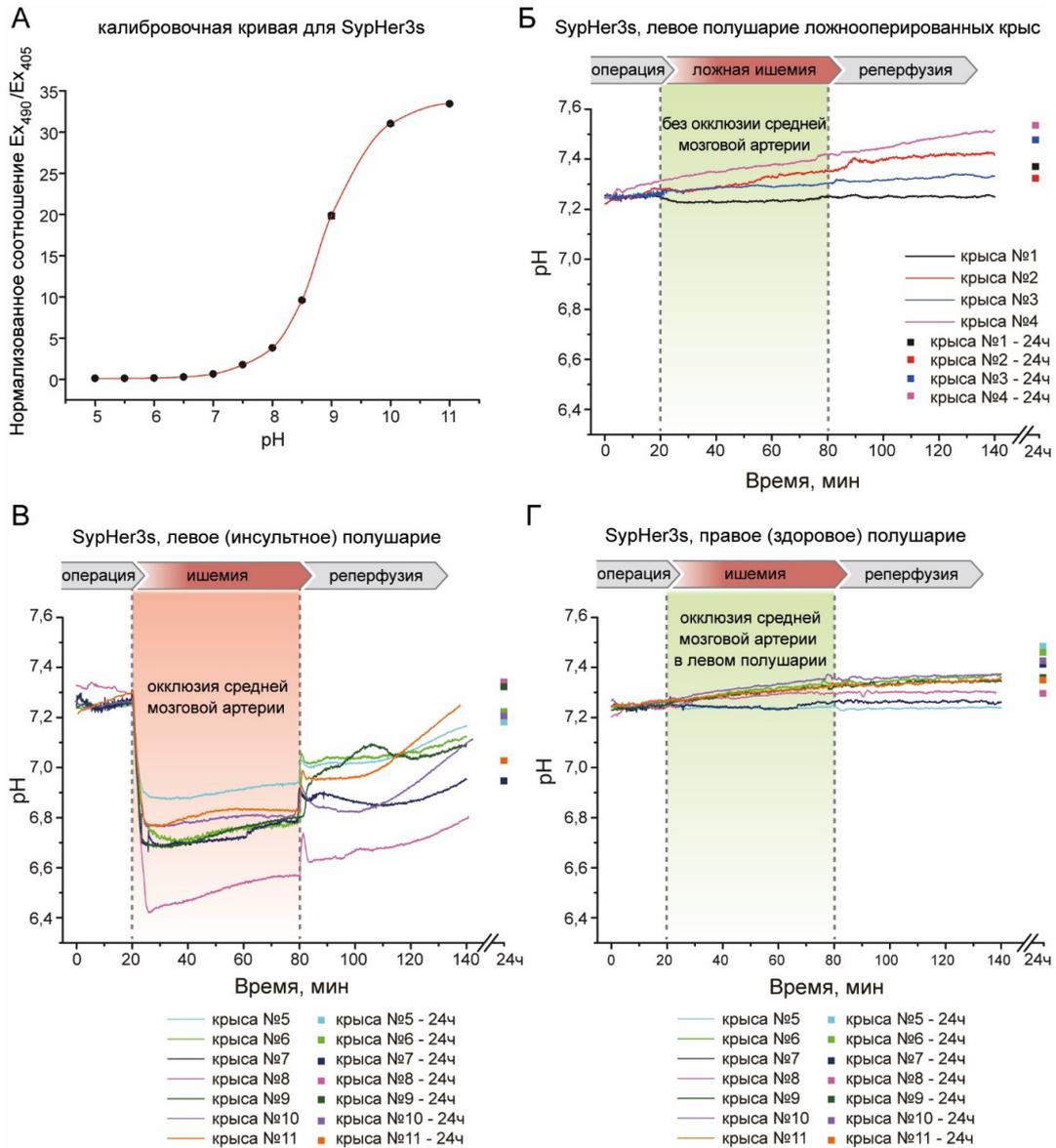


Рисунок 20. Динамика pH (по сигналу биосенсора SupHer3s) в тканях мозга крыс *in vivo* в острой фазе развития ишемического инсульта. (А) График зависимости сигнала SupHer3s (F_{490}/F_{405}) от значения pH , график получен на очищенном препарате белка SupHer3s. Для каждой точки выполнено минимум 3 независимых измерения, из-за высокой сходимости результатов на графике практически не видны планки погрешностей, обозначающих стандартное отклонение. (Б) *In vivo* динамика pH в нейронах хвостатого ядра мозга крыс в левом полушарии ложнооперированных животных, которым не проводилась окклюзия артерии. (В,Г) *In vivo* динамика pH в нейронах хвостатого ядра мозга крыс в левом полушарии с ишемическим повреждением (В) и правом здоровом (Г). На каждом графике (Б-Г) отдельными линиями представлена динамика pH в каждой индивидуальной крысе. Сигнал SupHer3s регистрировали непрерывно в течение всех хирургических манипуляций и острой фазы инсульта (60 мин. ишемии и 60 мин. реперфузии). Отдельные точки на графиках обозначают значения pH в тканях мозга этих же животных (отмечено по цветам) на следующие сутки после ишемии.

На протяжении всего периода ишемии рН остается пониженным. На следующие сутки у некоторых животных рН возвращался к норме, однако были выявлены и те, у которых рН в клетках так и оставался пониженным. Таким образом, ишемическое состояние тканей мозга сопровождается мощным и продолжительным внутриклеточным закислением.

3.2. Динамика H_2O_2 в культуре нейронов при гипоксии и в тканях мозга крыс при ишемическом инсульте

АФК отводят ведущую роль в механизмах повреждения клеток в условиях гипоксии/реоксигенации, при этом их динамику при патогенезе никогда не визуализировали напрямую. В культуре гиппокампальных нейронов мыши с помощью высокочувствительного биосенсора HyPer7 в условиях гипоксии/реоксигенации мы не обнаружили ожидаемого эффекта увеличенной продукции H_2O_2 , наоборот, зафиксировали снижение базового уровня, что особенно выражено в матриксе митохондрий (рис. 21).

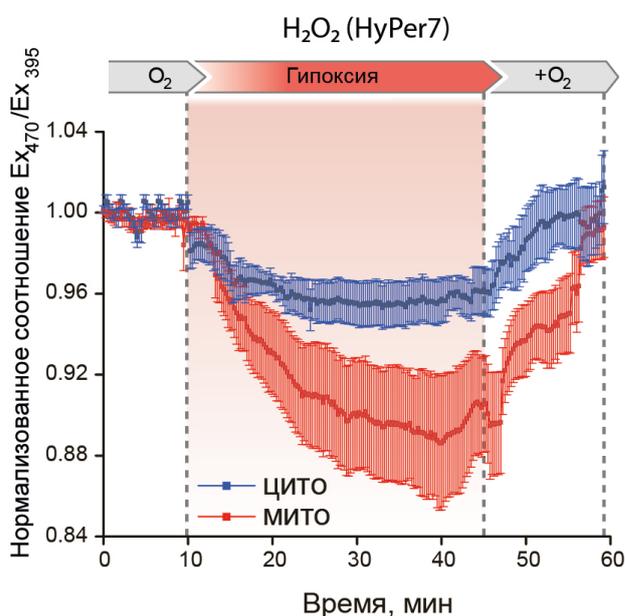


Рисунок 21. Динамика H_2O_2 в культуре гиппокампальных нейронов в условиях гипоксии/реоксигенации. Сигнал усреднен по 203 нейронам с митохондриальной локализацией биосенсора (13 экспериментов) и по 216 нейронам с локализацией в цитозоле (7 экспериментов). Увеличение сигнала HyPer7 соответствует увеличению уровня H_2O_2 . На всех графиках планки погрешностей обозначают стандартное отклонение среднего.

In vivo на модели ишемического инсульта головного мозга у крыс как во время ишемии, так и на ранней стадии реперфузии мы обнаружили небольшое повышение H_2O_2 в матриксе нейронов в центральной зоне инсульта (рис. 22B).

