

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Государственный научный центр Российской Федерации
Институт биорганической химии
им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова
Российской академии наук
(ГНЦ ИБХ РАН)

На правах рукописи

Билан Дмитрий Сергеевич

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

1.5.3. – Молекулярная биология

Диссертация на соискание ученой степени доктора биологических наук

Научный консультант:
Д.б.н., член-корр. РАН, проф. РАН
Белоусов Всеволод Вадимович

Москва, 2024

ОГЛАВЛЕНИЕ

Список сокращений.....	7
ВВЕДЕНИЕ.....	11
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	31
1.1. Редокс-регуляция живых систем.....	31
1.1.1. Краткая история редокс-биологии, общие принципы.....	31
1.1.2. Активные формы кислорода (АФК).....	39
1.1.3. Активные формы галогенов (АФГ).....	61
1.1.4. Активные формы азота (АФА).....	68
1.1.5. Активные формы серы (АФС).....	73
1.2. Флуоресцентные генетически кодируемые биосенсоры.....	85
1.2.1. Определение термина биосенсор.....	85
1.2.2. Флуоресцентные белки и биосенсоры на их основе.....	88
1.2.2.1 Флуоресцентные белки – биосенсоры активности промоторов.....	94
1.2.2.2 Флуоресцентные белки и их модифицированные версии, чувствительные к определенным параметрам.....	96
1.2.2.3 Биосенсоры, состоящие из сенсорного домена и флуоресцентного белка.....	98
1.2.2.4 Биосенсоры на основе двух флуоресцентных белков.....	101
1.2.3. Редокс-биосенсоры на основе флуоресцентных белков.....	105
1.2.3.1 Биосенсоры для регистрации O_2	105
1.2.3.2 <i>srYFP</i> – сенсор для регистрации $O_2^{\bullet-}$?.....	106
1.2.3.3 Биосенсоры для регистрации H_2O_2	108
1.2.3.4 Биосенсоры для регистрации органических гидропероксидов $ROOH$	113
1.2.3.5 Биосенсоры для регистрации $\cdot NO$	115
1.2.3.6 Биосенсоры для регистрации $ONOO^-$	117
1.2.3.7 Биосенсоры для регистрации гипогалогенных кислот.....	118
1.2.3.8 Биосенсоры для регистрации метионинсульфоксида.....	118
1.2.3.9 Биосенсоры для регистрации H_2S	120
1.2.3.10 Биосенсоры для регистрации редокс-статуса низкомолекулярных тиол-содержащих соединений.....	121
1.2.3.11 Биосенсоры для регистрации полисульфидов.....	127
1.2.3.12 Биосенсоры для регистрации редокс-статуса <i>Trx</i>	128

1.2.3.13 Биосенсоры для регистрации <i>NAD(H)</i>	130
1.2.3.14 Биосенсоры для регистрации <i>NADP(H)</i>	134
1.2.3.15 Мировая коллекция редокс-биосенсоров. Заключение.....	138
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.....	149
2.1. Общие методы в работе с генетически кодируемыми биосенсорами.....	149
2.1.1. Манипуляции с генетическими конструкциями.....	149
2.1.1.1. Амплификация ДНК.....	149
2.1.1.2. ПЦР скрининг.....	150
2.1.1.3. Электрофорез ДНК фрагментов в агарозном геле.....	150
2.1.1.4. Рестрикция ДНК.....	150
2.1.1.5. Лигирование ДНК.....	150
2.1.1.6. Определение концентрации ДНК.....	150
2.1.1.7. Трансформация бактериальных клеток.....	151
2.1.1.8. Культивирование бактериальных клеток.....	151
2.1.1.9. Выделение и анализ плазмидной ДНК.....	151
2.1.2. Скрининг бактериальных клонов по флуоресцентному сигналу.....	152
2.1.3. Получение белкового препарата биосенсора.....	152
2.1.4. Определение спектральных характеристик биосенсора.....	154
2.1.5. Определение зависимости сигнала биосенсора от pH.....	155
2.1.6. Определение чувствительности биосенсора.....	156
2.1.7. Определение селективности биосенсора.....	156
2.1.8. Используемые в работе вирусы.....	157
2.1.9. Используемые в работе клеточные культуры эукариот.....	158
2.1.9.1. <i>HeLa Kyoto (EMBL), HEK293 (ATCC)</i>	158
2.1.9.2. Смешанная нейрональная культура, выделенная из мозга мышинных эмбрионов.....	158
2.1.9.3. Культура неонатальных кардиомиоцитов крысы.....	159
2.1.9.4. Культура зрелых кардиомиоцитов крысы.....	160
2.1.9.5. Культура человеческих полиморфноядерных лейкоцитов.....	160
2.1.10. Используемые в работе животные.....	161
2.1.10.1. Рыбы <i>Danio rerio</i>	161
2.1.10.2. Мыши <i>C57Bl/6</i>	162
2.1.10.3. Крысы <i>SHR</i>	162

2.2. Разработка красной версии редокс-чувствительного флуоресцентного белка roRFP.....	162
2.2.1. Получение молекулярно-генетических конструкций roRFP.....	162
2.2.2. Определение редокс-потенциала флуоресцентных редокс-чувствительных белков.....	163
2.2.3. Микроскопия Grx1-roCherry в клеточных культурах.....	164
2.2.4. Проточная цитометрия.....	164
2.3. Разработка биосенсора для регистрации гипогалогенных кислот.....	165
2.3.1. Получение молекулярно-генетических конструкций версий Hupocrates.....	165
2.3.2. Определение кинетических свойств NemR ^{C106} и Hupocrates.....	166
2.3.3. Определение пространственной структуры Hupocrates.....	167
2.3.4. Измерение активности миелопероксидазы с помощью Hupocrates.....	167
2.3.5. Микроскопия Hupocrates в клеточных культурах.....	169
2.4. Моделирование условий гипоксии/реоксигенации в культуре клеток и тканях рыб <i>Danio rerio</i>.....	170
2.4.1. Особенности работы с гиппокампальной нейрональной культурой, полученной из эмбрионов мыши, в модели гипоксии.....	171
2.4.2. Особенности работы с культурой кардиомиоцитов, полученной из эмбрионов или взрослых крыс, в модели гипоксии.....	172
2.4.3. Рамановская микроспектрометрия для определения редокс-статуса митохондрий зрелых и неонатальных кардиомиоцитов.....	172
2.4.4. Особенности работы с эмбрионами рыб <i>Danio rerio</i> в модели гипоксии.....	173
2.4.5. Определение внутриклеточного pH в тканях рыб <i>Danio rerio</i>	173
2.5. Исследование динамики биохимических параметров в клетках головного мозга крыс <i>in vivo</i> при ишемическом инсульте с помощью биосенсоров и оптоволоконного интерфейса.....	174
2.5.1. Инъекция вирусных частиц в ткани мозга крыс и имплантация оптических волокон.....	174
2.5.2. Модель ишемического инсульта мозга у крыс путем окклюзии средней мозговой артерии.....	175
2.5.3. Модель стрептозотоцин-индуцируемого сахарного диабета у крыс.....	177
2.5.4. Определение pH в клетках мозга крыс <i>in vivo</i>	177
2.5.5. Проверка функционирования биосенсора HupPer7 в тканях мозга <i>ex vivo</i>	178

2.6. Исследование динамики редокс-параметров в тканях <i>Danio rerio in vivo</i> в условиях воспаления.....	178
2.7. Тестирование биосенсоров в мультифотонном режиме возбуждения флуоресценции.....	179
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ.....	181
3.1. Новые редокс-биосенсоры.....	181
3.1.1. Редокс-чувствительные белки с красной эмиссией флуоресценции.....	181
3.1.1.1. Создание и скрининг версий красных редокс-чувствительных белков.....	183
3.1.1.2. Свойства <i>Grx1-roCherry</i>	189
3.1.1.3. Прямое сравнение <i>Grx1-roCherry</i> и <i>Grx1-roGFP2</i> в одной системе экспрессии.....	193
3.1.1.4. Редокс-статус цитозоля и митохондриального матрикса клетки при воздействии диметилфумарата.....	194
3.1.1.5. Изменение редокс-статуса разных типов клеток при смещении метаболизма от гликолиза к окислительному фосфорилированию.....	196
3.1.1.6. Редокс-различия в компартментах разных типов клеток при локализованной продукции H_2O_2	198
3.1.2. Биосенсор для регистрации гипогалогенных кислот.....	201
3.1.2.1. Создание и скрининг версий биосенсора для регистрации гипогалогенных кислот.....	203
3.1.2.2. Свойства биосенсора <i>Hypocrates</i>	206
3.1.2.3. Создание контрольной версии для биосенсора <i>Hypocrates</i>	215
3.1.2.4. Пространственная структура <i>HypocratesCS</i>	217
3.1.2.5. Биосенсор <i>Hypocrates</i> в клетках эукариот.....	219
3.2. Исследования редокс-процессов в моделях <i>in vivo</i> с помощью генетически кодируемых биосенсоров.....	223
3.2.1. Разработка систем для исследования динамики биохимических параметров в условиях гипоксии/ишемии.....	225
3.2.1.1. Разработка установки для моделирования условий гипоксии/реоксигенации в культурах клеток и тканях рыб <i>Danio rerio</i>	225
3.2.1.2. Разработка платформы для исследований биохимических процессов в тканях мозга лабораторных грызунов с помощью оптоволоконного интерфейса и биосенсоров.....	228

3.2.2. Динамика ацидоза в культуре нейронов при гипоксии и в тканях мозга крыс при ишемическом инсульте.....	233
3.2.3. Динамика H ₂ O ₂ в культуре нейронов при гипоксии и в тканях мозга крыс при ишемическом инсульте.....	237
3.2.4. Гипергликемия усугубляет последствия инсульта не через генерацию H ₂ O ₂	245
3.2.5. Биосенсоры на основе cpYFP в мультифотонном режиме возбуждения флуоресценции.....	251
3.2.6. Редокс-параметры в кардиомиоцитах при гипоксии/реоксигенации.....	256
3.2.7. Рыба <i>Danio rerio</i> в модели гипоксии/реоксигенации.....	262
3.2.8. <i>In vivo</i> регистрация динамики гипогалогенных кислот и H ₂ O ₂ при воспалении в тканях на модели рыбы <i>Danio rerio</i>	269
ГЛАВА 4. ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	273
ВЫВОДЫ.....	293
Список цитируемой литературы.....	295
Благодарности.....	352

Список сокращений

Русскоязычные сокращения

- АФА – активные формы азота
 АФГ – активные формы галогенов
 АФК – активные формы кислорода
 АФС – активные формы серы
 БСА – бычий сывороточный альбумин
 ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота
 КоА – кофермент А
 3-МСТ – 3-меркаптопируват сульфотрансфераза
 ПЦР – полимеразная цепная реакция
 РНК – рибонуклеиновая кислота
 ЦБС – цистатионин β -синтаза
 ЦГЛ – цистатионин γ -лиаза/цистатионаза
 ЭДТА – этилендиаминтетрауксусная кислота
 ЭПР – эндоплазматический ретикулум

Англоязычные сокращения

- AAV – adeno-associated virus, аденоассоциированный вирус
 AEBSF – 4-(2-aminoethyl)benzenesulfonyl fluoride hydrochloride, 4-(2-аминоэтил) бензолсульфонилфторид гидрохлорид
 АТР – adenosine triphosphate, аденозинтрифосфат
 CCD – Charge-Coupled Device, прибор с зарядовой связью
 cGMP – cyclic guanosine monophosphate, циклический гуанозинмонофосфат
 CMV – cytomegalovirus enhancer, энхансер цитомегаловируса
 ДААО – D-amino acid oxidase, оксидаза D-аминокислот
 ДСА – dichloroacetic acid, дихлорацетат
 DMF – dimethyl fumarate, диметилфумарат
 DMSO – dimethyl sulfoxide, диметилсульфоксид
 DTT – dithiothreitol, дитиотреитол
 DUOX – dual oxidase, двойная оксидаза
 ERK – extracellular signal-regulated kinase, киназа, регулируемая внеклеточными сигналами
 Ero1 – endoplasmic reticulum oxidoreductin 1, оксидоредуктин 1 эндоплазматического ретикулума

ESPT – excited state proton transfer, перенос протона в возбужденном состоянии

FAD – flavin adenine dinucleotide, флавинадениндинуклеотид

FBS – fetal bovine serum, фетальная бычья сыворотка

FMN – flavin mononucleotide, флавинмонопнуклеотид

FP – fluorescent protein, флуоресцентный белок

Производные от FP названия:

GFP – green fluorescent protein, зеленый флуоресцентный белок

CFP – cyan fluorescent protein, циановый флуоресцентный белок

RFP – red fluorescent protein, красный флуоресцентный белок

cpFP – circularly permuted fluorescent protein, круговой пермутант флуоресцентного белка

cpsGFP – superfolder green fluorescent protein, суперсвернутый зеленый флуоресцентный белок

cpYFP – circularly permuted yellow fluorescent protein, круговой пермутант желтого флуоресцентного белка

EBFP – enhanced blue fluorescent protein, улучшенный голубой флуоресцентный белок

EGFP – enhanced green fluorescent protein, улучшенный зеленый флуоресцентный белок

EYFP – enhanced yellow fluorescent protein, улучшенный желтый флуоресцентный белок

roGFP – redox-sensitive green fluorescent protein, редокс-чувствительный зеленый флуоресцентный белок

rxYFP – redox-sensitive yellow fluorescent protein, редокс-чувствительный желтый флуоресцентный белок

FRET – Forster resonance energy transfer, Фёрстеровский перенос энергии, флуоресцентный резонансный перенос энергии

G6PD – glucose-6-phosphate dehydrogenase, глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа

GFAP – Glial Fibrillary Acidic Protein, глиальный фибриллярный кислый белок

Gpx – glutathione peroxidase, глутатион пероксидаза

Gpx – glutathione peroxidase, глутатион пероксидаза

GR – glutathione reductase, глутатионредуктаза

Grx – glutaredoxin, глутаредоксин

GSH – восстановленная форма глутатиона

GSSG – окисленная форма глутатиона

GST – glutathione transferase, глутатион трансфераза

HBSS – Hank's Balanced Salt Solution, сбалансированный солевой раствор Хэнкса

HEPES – 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid, 4-(2-гидроксиэтил)-1-пиперазинэтансульфоная кислота

HIF – Hypoxia inducible factor, фактор, индуцируемый гипоксией
 HRE – Hypoxia response elements, элементы ответа на гипоксию
 hSyn1 – human synapsin 1 promoter, промотор человеческого синапсина 1
 IPTG – isopropyl- β -D-thiogalactoside, изопропил- β -D-1-тиогалактопиранозид
 JNK – c-Jun N-terminal kinases, c-Jun N-концевые киназы
 КНВ – Krebs-Henseleit buffer, раствор Кребса-Гензелейта
 LB – Lysogeny Broth, Лизогенный бульон
 LED – light-emitting diode, светоизлучающий диод
 MAPK – mitogen-activated protein kinase, митоген-активируемая протеинкиназа
 Msr – methionine sulfoxide reductase, метионинсульфоксид редуктаза
 MTS2 – duplicated mitochondrial targeting sequence, дублированная последовательность митохондриальной локализации
 NAD⁺ – окисленная форма никотинамидадениндинуклеотида
 NADH – восстановленная форма никотинамидадениндинуклеотида
 NADP⁺ – окисленная форма никотинамидадениндинуклеотидфосфата
 NADPH – восстановленная форма никотинамидадениндинуклеотидфосфата
 NCT – N-chlorotaurine, N-хлоротаурин
 NF- κ B – nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells, ядерный фактор κ B
 NLS – nuclear localization sequence, сигнал ядерной локализации
 NOS – nitric oxide synthase, синтаза оксида азота
 NOX – NADPH oxidase, NADPH-оксидаза
 Nrf2 – nuclear factor erythroid 2-related factor 2, ядерный фактор фактор 2, связанный с эритроидом 2
 PBS – phosphate-buffered saline, фосфатно-солевой буфер
 PDGF – Platelet-derived growth factors, фактор роста тромбоцитов
 PDI – protein disulfide isomerase, протеиндисульфидизомераза
 Prx – peroxiredoxin, пероксиредоксин
 SDS – sodium dodecyl sulphate, додецилсульфат натрия
 SHR – spontaneously hypertensive rat, спонтанно гипертензивные крысы
 SOB – Super Optimal Broth, супероптимальный бульон
 SOD – superoxide dismutase, супероксиддисмутаза
 Srx – sulfiredoxin, сульфиредоксин
 TAE – tris-acetate-EDTA buffer, трис-ацетатный буфер с добавлением ЭДТА
 TRP каналы – transient receptor potential (TRP), каналы с транзиторным рецепторным потенциалом

Trx – thioredoxin, тиоредоксин

TrxR – thioredoxin reductase, тиоредоксинредуктаза

cTNT – cardiac troponin T promoter, промотор сердечного тропонина T

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность исследования

Регуляция большинства внутриклеточных процессов происходит с участием окислительно-восстановительных реакций (далее будем пользоваться общепринятым термином **редокс**- от англ. redox, сокращ. от oxidation-reduction). В ходе этих реакций молекулы клетки обмениваются восстановительными эквивалентами в виде электронов или гидрид анионов. 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 неизбежных побочных продуктов аэробного дыхания. АФК приписывали негативную для клетки роль, которая на уровне организма обуславливает процессы старения и развитие различных патологий. Единственным примером направленной продукции АФК в организме служили иммунные клетки, использующие окислительный стресс для уничтожения чужеродных агентов. Однако догма об исключительно негативной роли АФК была кардинально пересмотрена. На сегодняшний день АФК, а также активным формам азота (АФА) и серы (АФС) приписывают не только повреждающую роль, но и признают их важнейшее значение в качестве селективных редокс-регуляторов, среди них H_2O_2 , $^{\bullet}NO$, H_2S . Огромный массив экспериментальных данных за последние несколько десятилетий позволил сформировать концепцию современной редокс-биологии. Так, профессором Helmut Sies введен термин «*окислительный эустресс*», который отражает физиологическое производство низкомолекулярных соединений с высокой реакционной способностью для регуляции сигнальных процессов в клетках. Противоположный по смыслу термин «*окислительный стресс*» носит негативный оттенок и отражает дисбаланс между системами, которые производят редокс-активные соединения, и системами их нейтрализующими. Неконтролируемый уровень редокс-активных компонентов приводит к масштабным внутриклеточным повреждениям.