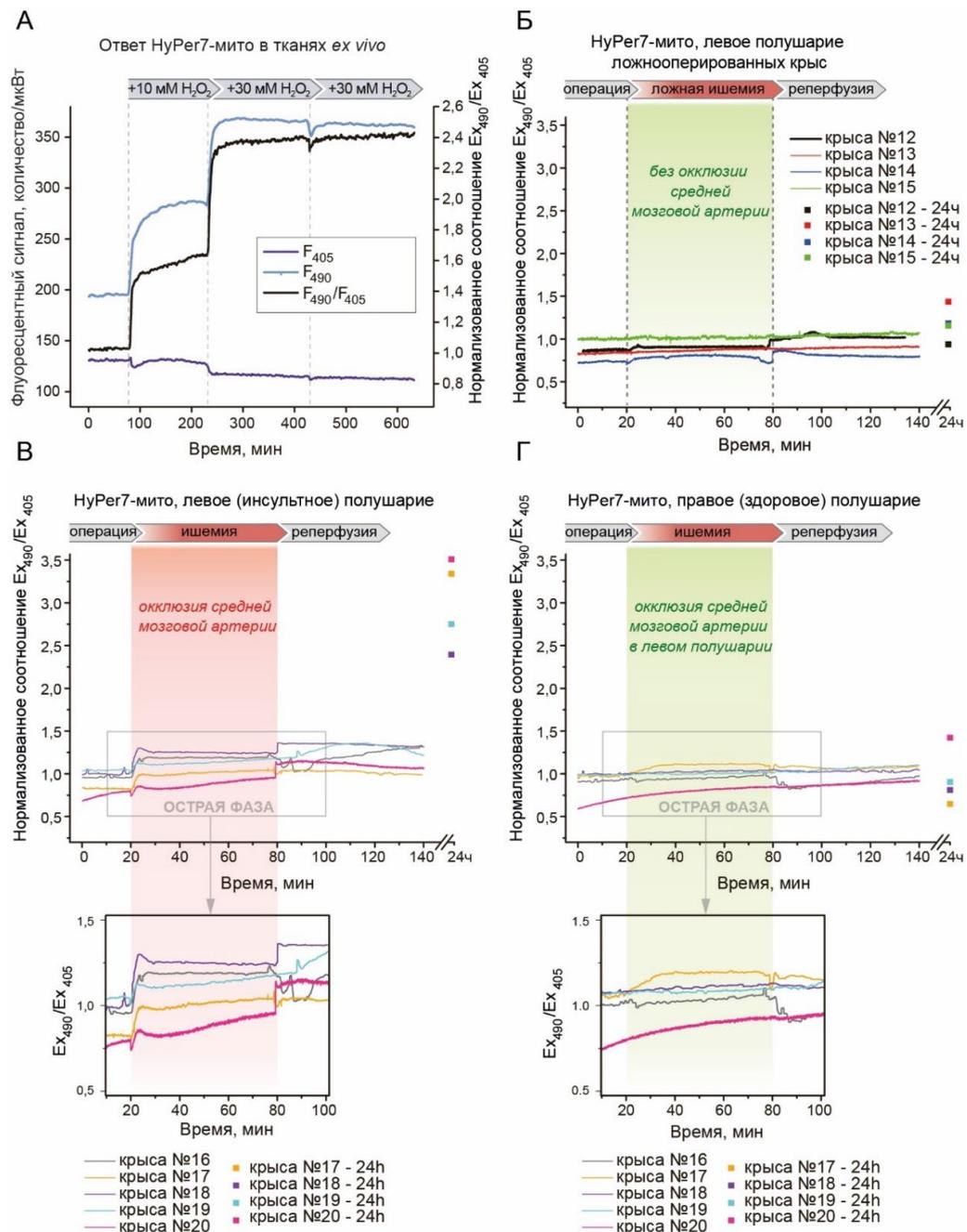


Рисунок 22. Динамика H₂O₂ (по сигналу биосенсора HyPer7) в тканях мозга крыс *in vivo* в острой фазе развития ишемического инсульта. (А) Ответ HyPer7 (по каждому из каналов в отдельности и в виде соотношения F_{490}/F_{405}) *ex vivo* в свежесыведенных тканях мозга крыс на добавки H₂O₂ в среду. (Б) *In vivo* динамика H₂O₂ в нейронах хвостатого ядра головного мозга в левом полушарии ложнооперированных крыс, которым не проводилась окклюзия левосторонней средней мозговой артерии. (В,Г) *In vivo* динамика H₂O₂ в нейронах хвостатого ядра головного мозга крыс в левом полушарии с ишемическим повреждением (В) и правом здоровом (Г). На каждом графике (Б-Г) отдельными линиями представлена динамика сигнала HyPer7 в каждой индивидуальной крысе. Сигнал HyPer7 регистрировали непрерывно в течение всех хирургических манипуляций и острой фазы инсульта (60 мин. ишемии и 60 мин. реперфузии). Отдельные точки на графиках обозначают значения сигнала HyPer7 в тканях этих же животных (отмечено по цветам) на следующие сутки после ишемии.

Однако гораздо более выраженное изменение сигнала HyPer7 в этой же области мы обнаружили на следующие сутки у всех животных в опытной группе. Сигнал увеличивался более чем в 2 раза, что по данным *ex vivo* (рис. 22А) соответствует практически максимальному окислению биосенсора. Подобных изменений мы не обнаружили в тканях контралатерального здорового полушария, а также в контрольной группе ложноперирированных животных (рис. 22Б,Г). Наши данные свидетельствуют о том, что H₂O₂ действительно образуется в тканях мозга крыс при ишемическом инсульте, однако основная генерация происходит не в острой фазе

Мы провели серию экспериментов, где сигнал HyPer7 в тканях мозга животных регистрировали через разные интервалы времени на более поздних стадиях патогенеза. Мы также сравнили отличается ли динамика H₂O₂ в нейронах от динамики в астроцитах, используя конструкции с промотором hSyn1 (нейрональный) и GFAP (астроцитарный). В среднем, выраженные изменения сигнала HyPer7 в тканях мозга животных после инсульта мы наблюдали, начиная с 12,5 часов с момента окклюзии артерии. Флуоресцентный сигнал в тканях всех животных постепенно увеличивался с течением времени. Примечательно, что уже с 5 часов заметна тенденция в разнице сигнала биосенсора HyPer7 между нейронами и астроцитами, по мере развития патологии эта разница становилась все более выраженной (рис. 23).

Таким образом, в клетках центральной зоны ишемического инсульта на модели крыс выраженная продукция H₂O₂ начинается ~ от полусуток и достигает максимального уровня лишь на 1-2 сутки с момента начала ишемии. Остается открытым вопрос о происхождении H₂O₂ в клетках на этой стадии патогенеза. Не обязательно, что H₂O₂ образуется эндогенно в рассматриваемых типах клеток. Например, в это же время в ишемизированных тканях мозга начинаются воспалительные реакции, вызванные активацией микроглии или инфильтрацией в поврежденную область нейтрофилов вследствие нарушения гематоэнцефалического барьера. Поэтому формирование высокого уровня H₂O₂ на поздних стадиях патогенеза может быть результатом работы клеток, выполняющих иммунные функции. Кроме того, термин «окислительный стресс» не приравнивается обязательно к усиленной продукции H₂O₂. Например, в острой

фазе ишемии может происходить перекисное окисление липидов. Образующийся $O_2^{\cdot-}$ в результате утечек электронов также не обязательно конвертируется в H_2O_2 , например, при активности индуцибельных *NO -синтаз может происходить образование $ONOO^-$. Эти редокс-события не могут быть обнаружены биосенсором HyPer7. Но именно в этом и заключается смысл применения подобных генетически кодируемых биосенсоров. Их использование позволяет напрямую выяснить роль конкретного соединения в рассматриваемом биологическом процессе *in vivo*.

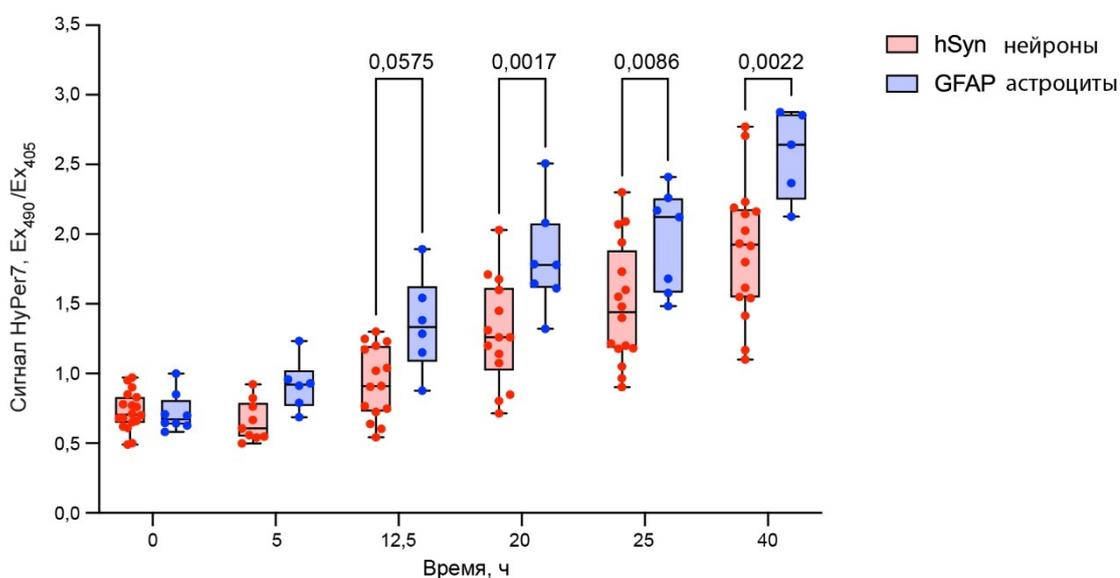


Рисунок 23. Динамика H_2O_2 (по сигналу биосенсора HyPer7) в тканях мозга крыс в нейронах (hSyn1 промотор) и астроцитах (GFAP промотор) *in vivo* при развитии ишемического инсульта. Проведен двухфакторный дисперсионный анализ (*two-way ANOVA*) с поправкой Бонферони. Сигнал биосенсора достоверно выше в астроцитах по сравнению с нейронами через 20, 25 и 40 часов с момента окклюзии артерии ($p < 0,05$). Группа с локализацией биосенсора в нейронах включает 14 животных, астроцитах – 8.

3.3. Гипергликемия усугубляет последствия инсульта не через генерацию H_2O_2

Мы задались вопросом, коррелирует ли тяжесть инсульта с продукцией H_2O_2 ? Сахарный диабет является одним из наиболее важных и распространенных факторов риска инсульта. Однако точные молекулярные механизмы, посредством которых гипергликемия усугубляет повреждения ткани, до сих пор не выявлены. Предполагают, что в основе может быть усиление окислительного стресса.

Для моделирования диабета у крыс мы применили распространенный в мировой практике подход стрептозотоцин-индуцируемой гибели β -клеток поджелудочной железы. Крысам SHR за неделю до моделирования инсульта мы разово инъектировали стрептозотоцин в дозе 65 мг/кг. Животные после введения стрептозотоцина демонстрировали стабильный гипергликемический статус (концентрация глюкозы в крови $31,74 \pm 2,2$ мМ, среднее \pm SD). Далее животным моделировали инсульт по стандартному протоколу окклюзии средней мозговой артерии, через 48 часов оценивали объемы повреждения головного мозга с помощью прокраски 2 мм срезов ткани красителем 2,3,5-трифенилтетразолием хлористым. Крысы с высоким гликемическим статусом действительно существенно отличались от животных контрольной группы гораздо бóльшим объемом повреждения (рис. 24). Средний объем повреждения мозга у животных с повышенным уровнем глюкозы составил $464,7 \pm 82,9$ мм³ (среднее \pm SD, n=14 крыс), тогда как для контрольной группы этот показатель составил $174,5 \pm 53,1$ мм³ (среднее \pm SD, n=12 крыс) (p<0,0001, непарный t-критерий).