Развитию редокс-биологии во многом способствовало появление принципиально новых подходов в исследованиях. Высокая реакционная способность ключевых участников редокс-регуляции определяет их крайне короткое время жизни (секунды и меньше). Поэтому такие компоненты не могут быть выделены или измерены в системе напрямую с помощью традиционных аналитических подходов химии. Без преувеличения, новая эпоха в области редокс-биологии была ознаменована появлением флуоресцентных белков и

первых биосенсоров на их основе. В начале века элегантная идея внесения в структуру флуоресцентного белка редокс-активных остатков цистеинов, способных «чувствовать» редокс-окружение такого белка, привела к созданию одного из самых популярных на сегодняшний день семейств редокс-биосенсоров. Другая идея основывалась на использовании флуоресцентных белков в качестве визуализирующего модуля, к которому на уровне гена добавляли сенсорный домен белковой природы. Изменения в структуре сенсорного домена при его взаимодействии с конкретным внутриклеточным параметром в такой химерной молекуле передаются на флуоресцентный белок, меняя его спектральные характеристики. Динамика флуоресцентного сигнала отражает динамику конкретного внутриклеточного параметра: физического параметра или концентрации ионов, метаболитов, сигнальных молекул. Такой молекулярный инструмент, кодируемый геном, может быть доставлен практически в любые типы клеток и их компартменты, а также в ткани живых организмов. Особую популярность такие инструменты приобрели в области редокс-биологии. На сегодняшний день существует обширная мировая коллекция биосенсоров для исследования в живых системах динамики с пространственно-временным разрешением таких параметров, как редокс-статус глутатиона (GSSG/2GSH), тиоредоксина, пулов NAD(P) (NAD^+/NADH , $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$), концентрации H_2O_2 , органических пероксидов ROOH, NO , сульфоксидов метионина и некоторых других. Биосенсоры позволили в режиме реального времени изучать динамику ранее неуловимых для исследователей редокс-параметров в разных живых объектах в контексте таких глобальных биологических процессов, как эмбриогенез и старение, воспаление и регенерация, функционирование органов в норме и при патогенезе различных заболеваний, скрининге лекарственных препаратов, симбиотических и паразитарных взаимодействий организмов.

Однако не для всех редокс-параметров созданы такие инструменты. Так обстоит дело с гипогалогенными кислотами – самыми сильными двухэлектронными окислителями, которые встречаются в живых системах. Активным формам галогенов (АФГ) чаще приписывают роль мощных антимикробных агентов, образующихся в клетках иммунной системы, например, нейтрофилах, базофилах, тканевых макрофагах. Научное сообщество все больше уделяет внимание исследованию острого и хронического типов воспаления при различных заболеваниях, поскольку при этих состояниях выражено развитие гипогалогенного стресса, характеризующегося высокой продукцией хлорноватистой (HOCl), бромноватистой (HOBr) кислот и их производных. Однако установить точные механизмы участия АФГ в воспалительных процессах на данный момент невозможно из-за отсутствия подходящих методов исследований. Ранее считалось, что гипогалогенные кислоты являются настолько неспецифичными агрессивными окислителями, что создание

для них биосенсора биологической природы невозможно. Мнение изменилось после обнаружения сразу несколько бактериальных транскрипционных факторов, которые претерпевают модификации по определенным аминокислотным остаткам в результате взаимодействия с гипогалогенными кислотами и их производными. Это не только увеличивает шанс на успешную разработку специфичного биосенсора для визуализации гипогалогенного стресса, но и заведомо повышает интерес к такому инструменту в свете предположений о возможной физиологической роли гипогалогенных кислот. Ведь если обнаружены специфичные природные домены, значит даже такие мощные окислители как АФГ могут модифицировать 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. Такой мультипараметрический режим позволяет регистрировать динамику сразу нескольких редокс-параметров в пределах одной системы или динамику одного и того же параметра, но в разных компартментах клетки или в разных типах клеток в тканях животных.

Не менее важен поиск новых экспериментальных моделей и возможностей применения генетически кодируемых биосенсоров. Отсутствие эффективной терапии для некоторых заболеваний обусловлено неполной картиной наших представлений о молекулярных механизмах патогенеза. Общеизвестный и признанный в медико-биологическом сообществе факт, что окислительный стресс является главным повреждающим фактором при ишемии тканей головного мозга и сердца, как наиболее метаболически активных и потому чувствительных органов к изменению концентрации O_2 . 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 и других редокс-активных соединений при ишемии. Применение в моделях патогенеза *in vivo* селективных и высокочувствительных генетически кодируемых биосенсоров нового поколения уже в скором времени позволит выявить подробный сценарий редокс-процессов. Среди представителей АФК наиболее стабильным и биологически значимым считается H_2O_2 , эта молекула в клетках выполняет сигнальную функцию при низких концентрациях, но при этом также является маркером окислительного стресса. Динамика H_2O_2 при ишемии в тканях млекопитающих *in vivo* до сих пор не была известна.

Цель 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 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 редокс-чувствительный белок с красной эмиссией флуоресценции, расширив спектральную палитру популярного семейства биосенсоров. Наиболее успешная из полученных нами версий создана на основе белка mCherry, в структуру которого мы внесли пару близкорасположенных редокс-активных цистеинов. Для лучшего тиол-дисульфидного обмена редокс-активный флуоресцентный белок (roCherry) соединен через пептидный линкер с глутаредоксином 1 человека (Grx1). Grx1-roCherry может быть применен в комбинации с любым другим спектрально различающимся биосенсором при мультипараметрическом подходе регистрации редокс-событий. 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. С помощью комбинации Grx1-roCherry и Grx1-roGFP2 мы также показали, что клетки разных типов демонстрируют выраженные отличия в межкомпаратментных редокс-взаимодействиях. Мы направиленно производили H_2O_2 в разных внутриклеточных компартментах клеток с помощью фермента оксидазы D-аминокислот (DAAO) и оценивали окисление также в разных компартментах. Эндогенная продукция H_2O_2 в матриксе митохондрий гиппокампальных нейронов мыши вызывает окисление как в самих митохондриях, так и цитозоле. В этом же эксперименте клетки онкотипа HeKa Kyoto демонстрируют окисление только в митохондриях, H_2O_2 не распространяется в цитозоль, однако эффект снимается ингибированием активности тиоредоксиредуктазы (TrxR). Примечательно, продукция H_2O_2 в ядре в обоих используемых типов клеток вызывает окисление как в цитозоле, так и митохондриях. Подход мультипараметрической регистрации редокс-событий с помощью таких биосенсоров может быть использован для поиска новых лекарственных средств.

Мы разработали первый в мире 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 Hurocrates, на сегодняшний день не имеет аналогов. Биосенсор чувствителен не только к гипогалогенным кислотам (HOCl, HOBr) и так называемой псевдогипогалогенной кислоте HOSCN, но и различным производным, например, хлораминам. По нашим данным созданный нами биосенсор является самой реакционноспособной белковой молекулой в отношении хлораминов. Для контрольной версии HurocratesCS, отличающейся от основной мутацией по ключевому Cys355, 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. Hurocrates позволил визуализировать в режиме реального времени динамику гипогалогенного стресса, который испытывают бактериальные клетки *E.coli*, фагоцитируемые нейтрофилами человека в культуре. Комбинация биосенсоров Hurocrates и HyPer-Red позволила впервые визуализировать одновременно динамику гипогалогенного стресса и H_2O_2 в тканях рыб *Danio rerio* в условиях развития воспалительной реакции, вызванной механическим повреждением.

По-прежнему актуален вопрос о динамике АФК в клетках, испытывающих острую гипоксию и последующую реоксигенацию. Наши тесты на культуре гиппокампальных

нейронов мыши показали, что при гипоксии клетки испытывают выраженный ацидоз, накопление NADH и снижение базового уровня H_2O_2 , причем наиболее выраженное снижение характерно для матрикса митохондрий. Мы не обнаружили ожидаемого всплеска продукции H_2O_2 в условиях гипоксии/реоксигенации. 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. В астроцитах амплитуда ответа биосенсора HyPer7 в конечном итоге выше, чем в нейронах. Таким образом, подтверждено участие H_2O_2 в патогенезе инсульта, однако продукция H_2O_2 не носит взрывного характера и демонстрирует низкий уровень в острой фазе. Разница в динамике H_2O_2 в культивируемых нейронах и тканях мозга *in vivo* демонстрирует плохую корреляцию между этими системами. При усилении ишемического повреждения тканей мозга, вызванного состоянием гипергликемии в стрептозотоцин-индуцируемой модели диабета у крыс, мы не обнаружили увеличения продукции H_2O_2 ни в острой фазе инсульта, ни на следующие сутки. Это позволило сделать вывод о том, что гипергликемия усугубляет последствия инсульта, но механизм не обусловлен усилением продукции H_2O_2 .