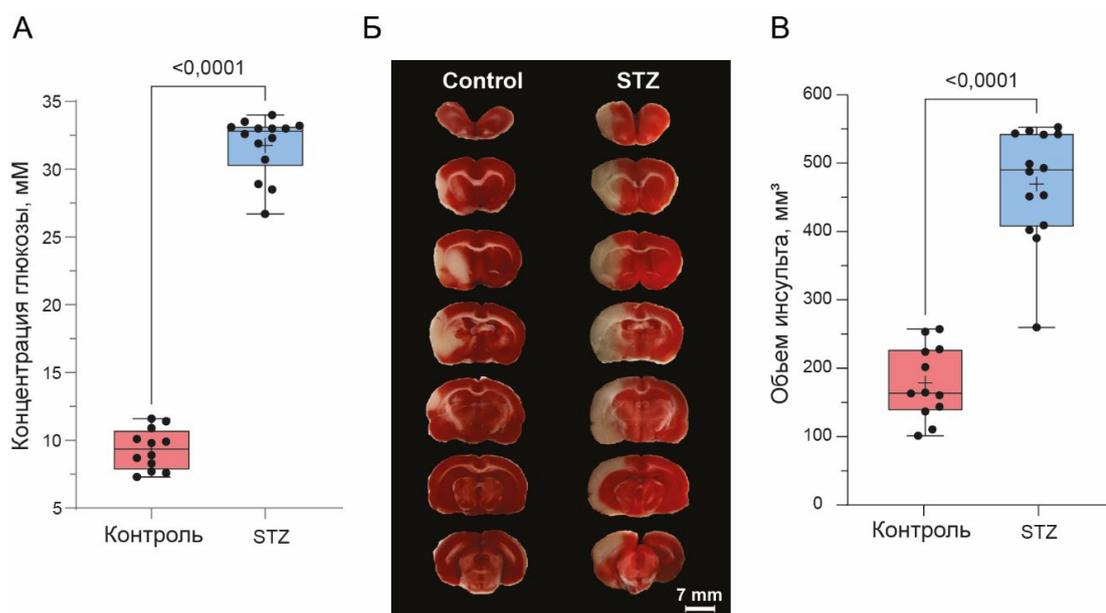


Рисунок 24. Эффект гипергликемии на объем ишемического повреждения головного мозга крыс. (А) Сравнение уровня глюкозы в крови у животных опытной группы (стрептозотоцин (STZ), 65 мг/кг) и контрольной (растворитель в том же объеме). (Б) Фотографии срезов мозга животных контрольной и опытной групп, окрашенных красителем 2,3,5-трифенилтетразолием хлористым через 48 часов с момента окклюзии средней мозговой артерии. Непокрашенные области соответствуют областям повреждения. (В) Объем ишемического инсульта у крыс контрольной и опытной групп. На диаграммах (А) и (Б) значок «+» соответствует среднему значению, линия – медиане, планки погрешностей – минимальным и максимальным значениям. Применен непарный t-критерий.

Кроме того, группы отличались показателем смертности. В опытной группе 36,8 % животных погибли при операции или на следующие сутки до анализа объема повреждения мозга, в то время как в контрольной группе ни одно из животных не было выведено из эксперимента. Несмотря на более выраженные повреждения, мы не обнаружили каких-либо отличий в динамике сигнала НуPer7 в митохондриях нейронов в острой фазе инсульта и на следующие сутки у животных опытной и контрольной групп (рис. 25).

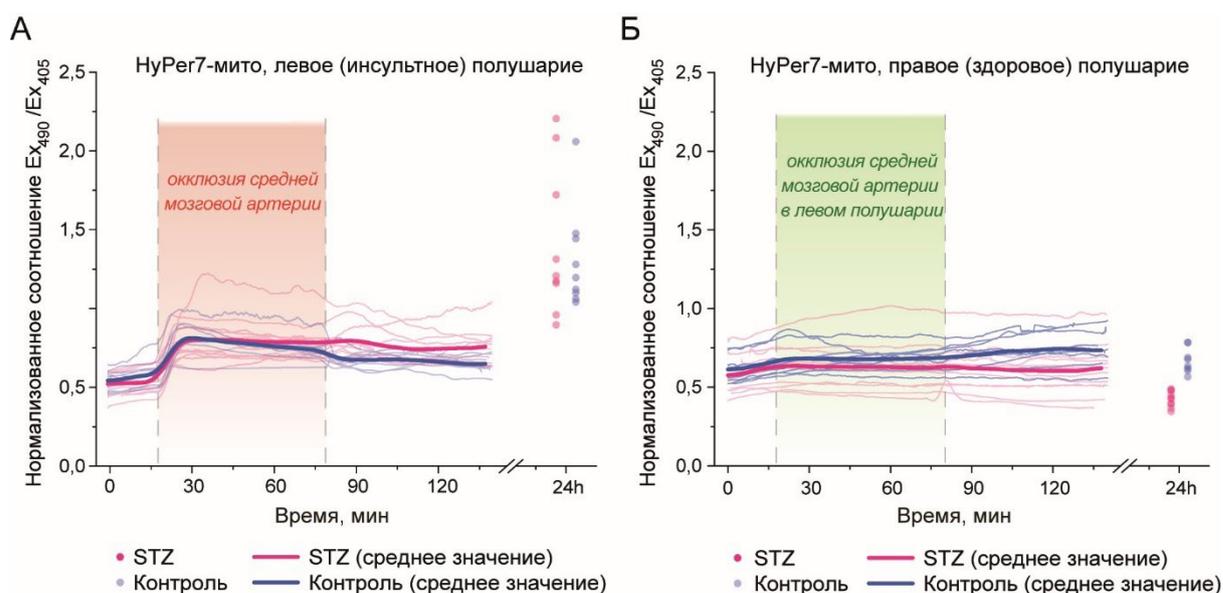


Рисунок 25. Динамика H_2O_2 (по сигналу биосенсора НуPer7) в тканях мозга крыс *in vivo* с нормальным и высоким уровнем глюкозы в крови в острой фазе развития ишемического инсульта. *In vivo* динамика H_2O_2 в нейронах хвостатого ядра головного мозга крыс в левом полушарии с ишемическим повреждением (А) и правом здоровом (Б). На графиках отдельными линиями представлена динамика сигнала НуPer7 в каждой индивидуальной крысе. Жирными линиями обозначена усредненная динамика сигнала в каждой группе. Синие линии представляют собой измерения у крыс с высоким гликемическим статусом, красные линии характеризуют животных из контрольной группы. Сигнал НуPer7 регистрировали непрерывно в течение всех хирургических манипуляций и острой фазы инсульта (60 мин. ишемии и 60 мин. реперфузии). Отдельные точки на графиках обозначают значения сигнала НуPer7 в тканях мозга животных на следующие сутки после ишемии.

На основании полученных результатов можно заключить, что гипергликемия действительно приводит к большему повреждению тканей головного мозга при ишемическом инсульте, однако механизм опосредован не через повышенную продукцию H_2O_2 в клетках.

3.4. Биосенсоры на основе *srYFP* в мультифотонном режиме возбуждения флуоресценции

Все большую популярность в *in vivo* исследованиях приобретают подходы мультифотонной микроскопии. Принцип основан на том, что хромофор возбуждается несколькими фотонами, суммарная энергия которых (это может быть два или три фотона) достаточна для перехода молекулы в возбужденное состояние и последующей ее релаксации. При таком подходе флуоресцентный сигнал по-прежнему регистрируется в том же видимом диапазоне спектра, а возбуждение смещается в ближнюю инфракрасную область. Мультифотонный спектр возбуждения флуоресценции молекулы трудно предсказать по однофотонному. Молекулы даже на основе одного и того же флуоресцентного ядра могут демонстрировать различия.

Цикл работ по тестированию в мультифотонном режиме возбуждения флуоресценции биосенсоров нового поколения был выполнен на базе лаборатории фотоники и нелинейной спектроскопии физического факультета МГУ. В качестве примера на **рисунке 26** представлены спектры возбуждения флуоресценции рН-биосенсора *SyrHer3s* в одно- и двухфотонном режиме.

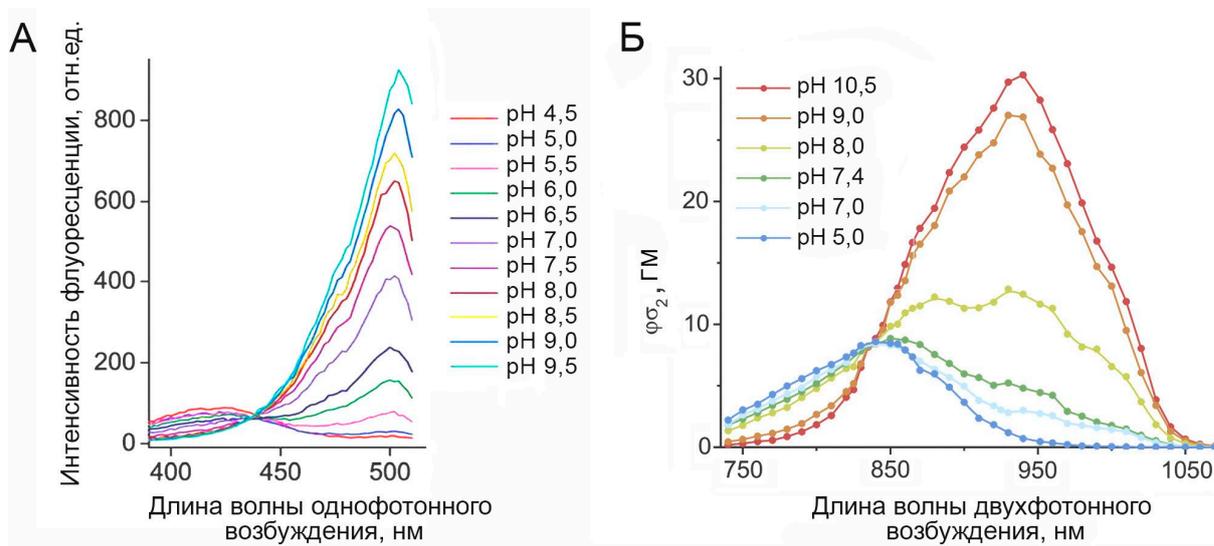


Рисунок 26. Спектры однофотонного и двухфотонного возбуждения флуоресценции биосенсора *SyrHer3s* при разных значения рН. Концентрация белка в пробе 20 нМ для однофотонного спектра и 500 нМ для двухфотонного.

В режиме двухфотонного возбуждения флуоресценции мы также охарактеризовали биосенсоры НуPer7 для визуализации динамики H_2O_2 и Нурocrates для визуализации продуктов гипогалогенного стресса. В качестве примера, на **рисунке 27** представлены изображения нейронов с экспрессией митохондриальной версии НуPer7 в тканях мышцы *in vivo* через краниальное окно в мультифотонном режиме регистрации сигнала.