К снижению концентрации O_2 чувствительны также ткани сердца. Мы показали, что динамика H_2O_2 при гипоксии кардинальным образом отличается у неонатальных и зрелых кардиомиоцитов крыс в культуре. В неонатальных клетках гипоксия вызывает снижение базового уровня H_2O_2 в матриксе митохондрий, схожую динамику мы наблюдали в нейронах. Однако в зрелых кардиомиоцитах при гипоксии, наоборот, наблюдается увеличение уровня H_2O_2 . Результаты Рамановской микроспектрометрии подтверждают разницу в редокс-статусе этих типов клеток, в частности, неонатальные кардиомиоциты отличаются менее эффективной электрон-транспортной цепью митохондрий. Для исследования динамики H_2O_2 в тканях сердца *in vivo* нами был выбран модельный объект рыба *D. rerio*. Предложенный нами подход регистрации сигнала биосенсоров в тканях мозга лабораторных млекопитающих *in vivo* посредством оптоволоконного интерфейса не подходит для работы с сердцем. *D. rerio* характеризуется высокой степенью прозрачности тканей, и в этом заключается главное преимущество объекта при использовании оптических методов исследований. Мы показали, что на стадии гипоксии в тканях *D. rerio* именно в матриксе митохондрий образуется H_2O_2 . Важно, что H_2O_2 не диффундирует в цитозоль и при реоксигенации нейтрализуется в митохондриях. Не только в сердце, но и в других тканях *D. rerio* при гипоксии мы наблюдали схожую картину редокс-событий.

Ацидоз является универсальным метаболическим ответом живых систем на гипоксию. Во всех используемых нами клеточных и животных моделях гипоксии/ишемии с первых секунд патогенеза происходит выраженное снижение внутриклеточного рН в среднем на 0,5 единиц, что было показано нами с помощью биосенсора SypHer3s.

Теоретическая и практическая значимость

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: от компартментов единичных клеток в культуре до тканей трансгенных организмов *ex vivo* и *in vivo*. Основное отличие Grx1-roCherry от предыдущих версий в семействе редокс-чувствительных флуоресцентных белков заключается в спектральных особенностях. Для данного типа биосенсоров нами была впервые разработана версия на основе красного флуоресцентного белка. Биосенсор Нурocrates для регистрации динамики гипогалогенных кислот и их производных на сегодняшний день не имеет аналогов. Нурocrates представляет интерес для исследователей воспалительных процессов, позволяя визуализировать динамику гипогалогенного стресса в клетках иммунной системы, в фагоцитируемых ими бактериальных клетках, а также в тканях, входящих и прилегающих к области воспаления, на моделях *in vivo*. Нурocrates может стать востребованным инструментом для поиска подходов, направленных на коррекцию острых и хронических воспалительных реакций, сопутствующих различным заболеваниям. В рамках представленной работы на основе генетически кодируемых биосенсоров нами была создана исследовательская платформа для изучения воздействия гипоксии на живые системы разных уровней сложности. Для культивируемых клеток и рыб *D.rerio* мы использовали проточную систему, позволяющую быстро и точно изменять уровень O₂ в среде при одновременной микроскопии исследуемого объекта и регистрации флуоресцентного сигнала биосенсоров. Для исследования динамики процессов в тканях мозга крыс *in vivo* при ишемии мы использовали технику оптоволоконного нейроинтерфейса. Для этого ген выбранного биосенсора доставляется в интересующие области мозга с помощью частиц аденоассоциированного вируса AAV, в эту же область имплантируется оптическое волокно для последующей регистрации флуоресцентного сигнала в тканях. Предложенные нами подходы с использованием генетически кодируемых инструментов могут быть применены для исследования других заболеваний. Биосенсоры на основе флуоресцентных белков могут быть использованы для визуализации биохимических событий в коре головного мозга животных через краниальное окно. Для

лучшего пространственного разрешения применяют подходы мультифотонной микроскопии. Биосенсоры SupHer3s, HyPer7, Нурocrates были охарактеризованы нами в режиме мультифотонного возбуждения флуоресценции.

Теоретическую значимость представленной работы отражают экспериментальные данные, полученные нами с помощью генетически кодируемых биосенсоров. При комбинации Grx1-roCherry с красной эмиссией флуоресценции со спектрально различающимися биосенсорами мы показали существенные редокс-отличия между разными типами клеток (на примере линий HeLa Kyoto и HEK293, первичной культуры нейронов мыши) в условиях различных воздействий на клеточный метаболизм, в частности, в результате усиления окислительного фосфорилирования по отношению к гликолизу и генерации окислительного стресса на уровне разных компартментов. Например, в клетках HeLa Kyoto предотвращено распространение H_2O_2 в цитозоль из матрикса митохондрий. Как оказалось, ключевую роль в поддержании этого антиоксидантного механизма играет TrxR. Еще предстоит узнать, является ли это уникальным механизмом для онкоклеток других типов, а также подтвердить эффект на *in vivo* моделях. С помощью биосенсора Нурocrates мы впервые визуализировали пространственно-временную динамику гипогалогенного стресса в бактериях, фагоцитируемых человеческими нейтрофилами в культуре, а также в тканях рыб *D.rerio* при воспалении, вызванном механическим повреждением. Полученные нами данные дополняют современную картину редокс-событий, происходящих при воспалительных реакциях. Нурocrates оказался белковой молекулой с интересными свойствами: он демонстрирует высокую чувствительность по отношению к хлоротаурину. Таурин широко распространен в клетке и, как и многие амины, модифицируется при взаимодействии с НОС1. Пример белка Нурocrates показывает, что окружение реакционного центра белковой молекулы, судя по всему, регулирует его кинетические свойства даже по отношению к таким реакционноспособным соединениям, как гипогалогенные кислоты и их производные. Это веский аргумент в пользу рассматриваемой идеи о том, что биохимическая роль (псевдо)гипогалогенных кислот и их производных в клетке не ограничена исключительно повреждающим и неселективным эффектом. Для контрольной версии НурocratesCS нами была расшифрована пространственная структура белка, что дает представления о механизме работы не только данного биосенсора, но и других, полученных на основе круговых пермутантов флуоресцентных белков (срFP). Нурocrates является первым белком на основе срYFP, для которого такая работа была успешно выполнена. Данный результат может быть использован в качестве основы для рациональной стратегии по оптимизации различных свойств молекулярных инструментов данного типа. С помощью биосенсора HyPer7 и

техники регистрации флуоресцентного сигнала через имплантируемое оптическое волокно мы установили динамику H_2O_2 в клетках тканей мозга крыс *in vivo* при развитии ишемического инсульта. При инсульте генерация H_2O_2 в тканях головного мозга действительно происходит, но преимущественно не в острой фазе, а на следующие сутки с медленной динамикой возрастания. Усиление ишемического повреждения тканей мозга при гипергликемии, что характеризуется более обширной областью поражения, в стрептозотоцин-индуцируемой модели сахарного диабета у крыс никак не повлияло на динамику H_2O_2 ни в острой, ни на поздней стадии инсульта. Результаты исследования воздействия гипоксии на ткани *D. rerio* свидетельствуют об исключительно митохондриальном происхождении H_2O_2 в клетках сердца и головного мозга. Примечательно, что образуемый при гипоксии H_2O_2 в митохондриях нейтрализуется в этом же компартменте при последующей реоксигенации. Полученные сведения, опубликованные нами в цикле работ, расширяют представление о механизмах, которые лежат в основе повреждения тканей в условиях недостатка O_2 . Новые типы биосенсоров в сочетании с представленными моделями в дальнейшем позволят детализировать карту редокс-событий и выявить ключевых участников в патогенезе ишемических повреждений различных органов, что, безусловно, представляет ценность для поиска новых подходов терапии целого ряда заболеваний.

Методология и методы исследования

Результаты, представленные в настоящей диссертационной работе, получены с использованием различных современных методов. При создании новых генетических конструкций были применены генно-инженерные методы. Значимый раздел настоящей работы выполнен на белковых препаратах биосенсоров с использованием методов аффинной хроматографии, гель-фильтрации, абсорбционной спектроскопии, флуоресцентной спектроскопии. Совместно с лабораторией профессора Joris Messens (Бельгия) для биосенсора Нурocrates были определены кинетические параметры с помощью метода остановленной струи, проведен рентгеноструктурный анализ. Флуоресцентную микроскопию проводили на различных культурах клеток, как линейных (HeLa Kyoto, EMBL; HEK293, ATCC), так и первичных (смешанная нейрональная культура из мозга эмбрионов мыши; неонатальные и зрелые кардиомиоциты крыс; человеческие полиморфноядерные лейкоциты), которые были получены по стандартным и оптимизированным протоколам. К клеточным культурам были применены методы проточной цитометрии, флуоресцентной микроскопии, Рамановской микроспектрометрии совместно с Браже Н.А. (МГУ, ИБХ, Москва), смоделированы условия

гипоксии/реоксигенации. В качестве модельных организмов для исследования биохимических процессов *in vivo* были выбраны спонтанно-гипертензивная линия крыс (Charles River) и рыбы *Danio rerio* АВ линии. Все манипуляции с животными были выполнены в соответствии с протоколами, одобренными этической комиссией ИБХ РАН. Для *D.rerio* была применена модель воспалительной реакции, вызванной механическим повреждением ткани, совместно с лабораторией профессора Sophie Vrız (Франция). *In vivo* модель гипоксии для *D.rerio* выполнили с помощью адаптированной установки, используемой для клеточных культур. Ген биосенсора в ткани *D.rerio* доставляли инъекцией соответствующей мРНК в эмбрионы на стадии одной клетки, флуоресцентный сигнал регистрировали с помощью флуоресцентной микроскопии. Для исследования биохимических процессов *in vivo* в тканях мозга крыс использовали подход оптоволоконного нейроинтерфейса, разработанного в лаборатории профессора Желтикова А.М. (МГУ, Москва). Гены биосенсоров доставляли в ткани мозга животных с помощью инъекции вирусных частиц с последующей имплантацией в ту же область оптического волокна для регистрации сигнала. Помимо стереотаксических хирургических манипуляций осуществляли моделирование ишемического инсульта путем окклюзии средней мозговой артерии, применяли стрептозотоцин-индуцируемую модель сахарного диабета. Свойства биосенсоров SynHer3s, HyPer7 и Нурocrates в мультифотонном режиме возбуждения флуоресценции охарактеризовали совместно с Желтиковым А.М. и Ланиным А.А. (МГУ, Москва). Представленные методы позволили реализовать поставленные задачи и подойти к их решениям комплексно с разных сторон: от исследований в системах *in vitro* на клеточных культурах и тканях *ex vivo* до моделей *in vivo* на двух популярных в лабораторной практике видах животных.

Основные положения, выносимые на защиту

- 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.
- Разработан биосенсор Нурocrates для регистрации динамики (псевдо)гипогалогенных кислот и их производных. Расшифровка пространственной структуры контрольной версии Нурocrates представляет интерес как для рациональной оптимизации свойств данного биосенсора, так и понимания общих

механизмов функционирования различных биосенсоров на основе круговых пермутантов флуоресцентных белков.

- 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.
- 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.
- 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.
- У крыс с высоким гликемическим статусом в крови значительно больше объем повреждения тканей мозга при ишемическом инсульте, однако это не влияет на динамику H₂O₂ ни в острой фазе патогенеза, ни на следующие сутки. Таким образом, гипергликемия усугубляет последствия инсульта, но не через генерацию H₂O₂.
- Неонатальные и зрелые кардиомиоциты крыс различаются по редокс-статусу. При гипоксии только зрелые типы клеток демонстрируют продукцию H₂O₂ в матриксе митохондрий.
- В различных тканях *Danio rerio* показана продукция H₂O₂ *in vivo* при гипоксии в матриксе митохондрий и ее отсутствие в цитозоле клеток. Важно, что при реоксигенации H₂O₂ так и не распространяется за пределы митохондрий и нейтрализуется в этом же компартменте.

Степень достоверности и апробация результатов

Результаты работы представлены на ведущих международных и всероссийских научных мероприятиях, среди которых XXXVI Международная зимняя молодежная научная школа «Перспективные направления физико-химической биологии и

биотехнологии» (2024 г., г. Москва, пленарный доклад); III Всероссийская научно-практическая конференция с международным участием «Генетически кодируемые инструменты: разработка и применение в *in vivo* моделях» «ORPHA-DA. Редкие болезни: от истоков к перспективам» (2023 г., г. Москва, устный доклад); Школа молодых ученых «Новые модели нейродегенеративных заболеваний и перспективные генотерапевтические препараты» (2023 г., г. Москва, устный доклад); VII International Conference on Ultrafast Optical Science (2023 г., г. Москва, устный доклад); IV молодежная школа-конференция «Молекулярные механизмы регуляции физиологических функций» (2023 г., г. Звенигород, устный доклад); XXIV съезд физиологического общества им. М.П. Павлова (2023 г., г. Санкт-Петербург, устный доклад); 12th International Human Peroxidase Meeting (2023 г., г. Будапешт, Венгрия, устный доклад); Нейрокампус. Нейротехнологии будущего (2022 и 2023 гг., Иркутская область, п. Большие Коты, устные доклады); IV Международная конференция Volga Neuroscience (2023 г., г. Нижний Новгород, устный доклад); 13-я международная научная конференция Биокатализ, фундаментальные исследования и применения (2023 г., г. Суздаль, устный доклад); Конференция GLP-PLANET (2023 г., г. Санкт-Петербург, устный доклад); 2023 Conference on Lasers and Electro-Optics Europe & European Quantum Electronics Conference (2023 г., г. Мюнхен, Германия, постерный доклад); III Всероссийская научная конференция с международным участием «Оптогенетика+ 2023» (2023 г., г. Санкт-Петербург, устный доклад); III Студенческий биохимический форум (2023 г., г. Москва, приглашенный доклад); V Национальный Конгресс по Регенеративной Медицине (2022 г., г. Москва, устный доклад); Лекторий Нейрокампуса РНИМУ им. Н.И. Пирогова (2022 г., г. Москва, приглашенный доклад); VII Съезд биохимиков и X Российский симпозиум «Белки и пептиды» (2022 г., г. Сочи-Дагомыс, стендовые доклады); EMBO workshop: Thiol oxidation in biology (2022 г., Сан-Фелиу-де-Гишольс, Испания, устный доклад); Девятая конференция специалистов по лабораторным животным Rus-LASA-9 (2021 г., г. Москва, устный доклад); Free Radical Research Europe (SFRR-E) «Redox biology in the 21st century: a new scientific discipline» (2021 г., г. Белград, Сербия, постерный доклад); International SPP1710 conference «Thiol-based switches and redox regulation – from microbes to men» (2019, Сан-Фелиу-де-Гишольс, Испания, устный доклад); Всероссийская мультikonференция с международным участием «Биотехнология – медицине будущего» (2019 г., г. Новосибирск, стендовый доклад); EMBO Conference on Redox Biology (2017 г., г. Москва-Санкт-Петербург, стендовые доклады); EMBL Bioimaging Master Course reports (2015 г., г. Гейдельберг, Германия, устный доклад); FEBS-EMBO Congress (2014 г., г. Париж, Франция, стендовый доклад).

Исследования по теме представленной диссертации неоднократно поддерживались различными фондами грантовой поддержки (среди них гранты РФФИ 16-34-60175, 18-34-20032, 21-34-70031, РФФИ 17-15-01175, грант президента РФ МК-6339.2016.4)

Основными инструментами представленной работы являются генетически кодируемые биосенсоры на основе флуоресцентных белков. В свете рассматриваемых биологических вопросов данные экспериментальные подходы не имеют альтернатив. Новые биосенсоры *Hypocrates* и *Grx1-roCherry* были нами детально протестированы и относительно недавно стали общедоступными инструментами исследования. В частности, биосенсоры размещены в репозитории плазмид Addgene. Работа над *Hypocrates* велась при сотрудничестве с коллегами из Бельгии и Франции, поэтому некоторые эксперименты *in vitro* и с рыбой *D. rerio* независимо проводились разными коллективами, полученные данные представляют высокую сходимость. Другие используемые в работе биосенсоры *Grx1-roGFP2*, *SoNar*, *SypHer3s*, *HuPer-3*, *HuPer-Red*, *HuPer7* уже приобрели широкую популярность на международном уровне и применяются в качестве надежных инструментов сотнями лабораторий по всему миру.

Для всех результатов показана воспроизводимость в независимых сериях экспериментов, проведена надлежащая статистическая обработка данных. Для экспериментов *in vivo* были выбраны популярные и востребованные модели на животных, признанные своего рода «золотыми стандартами», среди них: 1) модель ишемического инсульта у крыс, вызванная окклюзией средней мозговой артерии; 2) стрептозотоцин-индуцируемая модель диабета у крыс; 3) модель воспаления у рыб *Danio rerio*, вызванного механическим повреждением хвостового плавника; 4) протоколы получения первичных клеток (нейрональные культуры, кардиомиоциты) из тканей лабораторных млекопитающих. Во всех экспериментах с животными проведены необходимые контроли. В частности, для оценки влияния хирургических вмешательств на динамику регистрируемого сигнала биосенсора в каждой серии были введены группы ложнооперированных животных; для каждого животного экспериментальной группы подтверждали моделируемый эффект (визуализировали объем инсульта в мозге крыс и подтверждали перекрытие зоны флуоресценции биосенсоров и координаты имплантируемого оптоволокна с центральной областью повреждения; подтверждали гипергликемический статус крыс регулярным мониторингом уровня глюкозы в крови; оценивали влияние автофлуоресценции тканей животных).