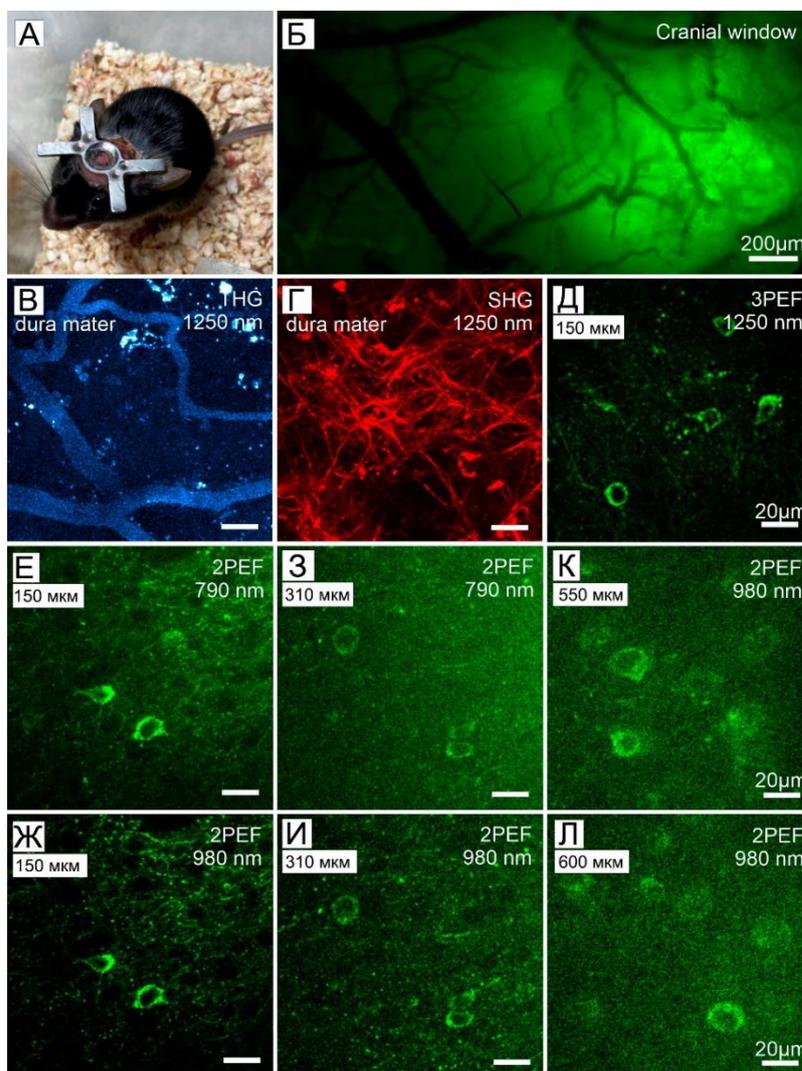


Рисунок 27. Мультифотонная *in vivo* микроскопия тканей мозга мыши с экспрессией в нейронах НуPer7-мито. (А) Фотография мыши с краниальным окном и адаптером для подсоединения к объективу микроскопа. (Б) Широкопольная флуоресцентная микроскопия поверхностного слоя мозга мыши через краниальное окно. Регистрируется сигнал НуPer7-мито, ген которого экспрессируется в нейронах. Линейка масштаба составляет 200 мкм. (В,Г) Микроскопия генерации третьей (В) и второй (Г) гармоник в тканях твердой мозговой оболочки на глубине 50 мкм от поверхности мозга. (Д-Л) Трехфотонная (Д) и двухфотонная (Е-Л) микроскопия нейронов мыши *in vivo* с экспрессией НуPer7-мито при длинах волн возбуждения 790 нм (Е,З) и 980 нм (Ж,И,К,Л) на глубине 150 мкм (Д,Е,Ж), 310 мкм (З,И), 550 мкм (К) и 600 мкм (Л) от поверхности мозга. Линейка масштаба 20 мкм.

Определение точных спектральных характеристик используемых флуоресцентных инструментов позволяет подбирать оптимальные параметры при работе. С практической точки зрения преимущество двухфотонной микроскопии заключается в возможности получать изображения объектов исследования в высоком пространственном разрешении, в том числе в тканях *in vivo*.

3.5. Редокс-параметры в кардиомиоцитах при гипоксии/реоксигенации

Клетки сердца тоже остро реагируют на ишемию. Как и в случае нервных тканей, роль основного повреждающего фактора при инфаркте миокарда приписывают окислительному стрессу. С помощью биосенсора HyPer7 и разработанной установки для моделирования условий гипоксии мы оценивали динамику H_2O_2 в неонатальных кардиомиоцитах крыс. Как и в культуре нейронов, в этих типах клеток мы наблюдали снижение флуоресцентного сигнала биосенсора, что свидетельствует о базовом снижении внутриклеточного H_2O_2 (рис. 28). Однако при тех же условиях динамика H_2O_2 в матриксе митохондрий зрелых кардиомиоцитов крыс кардинально отличается – мы наблюдали выраженный рост концентрации H_2O_2 (рис. 28).

С помощью метода Рамановской микроспектроскопии при сотрудничестве с Браже Надеждой Александровной (МГУ им. М.В. Ломоносова, ИБХ РАН) мы сравнили редокс-состояние цитохромов *c*- и *b*-типа у неонатальных и зрелых кардиомиоцитов в условиях гипоксии. Этот анализ позволяет оценить загрузку электрон-транспортной цепи, что коррелирует с продукцией $O_2^{\cdot -}$ на уровне комплекса III. Рассматриваемые типы клеток демонстрировали схожие наборы пиков в спектрах комбинационного рассеяния света (рис. 29А,Б). Добавление в среду дитионита натрия показало, что общее количество цитохром-содержащих комплексов электрон-транспортной цепи в зрелых кардиомиоцитах выше, чем в неонатальных. Кроме того, при нормальных условиях в зрелых клетках относительное количество восстановленных цитохромов *c*- и *b*-типа в 6–7 раз ниже, чем при гипоксии (рис. 29В,Г). В неонатальных клетках относительное количество восстановленных цитохромов практически не меняется после обработки дитионитом натрия (рис. 29В,Г).

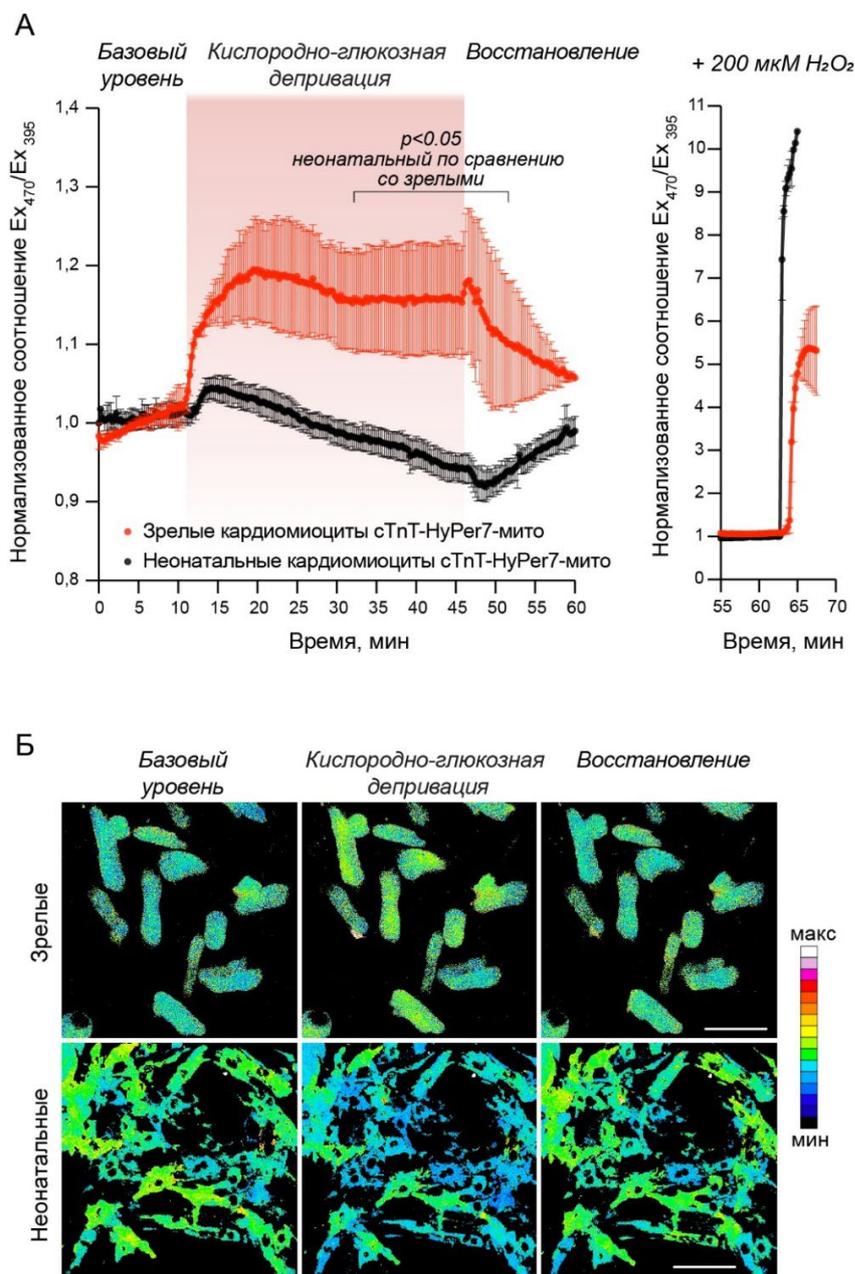


Рисунок 28. Динамика H_2O_2 в культуре неонатальных и зрелых кардиомиоцитов крыс в условиях гипоксии/реоксигенации. **(А)** Динамика H_2O_2 в матриксе митохондрий неонатальных (черная линия) и зрелых (красная линия) кардиомиоцитов крыс в культуре в условиях гипоксии, регистрация с помощью биосенсора НyPer7 (F_{470}/F_{395}). Сигнал биосенсора нормализован и усреднен по 40 клеткам ($N=2$) в случае зрелых кардиомиоцитов и по 86 клеткам ($N=3$) для неонатальных. Указаны средние значения, планки погрешностей обозначают стандартное отклонение среднего. $P < 0,05$ – сравнение сигнала НyPer7 между рассматриваемыми типами клеток, применен тест Сидака на множественные сравнения. **(Б)** Представлены фотографии культивируемых зрелых и неонатальных кардиомиоцитов, раскрашенных в псевдоцвета, которые соответствуют значениям сигнала биосенсора НyPer7. Приведены фотографии клеток в основном базовом состоянии, на 35-й минуте гипоксии, на 15-й минуте после нормализации параметров среды. Линейка масштаба 100 мкм.