Работа выполнена на современном оборудовании с применением реактивов и расходных материалов от ведущих мировых производителей.

Список публикаций автора по теме диссертации

По теме диссертации опубликовано 42 статьи в рецензируемых научных журналах, индексируемых базами данных Web of Science и Scopus, из них 15 – обзорные статьи.

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). *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, Solotenzov 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, Solotenzov 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, Vriz 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. 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. 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*. 2021. 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; 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): E8164. 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 (7). 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, Vríz 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.

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 Vrız (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 НурPer-3 (работа над биосенсором составила основу кандидатской диссертации автора), НурPer-Red (участие автора в проведении тестов биосенсора на культуре клеток), НурPer7 (участие автора в определении некоторых свойств биосенсора *in vitro*), СурPer3s (тестирование *in vivo* в тканях *Danio rerio* выполнено под руководством автора). Ряд работ в сотрудничестве с Алексеем Михайловичем Желтиковым (МГУ) и Александром Александровичем Ланиным (МГУ) опубликован в научных физических журналах *Journal of Raman Spectroscopy*, *Journal of Physics: Photonics*, *Optics Letters*, *Journal of Biophotonics*, где рассматривались аспекты спектральных характеристик перечисленных биосенсоров, биологическая часть в этих работах выполнена лично или под руководством автора диссертации. Научные результаты, полученные автором диссертации лично или под его руководством, представлены на различных мероприятиях лично автором или его соавторами по научным публикациям. Автор диссертации на всех этапах готовил работы к

публикациям в научных журналах (планирование работ, анализ данных, написание текста, оформление, ответы рецензентам).

ГЛАВА 1

ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. РЕДОКС-РЕГУЛЯЦИЯ ЖИВЫХ СИСТЕМ

1.1.1. Краткая история редокс-биологии, общие принципы

Редокс-гомеостаз играет ключевую роль в поддержании функций любой клетки. Трудно найти пример в рамках глобальных внутриклеточных процессов, которые не сопровождались бы редокс-преобразованиями. Соединения в клетке преобразуются путем обмена восстановительными эквивалентами в виде электронов и гидрид-анионов, этот принцип лежит в основе необходимых для жизни процессов: осуществлении сигнальных каскадов, поддержании метаболизма и биоэнергетических процессов, реализации передачи генетической информации. К настоящему времени многие из таких глобальных редокс-процессов подробно изучены, их можно демонстрировать в качестве наглядного примера. Например, достаточно подробно известен молекулярный механизм фотосинтеза, который протекает в хлоропластах зеленых растений. В результате фотосинтеза за счет энергии видимого света происходит окисление H_2O с запасанием восстановительных эквивалентов в виде NADPH [1]. O_2 образуется в качестве побочного продукта фотосинтеза, но именно он обеспечивает жизнь всем аэробным организмам, включая сами растения, поскольку служит конечным акцептором электронов в электрон-транспортных цепях в ходе окислительного фосфорилирования [2].

Появление инструментальных подходов, позволяющих определять редокс-состояния различных компонентов клетки, выделили редокс-биологию в качестве отдельной области научного знания. Доктор Britton Chance, создатель множества уникальных приборов, среди которых спектрофотометры с системой двойного луча («split beam» и «double beam» (dual wavelength) systems), впервые выявил редокс-состояния компонентов дыхательной цепи митохондрий [3]. В своей пионерской работе доктор Chance проводил исследования на препарате митохондрий, выделенных из сердец голубей. Впервые им было высказано предположение об утечке электронов с электрон-транспортной цепи с образованием пероксида водорода (H_2O_2) [4]. H_2O_2 является лишь одним из представителей активных форм кислорода (АФК). Утечки или целенаправленный перенос электронов на O_2 , а также последующие внутриклеточные превращения продуктов этих реакций, о которых мы и поговорим подробнее далее, приводят к образованию целого класса редокс-активных компонентов на основе кислорода, среди которых кроме H_2O_2 , в

биологических системах встречаются органические пероксиды (ROOH), синглетный кислород ($^1\text{O}_2$), супероксид анион радикал ($\text{O}_2^{\cdot-}$), гидроксильный радикал ($\cdot\text{OH}$), алкоксильный ($\text{RO}\cdot$) и пероксильный ($\text{ROO}\cdot$) радикалы. Доктор Chance вошел в историю одним из первых, кто обнаружил и признал важность АФК в биологии клетки.

С момента принятия того факта, что АФК образуются в клетке, их на протяжении долгого времени рассматривали исключительно в качестве повреждающих факторов, вызывающих окислительные повреждения многих молекул, что в результате и лежит в основе развития патологических процессов и старения. Официальное понятие окислительного стресса было введено в 80-х годах прошлого века [5]. Но с тех пор концепция окислительного стресса, рассматриваемого исключительно в контексте повреждающего фактора, претерпела кардинальную трансформацию [6–8].

Оказалось, что некоторые представители АФК, несмотря на свою высокую реакционную способность, могут селективно участвовать в регуляции физиологических процессов. История доказательств физиологической роли АФК тесно переплетена с работами еще одного основоположника современной редокс-биологии – доктора Helmut Sies. Исследуя состояние гемовой группы фермента каталазы в тканях печени крыс, доктор Sies доказал образование H_2O_2 при нормальном функционировании клеток, что, по словам самого автора, было «*в то время несколько еретической мыслью*» [9]. Однако эта без преувеличения гениальная работа была все же опубликована доктором Sies в соавторстве с уже упомянутым выше Britton Chance [10], что послужило фундаментом для дальнейших научных поисков. В 1979 Britton Chance и Helmut Sies опубликовали совместную обзорную статью, в которой представили схему образования АФК в разных внутриклеточных компартментах, а также отобразили на ней ферменты антиоксидантных систем, вовлеченных в их регуляцию (**рис. 1**) [11]. Удивительным образом предсказанная схема актуальна и по сей день, поскольку правильно отражает редокс-события и в свете процессов с уже доказанными механизмами.

Открытие все большего количества разных ферментативных систем, регулирующих уровень внутриклеточных АФК, еще больше укрепляло идею о возможной их роли в процессах нормально функционирующих клеток. Помимо каталазы, открытой еще в 1900 году исследователем Oscar Loew [12], в 50-х годах в клетках млекопитающих исследователем Gordon Mills обнаружена глутатионпероксидаза (Gpx) – еще один фермент, который тоже нейтрализует H_2O_2 [13,14]. В конце 60-х Irwin Fridovich и Joe McCord описывают фермент супероксиддисмутазу (SOD), катализирующую реакцию дисмутации $\text{O}_2^{\cdot-}$ в O_2 и H_2O_2 [15]. В 80-90-х открыто обширное семейство ферментов пероксиредоксинов (Prx), нейтрализующих в клетках пероксиды [16–19]. Параллельно с открытием

ферментативных систем, нейтрализующих АФК, обнаруживаются системы, которые, наоборот, участвуют в их продукции, в том числе регулируемой и направленной. Изначально такие системы были обнаружены в клетках, выполняющих защитную для организма функцию. Механизм целенаправленной продукции мощных окислителей характерен прежде всего для иммунных клеток, которые уничтожают чужеродные агенты путем их фагоцитирования. Внутри фагосомы происходит продукция мощных окислителей. Среди таких примеров ферментативного аппарата важно отметить миелопероксидазу [20,21] – гемовый фермент, который при наличии H_2O_2 окисляет ионы Cl^- до гипохлорит аниона (OCl^-) или по аналогии в этой же реакции образуются гипобромит анион (OBr^-), гипотиоционат ($OSCN^-$).

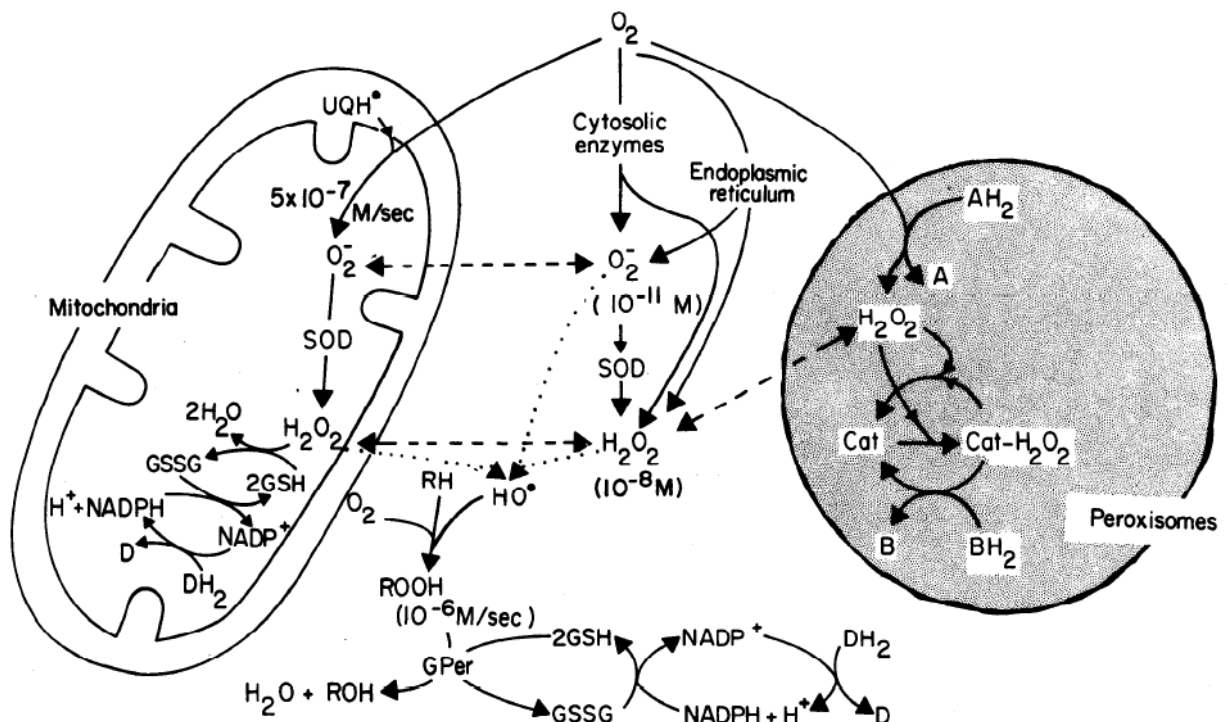


Рисунок 1. Общая схема роли каталазы, глутатионпероксидазы и супероксиддисмутазы в различных субклеточных локализациях. Оценены концентрации и скорости образования кислородных метаболитов. UQH^{\cdot} , убихиноновый радикал; GSSG, окисленный глутатион; GSH, восстановленный глутатион; DH_2 и D, неуставленная NADP восстанавливающая система; SOD, супероксиддисмутаза; NADPH и NADP, никотинамидадениндинуклеотидфосфат; $O_2^{\cdot-}$, супероксид анион; HO^{\cdot} , гидроксильный радикал; ROOH, алкилгидропероксид; GPer, глутатионпероксидаза; Cat, каталаза; B и BH_2 , доноры водорода, подходящие для каталазы, такие как этанол. Взято в оригинальном виде из [11].

Гемовые пероксидазы содержатся не во всех клетках, способных к фагоцитозу. При этом во всех фагоцитах были обнаружены представители уникального семейства мембранных белков – NADPH-оксидаз (NOX), которые переносят через мембрану электрон с NADPH на O_2 с образованием $O_2^{\cdot-}$ [22–24]. Вскоре после своего открытия NOX белки были

обнаружены повсеместно практически во всех типах клеток млекопитающих, причем большая часть из них не имеет никакого отношения к фагоцитозу [25–27]. Таким образом, АФК образуются в клетках разных типов не только в результате побочных продуктов реакции, например, при утечке электронов на разных уровнях дыхательной цепи, но и целенаправленно. Теперь известно, что для каждого типа клетки в ее физиологическом или патологическом состоянии уровень внутриклеточных АФК является результатом работы продуцирующих и нейтрализующих систем, отличающихся разнообразными механизмами.

В настоящее время никого не удивляет, что АФК участвуют в регуляции многочисленных биологических процессов. В клетках физиологический эффект АФК опосредован преимущественно через белки, вызывая модификации по их аминокислотным остаткам, что влияет на их функции. Аминокислотный остаток цистеина (Cys) в белках является одной из важнейших мишеней для редокс-регуляции, он подвергается различным модификациям, включая сульфенилирование и нитрозилирование, в некоторых случаях окисление Cys ведет к обратимому формированию внутри- и межмолекулярных дисульфидных связей. Именно тиол/дисульфидный обмен является наиболее распространенным и универсальным механизмом регуляции свойств многих белков, в том числе на уровне их взаимодействия друг с другом [28–32]. Хорошо изучены многочисленные примеры регуляции функций белков при их взаимодействии с H_2O_2 , который в настоящее время по праву причисляют к категории важнейших сигнальных молекул. Один из первых подробно описанных механизмов реакций данного типа представлен для тирозин-специфичных протеинфосфатаз. Взаимодействие этих ферментов с H_2O_2 и специфичное окисление определенных аминокислотных остатков активного центра приводит к ингибированию их функций [33,34]. Примечательно, что некоторые тирозин-специфичные протеинкиназы, напротив, активируются при взаимодействии с H_2O_2 , например, киназы семейства Src [35]. Многие другие киназы, например, представители MAPK семейства [36], среди которых p38, ERK, JNK, участвующие во многих внутриклеточных сигнальных каскадах, тоже активируются при повышении концентраций H_2O_2 [37–42]. Редокс-регуляция при участии H_2O_2 характерна не только для белков с ферментативной активностью, но и для других, например, транспортных каналов, среди которых рианодин-чувствительные каналы (RyR) [43], потенциал-зависимые калиевые каналы [44], различных факторов транскрипции [45], среди которых одним из первых изучен механизм редокс-переключения для белка OxyR [46]. Редокс-регуляция белков не ограничивается участием одного лишь H_2O_2 .

В 1980 году Robert Furchgott и его коллеги опубликовали работу об обнаружении некоего эндотелиального фактора релаксации неустановленной природы [47]. Позднее в

1987 году выяснили, что этим фактором оказался монооксид азота (NO) [48]. Это еще одно редокс-активное соединение с подтвержденной сигнальной функцией. Исследователям, проводившим эти работы, была присуждена Нобелевская премия по физиологии и медицине в 1998 году. Один из важнейших и первый из обнаруженных эффектов NO – стимуляция продукции cGMP в результате взаимодействия с гемовой гуанилатциклазой [49]. Позднее были обнаружены модификации многих внутриклеточных молекул, вызванные взаимодействием с NO , что расширило представление о регуляционной роли в клетке активных форм азота (АФА). Среди таких модификаций распространенным является нитрозилирование, которое может протекать по разным механизмам [50,51].

В начале нашего века постулируется концепция активных форм серы (АФС) [52]. Предпосылками в становлении этой концепции послужил ряд открытий в области исследований модификаций некоторых антиоксидантных белков по остаткам Cys. Так, в 2000 году была разрешена кристаллическая структура Prx с двумя остатками Cys из эритроцитов человек [53]. В этой работе было отмечено, что каталитический остаток Cys, участвующий во взаимодействии с H_2O_2 , окисляется до сульфеновой кислоты (R-S(=O)OH). В отличие от сульфеновой кислоты (R-S-OH), сульфеновая считалась на тот момент необратимой модификацией Cys в белках. Предполагалось, что белок с такой модификацией инактивируется в клетке в результате переокисления при взаимодействии с H_2O_2 или, возможно, как казалось на тот момент, такой модификации в биологической системе не существует. Вероятно, в эксперименте был получен артефакт, например, из-за длительной процедуры кристаллизации такого редокс-чувствительного белка. Однако в 2003 году команда под руководством Michael Toledano открывает новый класс антиоксидантных белков – сульфиредоксины (Srx) [54], которые АТФ-зависимым образом катализируют восстановление сульфеновой группы по остатку Cys. С этого открытия механизм обратимого переокисления Prx с его временной инактивацией расценивается частью сложной редокс-регуляции, построенной на обратной связи между Prx и Srx. Примерно в то же время, т.е. на рубеже веков, заново «переоткрывают» свойства сероводорода (H_2S) – газа, известного своей токсичностью для организма млекопитающих [55]. Однако уже в начале века становится известно, что H_2S образуется в тканях эндогенно и является важной сигнальной молекулой, выполняющей функции медиатора воспаления [56], нейротрансмиттера [57] и вазорелоксанта [58].