Таким образом, в неонатальных клетках гипоксия не вызывает дополнительной загрузки электронами дыхательной цепи митохондрий, в результате чего вероятность утечки электронов меньше, образуется меньше $O_2^{\cdot-}$, который может конвертироваться в H_2O_2 . Мы также сравнивали конформацию гема цитохрома *c* во взрослых и неонатальных кардиомиоцитах. Пик с максимумом 570 см^{-1} соответствует колебаниям скрученной (от англ. ruffled) конформации гема в цитохроме *c*. Наблюдая за интенсивностью этого пика в спектре, можно оценивать редокс-состояние цитохрома *c*. Скрученная конформация является искаженной и отличается низкой способностью к передаче электронов. Оказалось, что неонатальные кардиомиоциты по сравнению со зрелыми демонстрируют более высокую вероятность образования такой скрученной конформации гема цитохрома *c* (рис. 29Д). Данные, полученные с помощью Рамановской микроспектрометрии, подтверждают глобальные редокс-отличия между неонатальными и зрелыми кардиомиоцитами. Подводя итог, неонатальные клетки характеризуются меньшим количеством цитохром-содержащих комплексов дыхательной цепи, при этом их электрон-транспортная цепь функционирует хуже по сравнению со зрелыми клетками.

Примечательно, что рН является более универсальным метаболическим ответом на гипоксию, поскольку изменения внутриклеточного рН для неонатальных и зрелых кардиомиоцитов незначительны в отличие от редокс-параметров этих клеток, что было показано нами в этой модели с применением рН-биосенсора SypHer3s.

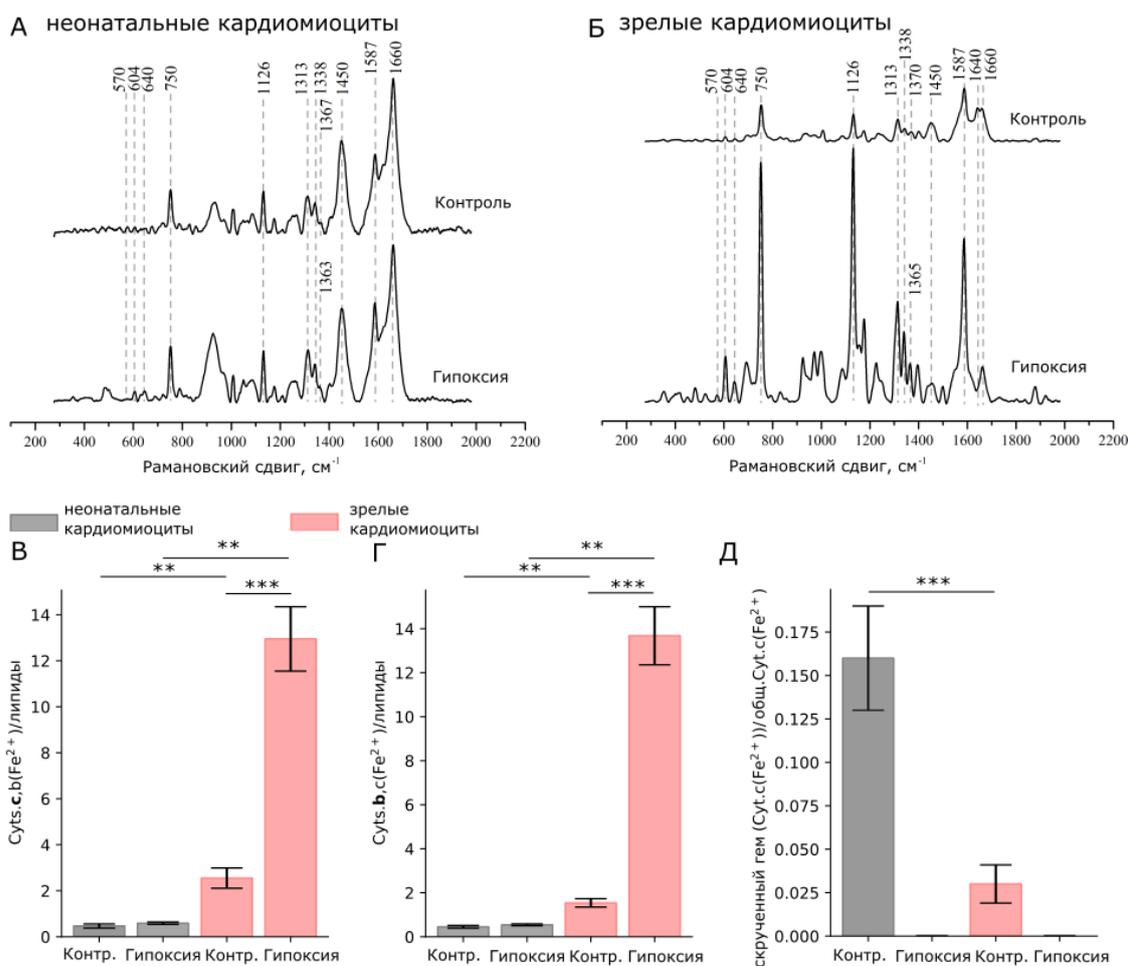


Рисунок 29. Сравнение редокс-состояния и относительного количества цитохромов в митохондриях зрелых и неонатальных кардиомиоцитов крыс в культуре. Спектры комбинационного рассеяния (Рамановские спектры) для (А) неонатальных и (Б) зрелых кардиомиоцитов в культуре при нормальных условиях (верхние спектры) и в условиях гипоксии (нижние спектры). Для лучшей презентации данные спектры соотнесены по вертикале и нормированы на интенсивность пика при 1450 см^{-1} (соответствует С-С липидам). Числами отмечены максимумы пиков. Представлены пики, соответствующие колебаниям связей в гемовой части восстановленных цитохромов с- и b-типа (максимумы $750, 1126, 1587\text{ см}^{-1}$), а также уникальные пики для восстановленных b (1338 см^{-1}) и с ($570, 604, 1313\text{ см}^{-1}$). Пик с максимумом 1450 см^{-1} соответствует колебаниям С-С связи в липидах, с максимумом 1660 см^{-1} – С-N связи в белках. Наблюдаются пики, соответствующие колебаниям гема b в оксимиоглобине ($1367\text{--}1370\text{ см}^{-1}$) и дезоксимиоглобине ($1363\text{--}1365\text{ см}^{-1}$). Пик при 640 см^{-1} соответствует колебанию связи С-S в цитохромах с-типа (связь между остатком Cys и гемом c), кластерам Fe-S и не окисленным Cys в белках. (В,Г) Относительное количество восстановленных цитохромов с и b-типов по отношению к количеству липидов в зрелых (красные столбцы) и неонатальных (серые столбцы) кардиомиоцитах при нормальных условиях и гипоксии. (Д) Относительное количество восстановленного цитохрома с со скрученной конформацией гема, характеризующегося низкой передачей электронов, которое нормировано на общее количество восстановленного цитохрома с.

*, **, *** – значения $P < 0,05, 0,01$ и $0,001$, применен тест Манна-Уитни.

3.6. Рыба *Danio rerio* в модели гипоксии/реоксигенации

Сравнение результатов, полученных на моделях гипоксии *in vitro* с культивируемыми нейронами и ишемии тканей мозга крыс *in vivo* наглядно показало, насколько существенно динамика редокс-параметров зависит от выбора системы исследования. Оптическая система с использованием оптоволокон, которую мы применяли для исследования патогенеза инсульта, не подходит для работы с сердцем. Альтернативой может служить выбор подходящего для реализации этой задачи модельного организма. Мы выбрали рыбу *Danio rerio*. Преимущество данного объекта в том, что ткани *D.rerio* на ранних стадиях развития прозрачны, что позволяет проводить микроскопию внутренних органов *in vivo*. Мы адаптировали нашу установку для моделирования условий гипоксии для работы с мальками *D.rerio*. Для оценки динамики H_2O_2 в тканях *D.rerio* при гипоксии мы использовали биосенсор HyPer7. Поскольку одно из преимуществ объекта *D.rerio* заключается в простоте манипуляции с ним на всех этапах исследования (доставка гена биосенсора с помощью мРНК, микроскопия), мы локализовали биосенсор по отдельности в матриксе митохондрий и цитозоле, чтобы напрямую сравнить *in vivo* динамику концентрации H_2O_2 в этих компартментах. В цитозоле клеток *D.rerio* мы обнаружили падение базового уровня H_2O_2 при недостатке O_2 . Однако в митохондриях мы наблюдали выраженное увеличение сигнала HyPer7, причем наиболее выраженный сигнал оказался характерен для нервной ткани (увеличение сигнала \sim на 25-30% в области головы и \sim на 10% в сердце при сравнении с исходными значениями до гипоксии в тех же тканях) (рис. 30). Таким образом, в тканях *D.rerio* именно при гипоксии образуется H_2O_2 , причем исключительно в матриксе митохондрий. H_2O_2 не распространяется при этом в цитозоль. Образовавшись в митохондриях, при последующей нормализации условий H_2O_2 в этом же компартменте и нейтрализуется. С помощью биосенсора SynHer3s мы установили, что в используемой модели гипоксии внутриклеточный pH тканей мальков *in vivo* снижается с базового нормального значения $\sim 7,2$ до pH 6,6 в тканях области головы, pH 6,7 – в сердце; pH 6,8 – скелетных мышцах. При последующей реоксигенации pH возвращался к исходному состоянию во всех регистрируемых областях.

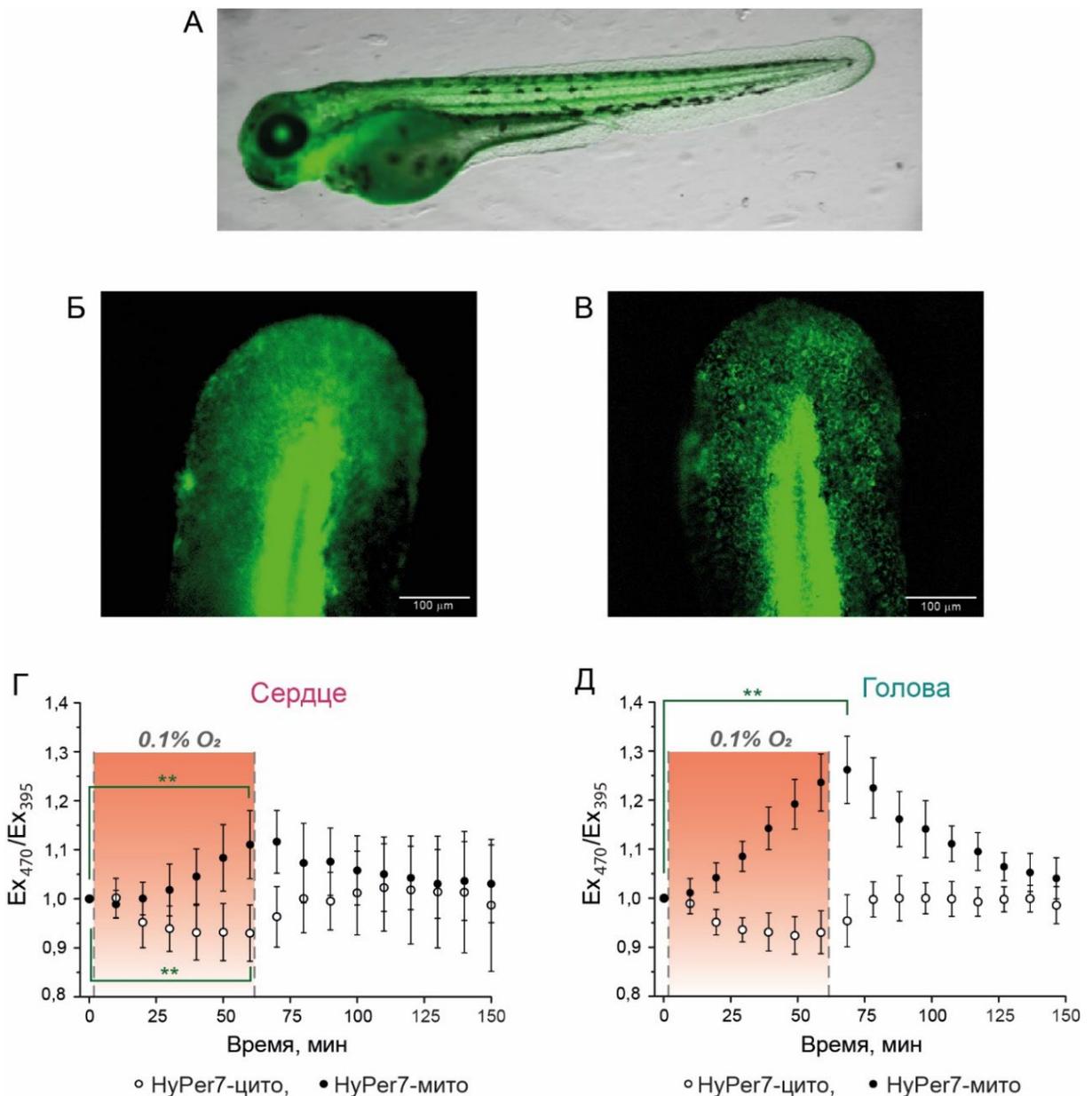


Рисунок 30. Динамика H_2O_2 (по сигналу биосенсора HuPer7) в тканях рыбы *D. rerio* в условиях гипоксии/реоксигенации. (А) Фотография двухдневного малька *D. rerio* с экспрессией гена HuPer7. (Б,В) Фотография хвостового плавника двухдневного малька с экспрессией (Б) цитозольной и (В) митохондриальной версии HuPer7 (Ex. 395 нм). (Г) Динамика сигнала HuPer7 и HuPer7-мито (Ex₄₇₀/Ex₃₉₅) в области сердца *D. rerio* в условиях гипоксии в течение 60 минут и последующей реоксигенации. Сигнал биосенсора нормализован и усреднен по 14 особям для HuPer7-мито и 13 особям для HuPer7. Планки погрешностей обозначают стандартное отклонение среднего. (Д) Динамика HuPer7 и HuPer7-мито (Ex₄₇₀/Ex₃₉₅) в аналогичных условиях в области головы *D. rerio*. Сигнал биосенсора нормализован и усреднен по 14 особям для HuPer7-мито и HuPer7. Планки погрешностей обозначают стандартное отклонение среднего.

** – $p < 0,05$; применен двухвыборочный *t*-тест для связанных выборок.

3.7. *In vivo* регистрация динамики гипогалогенных кислот и H_2O_2 при воспалении в тканях на модели рыбы *Danio rerio*

Для исследования процессов воспаления и последующей регенерации ткани широко популярна *in vivo* модель ранения хвостового плавника *D. rerio*. Для этого анестезированным малькам проводят ампутацию кончиков хвостовых плавников. Генетически кодируемые биосенсоры позволяют в этой модели регистрировать события в тканях уже с первых секунд повреждения, благодаря чему установлена последовательность некоторых редокс-событий в области раны (рис. 31).

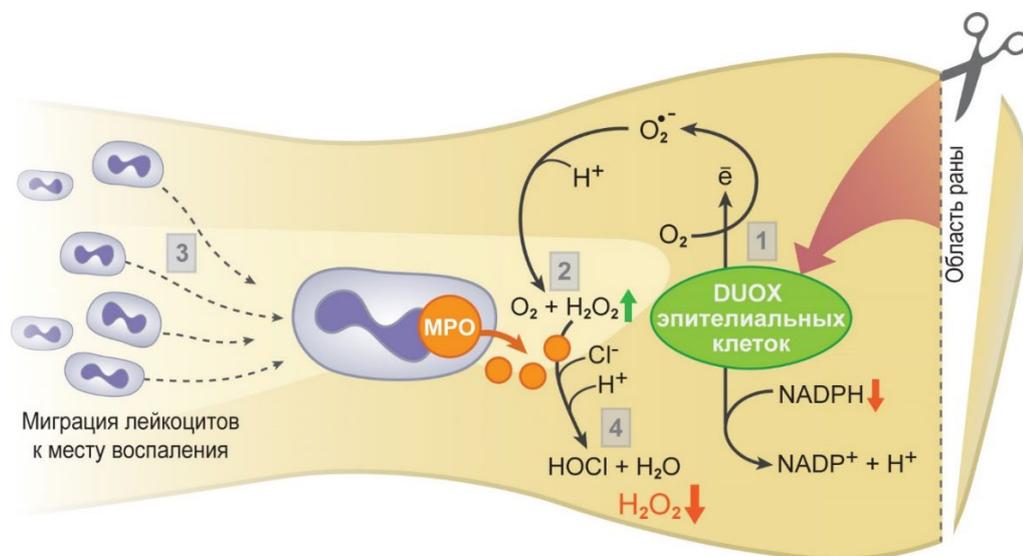


Рисунок 31. Схема редокс-событий в области воспаления в тканях хвостового плавника эмбриона *D. rerio*, вызванного механическим повреждением. 1 – ранение вызывает активацию DUOX в клетках эпителия. 2 – образуемый $\text{O}_2^{\bullet -}$ дисмутирует в H_2O_2 . 3 – в тканях формируется градиент H_2O_2 , привлекающий в область воспаления лейкоциты. 4 – лейкоциты участвуют в деградации H_2O_2 за счет миелопероксидазной (MPO) реакции.

Динамика гипогалогенного стресса прежде не была визуализирована напрямую *in vivo*. Чтобы показать пространственно-временную динамику продуктов NADPH-оксидазы и миелопероксидазы одновременно мы применили режим мультипараметрической съемки, скомбинировав в системе два разработанных нами биосенсора: Нурocrates для регистрации гипогалогенных кислот и НuPer-Red для регистрации H_2O_2 . Данную серию экспериментов мы провели в сотрудничестве с лабораторией Sophie Vrize (Франция). В модели ампутации хвостового плавника оба биосенсора, доставленные в ткани эмбрионов рыб с помощью мРНК, демонстрировали увеличение сигнала примерно через 15 минут с момента повреждения. Однако затем флуоресценция НuPer-Red

снижалась, отражая снижение H_2O_2 в системе, при этом сигнал Hypocrates изменялся в меньшей степени (рис. 32).

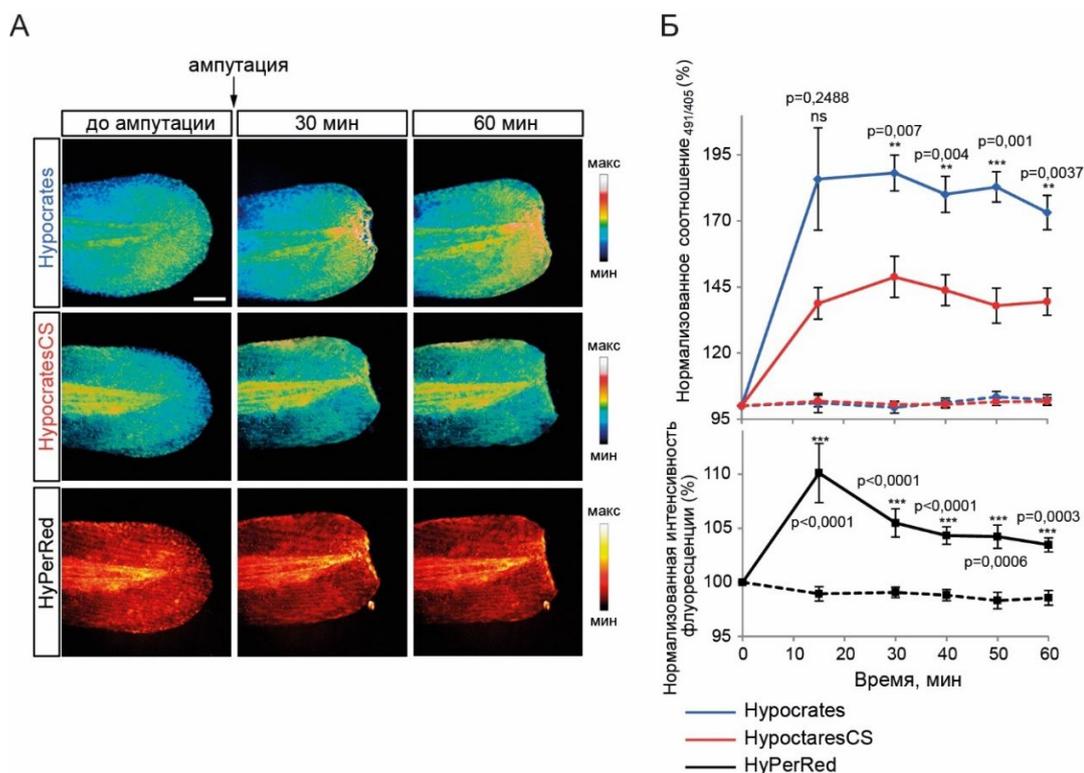


Рисунок 32. Динамика H_2O_2 и гипогалогенных кислот в очаге воспаления тканей *D. rerio*, вызванном механическим повреждением. (А) Флуоресцентное изображение хвостов *D. rerio*. Воспаление моделировали на 2-е сутки с момента оплодотворения. Псевдоцвета отражают значения сигналов биосенсоров. Линейка масштаба 100 мкм. (Б) Динамика Hypocrates (синие линии), HypocratesCS (красные линии) и HyPer-Red (черные линии) в тканях *D. rerio* при воспалении. Для каждого биосенсора значения сигнала нормализованы к исходным (до ампутации). Сплошными линиями представлена динамика биосенсоров в поврежденных тканях, пунктирными – в контрольных экспериментах без ампутации. Применен двухфакторный дисперсионный анализ и тест Тьюки, планки погрешностей обозначают стандартное отклонение среднего, $N = 4$ при $n \geq 3$ эмбрионов для Hypocrates и HypocratesCS, $N = 3$ при $n \geq 7$ эмбрионов для HyPer-Red. Для биосенсора Hypocrates статистическую значимость проверяли при сравнении со значениями HypocratesCS, для HyPer-Red – относительно значений в тканях контрольных неповрежденных эмбрионов. ** $P < 0,01$, * $P < 0,001$, ns – отсутствует статистическая значимость.**

HypocratesCS также демонстрировал увеличение сигнала, свидетельствуя о повышении pH в тканях, однако статистически показано, что сигнал контрольной версии изменялся в меньшей степени по сравнению Hypocrates. Таким образом, мы впервые визуализировали *in vivo* одновременно динамику концентрации H_2O_2 и продуктов гипогалогенного стресса в тканях *D. rerio* при развитии воспаления, вызванного механическим повреждением.

Выводы

1. Получен и охарактеризован генетически кодируемый биосенсор Grx1-roCherry на основе человеческого глутаредоксина 1 и модифицированного белка mCherry. Биосенсор представляет собой первую в мировой коллекции версию редокс-чувствительного красного флуоресцентного белка с канонической для данного семейства структурой. Grx1-roCherry позволяет осуществлять мультипараметрический подход исследований в комбинации со спектрально отличающимися редокс-биосенсорами, в том числе на уровне межкомпарментных редокс-взаимодействий в разных типах клеток.
2. Получен и охарактеризован первый генетически кодируемый биосенсор Нурocrates для регистрации (псевдо)гипогалогенных кислот и их производных на основе белка NemR из *E.coli*, в структуру которого интегрировали srYFP. На примере контрольной версии Нурocrates впервые расшифрована пространственная структура редокс-биосенсора на основе srYFP.
3. Биосенсоры SypHer3s (для регистрации pH), HyPer7 (H₂O₂), Нурocrates (гипогалогенные кислоты и их производные) охарактеризованы в режиме мультифотонного возбуждения флуоресценции.
4. Впервые визуализирована динамика одновременно H₂O₂ и гипогалогенного стресса в тканях *Danio rerio* при воспалении, вызванном механическим повреждением.
5. Впервые с помощью генетически кодируемого биосенсора HyPer7 и технологии оптоволоконного интерфейса визуализирована *in vivo* динамика H₂O₂ в матриксе митохондрий нейронов крыс в условиях развития ишемического инсульта головного мозга. Уровень H₂O₂ медленно увеличивается в ишемизированной ткани и достигает максимальных значений лишь на следующие сутки. Астроциты демонстрируют большее производство H₂O₂ по сравнению с нейронами, разница наблюдается не ранее, чем через 20 часов с момента окклюзии артерии. Таким образом, острая фаза инсульта вопреки распространенному мнению не сопровождается всплеском продукции H₂O₂.
6. На стрептозотоцин-индуцируемой модели диабета у крыс с последующим моделированием ишемического инсульта показано, что гипергликемия усугубляет последствия инсульта, но не через повышенную генерацию H₂O₂.

7. Неонатальные и зрелые кардиомиоциты крыс отличаются по своему редокс-статусу. При гипоксии в матриксе митохондрий неонатальных клеток происходит снижение базового уровня H_2O_2 , зрелые кардиомиоциты наоборот демонстрируют продукцию H_2O_2 . По данным Рамановской микроспектрометрии неонатальные кардиомиоциты содержат меньше митохондрий, их электрон-транспортная цепь менее эффективна по сравнению со зрелыми клетками.
8. При гипоксии в тканях рыб *Danio rerio* продукция H_2O_2 обнаружена исключительно в матриксе митохондрий клеток. Образующийся при гипоксии H_2O_2 в митохондриях не диффундирует в цитозоль и при реоксигенации нейтрализуется в том же компартменте.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

1. Chebotarev AS, Kelmanson IV, Ivanova AD, Khramova YV, Katrukha VA, Kotova DA, Raevskii RI, Moshchenko AA, Linovsky GN, Fedotov AB, Belousov VV, **Bilan DS***, Lanin AA*. (*corresponding authors). Multiphoton tools for hydrogen peroxide imaging in vivo with subcellular resolution. *Sensors and Actuators B: Chemical*. 2024; 410: 135646. doi.org/10.1016/j.snb.2024.135646.
2. Kostyuk AI, Rapota DD, Morozova KI, Fedotova AA, Jappy D, Semyanov AV, Belousov VV, Brazhe NA, **Bilan DS**. Modern optical approaches in redox biology: Genetically encoded sensors and Raman spectroscopy. *Free Radical Biology & Medicine*. 2024; 217:68-115. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2024.03.010.
3. Раевский Р.И., Катруха В.А., Храмова Ю.В., **Билан Д.С.** Биохимия редокс-активных соединений серы в клетках млекопитающих и подходы к их детекции. *Биоорганическая химия*. 2024. 4, принята в печать.
4. Khramova YV, Katrukha VA, Chebanenko VV, Kostyuk AI, Gorbunov NP, Panasenko OM, Sokolov AV, **Bilan DS**. Reactive halogen species: role in living systems and current research approaches. *Biochemistry (Moscow)*. 2024, 89: S90-S111. doi: 10.1134/S0006297924140062.
5. Ivanova AD, Kotova DA, Khramova YV, Morozova KI, Serebryanaya DV, Bochkova ZV, Sergeeva AD, Panova AS, Katrukha IA, Moshchenko AA, Oleinikov VA, Semyanov AV, Belousov VV, Katrukha AG, Brazhe N, **Bilan DS**. Redox differences between rat neonatal and adult cardiomyocytes under hypoxia. *Free Radical Biology & Medicine*. 2023; S0891-5849(23)01135-8. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2023.11.034.
6. Kotova DA, Ivanova AD, Pochechuev MS, Kelmanson IV, Khramova YV, Tiaglik A, Sudoplatov MA, Trifonova AP, Fedotova A, Morozova K, Katrukha VA, Sergeeva AD, Raevskii RI, Pestriakova MP, Solotnikov MA, Stepanov EA, Tsopina AS, Moshchenko AA, Shestopalova M, Zalygin A, Fedotov IV, Fedotov AB, Oleinikov V, Belousov VV, Semyanov A, Brazhe N, Zheltikov AM, **Bilan DS**. Hyperglycemia exacerbates ischemic stroke not through increased generation of hydrogen peroxide. *Free Radical Biology & Medicine*. 2023; 208: 153-164. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2023.08.004.
7. Pochechuev MS, **Bilan DS**, Fedotov IV, Kelmanson IV, Solotnikov MA, Stepanov EA, Kotova DA, Ivanova AD, Kostyuk AI, Raevskii RI, Lanin AA, Fedotov AB, Belousov VV, Zheltikov AM. Real-time fiber-optic recording of acute-ischemic-stroke signatures. *Journal of Biophotonics*. 2022; e202200050. doi: 10.1002/jbio.202200050.

8. Kostyuk AI, Tossounian MA, Panova AS, Thauvin M, Raevskii RI, Ezeriņa D, Wahni K, Van Molle I, Sergeeva AD, Vertommen D, Gorokhovatsky AY, Baranov MS, Vriza S, Messens J*, **Bilan DS***, Belousov VV*. (***corresponding authors**). Hypocrates is a genetically encoded fluorescent biosensor for (pseudo)hypohalous acids and their derivatives. *Nature Communications*. 2022; 13(1):171.doi:10.1038/s41467-021-27796-2.
9. Kelmanson IV, Shokhina AG, Kotova DA, Pochechuev MS, Ivanova AD, Kostyuk AI, Panova AS, Borodinova AA, Solotnikov MA, Stepanov EA, Raevskii RI, Moshchenko AA, Pak VV, Ermakova YG, van Belle GJC, Tarabykin V, Balaban PM, Fedotov IV, Fedotov AB, Conrad M, Bogeski I, Katschinski DM, Doepfner TR, Bähr M, Zheltikov AM, Belousov VV, **Bilan DS**. In vivo dynamics of acidosis and oxidative stress in the acute phase of an ischemic stroke in a rodent model. *Redox Biology*. 2021; 48: 102178. doi: 10.1016/j.redox.2021.102178.
10. Lanin AA, Chebotarev AS, Kelmanson IV, Pochechuev MS, Fetisova ES, **Bilan DS**, Shevchenko EK, Ivanov AA, Fedotov AB, Belousov VV, Zheltikov AM. Single-beam multimodal nonlinear-optical imaging of structurally complex events in cell-cycle dynamics. *Journal of Physics: Photonics*. 2021; 3. doi.org/10.1088/2515-7647/ac159a.
11. Chebotarev AS, Lanin AA, Raevskii RI, Kostyuk AI, Smolyarova DD, **Bilan DS**, Savitskii IV, Fedotov AB, Belousov VV, Zheltikov AM. Single-beam dual-color alternate-pathway two-photon spectroscopy: Toward an optical toolbox for redox biology. *Journal of Raman Spectroscopy*. 2021; 52. doi: 10.1002/jrs.6183.
12. Pochechuev MS, Lanin AA, Kelmanson IV, Chebotarev AS, Fetisova ES, **Bilan DS**, Shevchenko EK, Ivanov AA, Fedotov AB, Belousov VV, Zheltikov AM. Multimodal nonlinear-optical imaging of nucleoli. *Optics Letters*. 2021; 46(15): 3608-3611. doi: 10.1364/OL.416300.
13. Smolyarova DD, Podgorny OV, **Bilan DS**, Belousov VV. A guide to genetically encoded tools for the study of H₂O₂. *FEBS Journal*. 2022; 289: 5382-5395. doi: 10.1111/febs.16088.
14. Potekhina ES, Bass DY, Kelmanson IV, Fetisova ES, Ivanenko AV, Belousov VV, **Bilan DS**. Drug Screening with Genetically Encoded Fluorescent Sensors: Today and Tomorrow. *International Journal of Molecular Sciences*. 2020; 22(1): 148. doi: 10.3390/ijms22010148.
15. Chebotarev AS, Pochechuev MS, Lanin AA, Kelmanson IV, Kotova DA, Fetisova ES, Panova AS, **Bilan DS**, Fedotov AB, Belousov VV, Zheltikov AM. Enhanced-contrast two-photon optogenetic pH sensing and pH-resolved brain imaging. *Journal of Biophotonics*. 2021; 14: e202000301. doi: 10.1002/jbio.202000301.
16. Kostyuk AI, Panova AS, Kokova AD, Kotova DA, Maltsev DI, Podgorny OV, Belousov VV, **Bilan DS**. In Vivo Imaging with Genetically Encoded Redox Biosensors. *International Journal of Molecular Sciences*. 2020; 21(21): 8164. doi: 10.3390/ijms21218164.
17. Lanin AA, Chebotarev AS, Pochechuev MS, Kelmanson IV, Kotova DA, **Bilan DS**, Ivanov AA, Panova AS, Tarabykin VS, Fedotov AB, Belousov VV, Zheltikov A.M. Single-beam optogenetic multimodal $\chi(3)/\chi(5)$ nonlinear microscopy and brain imaging. *Journal of Raman Spectroscopy*. 2020; 51. doi: 10.1002/jrs.5933.
18. Kostyuk AI, Kokova AD, Podgorny OV, Kelmanson IV, Fetisova ES, Belousov VV, **Bilan DS**. Genetically Encoded Tools for Research of Cell Signaling and Metabolism under Brain Hypoxia. *Antioxidants (Basel)*. 2020; 9 (6): 516. doi: 10.3390/antiox9060516.
19. Pak VV, Ezeriņa D, Lyublinskaya OG, Pedre B, Tyurin-Kuzmin PA, Mishina NM, Thauvin M, Young D, Wahni K, Martínez Gache SA, Demidovich AD, Ermakova YG, Maslova YD, Shokhina AG, Eroglu E, **Bilan DS**, Bogeski I, Michel T, Vriza S, Messens J, Belousov VV. Ultrasensitive Genetically Encoded Indicator for Hydrogen Peroxide

- Identifies Roles for the Oxidant in Cell Migration and Mitochondrial Function. *Cell Metabolism*. 2020; 31 (3): 642-653. doi: 10.1016/j.cmet.2020.02.003.
20. Lanin AA, Pochechuev MS, Chebotarev AS, Kelmanson IV, **Bilan DS**, Kotova DA, Tarabykin VS, Ivanov AA, Fedotov AB, Belousov VV, Zheltikov AM. Cell-specific Three-Photon-Fluorescence Brain Imaging: Neurons, Astrocytes, and Gliovascular Interfaces. *Optics Letters*. 2020; 45 (4): 836-839. doi: 10.1364/OL.45.000836.
 21. Lanin AA, Chebotarev AS, Pochechuev MS, Kelmanson IV, Kotova DA, **Bilan DS**, Ermakova YG, Fedotov AB, Ivanov AA, Belousov VV, Zheltikov AM. Two- and three-photon absorption cross-section characterization for high-brightness, cell-specific multiphoton fluorescence brain imaging. *Journal of Biophotonics*. 2020; 13(3): e201900243. doi: 10.1002/jbio.201900243.
 22. Kostyuk AI, Demidovich AD, Kotova DA, Belousov VV, **Bilan DS**. Circularly permuted fluorescent protein-based indicators: history, principles, and classification. *International Journal of Molecular Sciences*. 2019; 20(17), 4200. doi: 10.3390/ijms20174200.
 23. Subach OM, Kunitsyna TA, Mineyeva OA, Lazutkin AA, Bezryadnov DV, Barykina NV, Piatkevich KD, Ermakova YG, **Bilan DS**, Belousov VV, Anokhin KV, Enikolopov GN, Subach FV. Slowly reducible genetically encoded green fluorescent indicator for in vivo and ex vivo visualization of hydrogen peroxide. *International Journal of Molecular Sciences*. 2019; 20(13), 3138. doi: 10.3390/ijms20133138.
 24. Pochechuev MS, Lanin AA, Kelmanson IV, **Bilan DS**, Kotova DA, Chebotarev AS, Tarabykin V, Fedotov AB, Belousov VV, Zheltikov AM. Stain-free subcellular-resolution astrocyte imaging using third-harmonic generation. *Optics Letters*. 2019; 44(12): 3166-3169. doi: 10.1364/OL.44.003166.
 25. А. Г. Шохина, В. В. Белоусов, **Д. С. Билан**. Генетически кодируемый биосенсор roKate для регистрации редокс-состояния пула глутатиона. *Вестник РГМУ*. 2019; 1: 94-101. doi: 10.24075/vrgmu.2019.013.
 26. Mishina NM, Bogdanova YA, Ermakova YG, Panova AS, Kotova DA, **Bilan DS**, Steinhorn B, Arnér ESJ, Michel T, Belousov VV. Which antioxidant system shapes intracellular H₂O₂ gradients? *Antioxidants & Redox Signaling*. 2019; 31(9): 664-670. doi: 10.1089/ars.2018.7697.
 27. А.И. Костюк, Д.А. Котова, А.Д. Демидович, А.С. Панова, И.В. Кельмансон, В.В. Белоусов, **Д.С. Билан**. Изменение ключевых параметров метаболизма липидов в тканях мозга крыс при перманентной ишемии. *Вестник РГМУ*. 2019; 1: 50-57. doi: 10.24075/vrgmu.2019.008.
 28. Chugunova A, Loseva E, Mazin P, Mitina A, Navalayeu T, **Bilan D**, Vishnyakova P, Marey M, Golovina A, Serebryakova M, Pletnev P, Rubtsova M, Mair W, Vanyushkina A, Khaitovich P, Belousov V, Vysokikh M, Sergiev P, Dontsova O. *LINC00116* codes for a mitochondrial peptide linking respiration and lipid metabolism. *Proceedings of the National Academy of Sciences (PNAS)*. 2019; 116(11): 4940-4945. doi: 10.1073/pnas.1809105116.
 29. Shokhina AG, Kostyuk AI, Ermakova YG, Panova AS, Staroverov DB, Egorov ES, Baranov MS, van Belle GJ, Katschinski DM, Belousov VV, **Bilan DS**. Red fluorescent redox-sensitive biosensor Grx1-roCherry. *Redox Biology*. 2019; 21: 101071. doi: 10.1016/j.redox.2018.101071.
 30. Kostyuk AI, Panova AS, **Bilan DS**, Belousov VV. Redox biosensors in a context of multiparameter imaging. *Free Radical Biology & Medicine*. 2018; 128: 23-39. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2018.04.004.
 31. **Bilan DS**, Belousov V.V. In vivo imaging of hydrogen peroxide with HyPer probes. *Antioxidants & Redox Signaling*. 2018; 29(6): 569-584. doi: 10.1089/ars.2018.7540.
 32. Ermakova YG, Pak VV, Bogdanova YA, Kotlobay AA, Yampolsky IV, Shokhina AG, Panova AS, Marygin RA, Staroverov DB, **Bilan DS**, Sies H, Belousov VV. SypHer3s: a genetically encoded fluorescent ratiometric probe with enhanced brightness and an

- improved dynamic range. *Chemical Communications*. 2018; 54: 2898-2901. doi: 10.1039/c7cc08740c.
33. **Д.С. Билан**, А.Г. Шохина, А.С. Панова, В.В. Белоусов. Регистрация динамики соотношения НАД⁺/НАДН в тканях эмбрионов рыб *Danio rerio* с помощью генетически кодируемого биосенсора. *Вестник РГМУ*. 2018; 1: 74-79. doi: 10.24075/vrgmu.2018.005.
 34. Chen H, Xu H, Potash S, Starkov A, Belousov VV, **Bilan DS**, Denton TT, Gibson GE. Mild metabolic perturbations alter succinylation of mitochondrial proteins. *Journal of Neuroscience Research*. 2017; 95: 2244-2252. doi: 10.1002/jnr.24103.
 35. **Д.С. Билан**, И.В. Кельмансон, В.В. Белоусов. Влияние типа анестезии и условий прокрашивания тканей мозга красителем 2,3,5-трифенилтетразолием хлористым (ТТХ) на оценку ишемического повреждения мозга крыс на ранних стадиях патогенеза. *Вестник РГМУ*. 2017; 6: 67-74. doi: 10.24075/vrgmu.2017-06-11.
 36. Ermakova YG, Lanin AA, Fedotov IV, Roshchin M, Kelmanson IV, Kulik D, Bogdanova YA, Shokhina AG, **Bilan DS**, Staroverov DB, Balaban PM, Fedotov AB, Sidorov-Biryukov DA, Nikitin ES, Zheltikov AM, Belousov VV. Thermogenetic neurostimulation with single-cell resolution. *Nature Communications*. 2017; 8: 15362. doi: 10.1038/ncomms15362.
 37. **Bilan DS**, Belousov VV. New tools for redox biology: From imaging to manipulation. *Free Radical Biology & Medicine*. 2017; 109: 167-188. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2016.12.004.
 38. **Bilan DS**, Belousov VV. Genetically encoded probes for NAD⁺/NADH monitoring. *Free Radical Biology & Medicine*. 2016; 100: 32-42. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2016.06.018.
 39. **Bilan DS**, Belousov VV. HyPer family probes: state of the art. *Antioxidants & Redox Signaling*. 2016; 24(13): 731-751. doi: 10.1089/ars.2015.6586.
 40. **Билан Д.С.**, Шохина А.Г., Лукьянов С.А., Белоусов В.В. Основные редокс-пары клетки. *Биоорганическая химия*. 2015; 41(4): 385-402. doi: 10.7868/S0132342315040041.
 41. **Билан Д.С.**, Лукьянов С.А., Белоусов В.В. Генетически кодируемые флуоресцентные сенсоры окислительно-восстановительных процессов. *Биоорганическая химия*. 2015; 41(3): 259-274. doi: 10.7868/S0132342315020037.
 42. Ermakova YG, **Bilan DS**, Matlashov ME, Mishina NM, Markvicheva KN, Subach OM, Subach FV, Bogeski I, Hoth M, Enikolopov G, Belousov VV. Red fluorescent genetically encoded indicator for intracellular hydrogen peroxide. *Nature Communications*. 2014; 5:5222. doi: 10.1038/ncomms6222.