Активные формы азота и серы наряду с АФК существенно дополнили общую картину понимания происходящих в клетке редокс-процессов. Клетки поддерживают определенный внутриклеточный редокс-статус на уровне отдельных компартментов. Соответствующая редокс-среда в отдельном компартменте создает условия для протекания

необходимых процессов и обеспечивает их регуляцию. Это означает, что вызванные окислением модификации белковых молекул носят обратимый характер при нормальном функционировании клеток. Такая регуляция обеспечивается работой не только вышеупомянутых антиоксидантных белков, которые напрямую контролируют уровень редокс-активных соединений, но и функционированием систем, поддерживающих глобальный тиол/дисульфидный обмен клетки. Ключевыми являются глутатион- и тиоредоксин-зависимые системы, функции которых во многом перекрываются [59–61]. Белки глутаредоксины (Grx) и тиоредоксины (Trx) восстанавливают дисульфидные связи окисленных субстратов. При этом функционирование этих систем зависит от редокс-статуса глутатиона – еще одного важнейшего внутриклеточного редокс-параметра. Глутатион представляет собой распространенный в клетках большинства организмов трипептид γ -глутамилцистеинилглицин, именно тиоловая группа цистеина определяет свойства трипептида. В клетках глутатион пребывает как в восстановленной форме (GSH), так и окисленной (GSSG). Концентрационное соотношение восстановленной формы к окисленной (2GSH/GSSG) общего пула глутатиона определяет редокс-статус всей системы, это может быть отдельный внутриклеточный компартмент или вся клетка в целом. Глутатион выступает в роли главного редокс-буфера внутриклеточной среды, что достигается его высокими концентрациями в клетке в пределах нескольких мМ [62,63]. Часть ферментов клеточного аппарата используют в катализируемых реакциях GSH напрямую, по такому принципу Grx нейтрализуют H_2O_2 и органические пероксиды [64]. Другой пример – окисленные Grx, которые также восстанавливаются напрямую за счет GSH. Однако есть белки, редокс-регуляция которых опосредована вспомогательными белками. Например, для восстановления Trx необходим специальный фермент тиоредоксинредуктаза (TrxR), обеспечивающий восстановление Trx с использованием восстановительных эквивалентов NADPH. В ходе многочисленных редокс-реакций в клетках постоянно тратится пул восстановленного GSH с образованием GSSG. Поддержание необходимого соотношения 2GSH/GSSG обеспечивает фермент глутатионредуктаза (GR), использующая кофакторы NADPH и FAD [65].

Таким образом, редокс-регуляция клетки представляет собой обширную сеть взаимодействующих реакций. Редокс-активные соединения образуются в клетке не только в результате патологических процессов или естественных процессов старения, но и в норме. В связи с этим, концепция окислительного стресса должна была быть пересмотрена. Так, по словам Helmut Sies, одного из основоположников современной системы редокс-биологии, сам термин «окислительный стресс» не отражает или даже вовсе искажает реальную картину редокс-событий. Гораздо важнее отмечать изменение редокс-состояния

системы на уровне конкретных молекулярных процессов. Например, клетки не всегда подвергаются разрушительному действию окислительного стресса, но при некоторых условиях в них отмечается повышенная продукция H_2O_2 , направленного на активацию сигнальных каскадов. Аналогичная ситуация в неточной передаче смысла наблюдается в употреблении и других общих терминов. Например, употребление термина АФК в свете современной концепции не передает точного смысла происходящих процессов. При определенном внутриклеточном событии следует отмечать производство и эффект конкретного окислителя, участвующего в этом процессе, а не использовать общий термин, который отражает целый класс соединений с разными химическими свойствами и функциями в клетке [66].

Было предложено внедрить термин для обозначения «физиологического» окислительного стресса, отражающего редокс-события в клетке, которые строго регулируются и необходимы для поддержания внутриклеточных функций [67]. В 2017 году Helmut Sies ввел термин «окислительного эустресса» (*oxidative eustress*) [68]. Таким образом, *окислительный эустресс* отражает продукцию и поддержание редокс-активных компонентов в диапазоне низких концентраций, необходимых в клетке для специфичной редокс-регуляции многочисленных сигнальных каскадов. *Окислительный стресс* отныне принято считать дисбалансом между прооксидантами и антиоксидантами в пользу первых, что приводит к их неконтролируемому образованию, взаимодействию с различными внутриклеточными мишенями и, в конечном итоге, их повреждению. На **рисунке 2** представлен пример участия H_2O_2 в окислительном эустрессе и окислительном стрессе. Считается, что физиологический уровень H_2O_2 в клетках колеблется в диапазоне 1 – 10 нМ. При концентрациях от 100 нМ в клетках запускаются стресс-реакции и механизмы адаптации к ним, это состояние уже характеризует развитие окислительного стресса. На данном этапе антиоксидантные механизмы клетки направлены на защиту клетки и предотвращают масштабное окисление. Однако дальнейшее усиление окислительного стресса неминуемо приводит к необратимым повреждениям различных молекул, что, в конечном результате, завершается клеточной гибелью [68]. Подобную схему можно привести для любого из ключевых редокс-компонентов клеток.

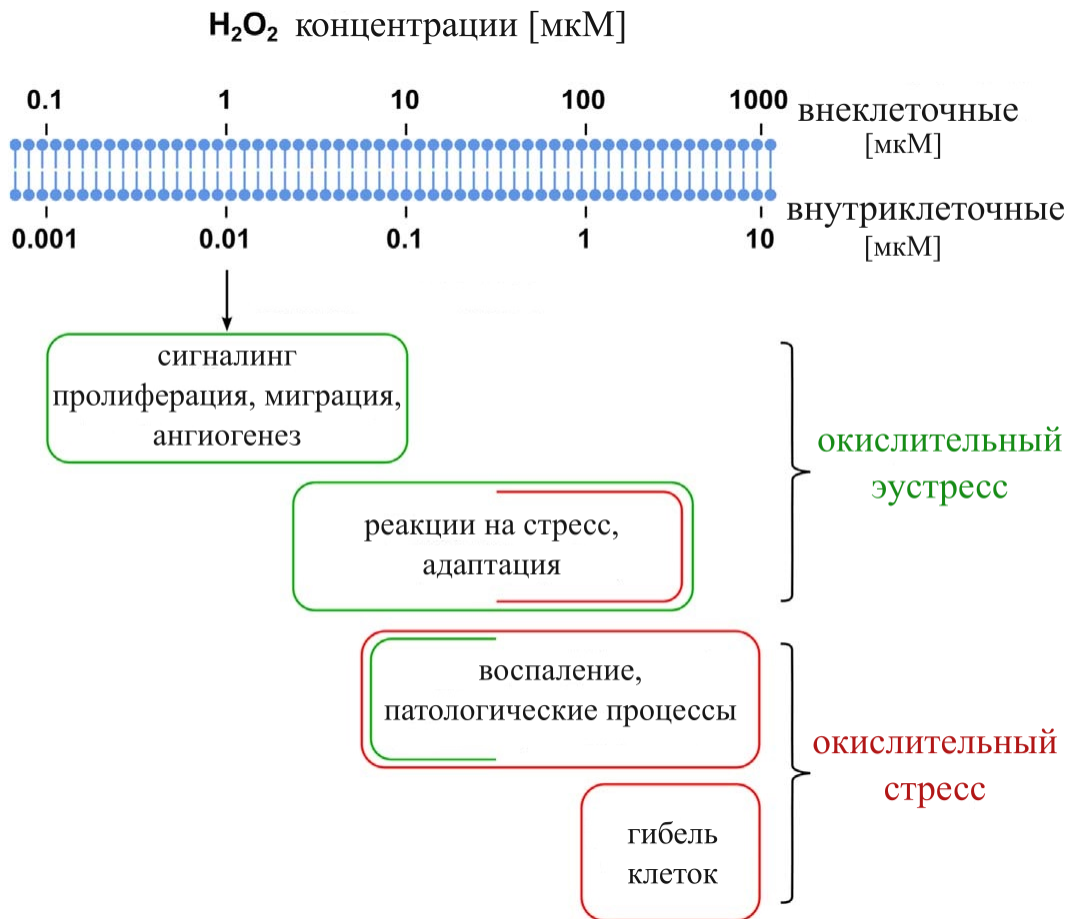


Рисунок 2. H_2O_2 в контексте окислительного эустресса и окислительного стресса. Зеленые и красные рамки обозначают условно полезные и вредоносные для клетки реакции. Приблизительно 100-кратный мембранный градиент концентрации H_2O_2 представлен для примера; этот параметр варьирует у разных типов клеток, в том числе зависит от активности их антиоксидантных систем. Адаптировано из [68].

Подводя итог, при глобальном рассмотрении структуры клеточной редокс-системы можно выделить следующие основные блоки: 1) универсальные редокс-активные компоненты, которые участвуют в многочисленных внутриклеточных реакциях и имеют множество мишеней. Это прежде всего низкомолекулярные соединения с высокой реакционной способностью, главные среди которых активные формы кислорода, азота, серы, галогенов; 2) генераторы этих редокс-активных компонентов, среди них как специализированные ферменты (например, NADPH-оксидазы, гемовые пероксидазы, NO-синтазы), так и системы, которые продуцируют такие соединения в качестве побочных продуктов основных реакций (например, комплексы дыхательной цепи митохондрий, ксантиноксидазы, оксидазы D-аминокислот); 3) многочисленные макромолекулярные мишени, участвующие в редокс-преобразованиях, их свойства и функции обратимо меняются при специфичных модификациях в ходе окислительного эустресса. При окислительном стрессе взаимодействия редокс-активных компонентов с внутриклеточными системами носят неспецифичный и необратимый характер, вызывая

развитие патологических процессов и гибель клеток; 4) антиоксидантные системы (например, супероксиддисмутазы, пероксиредоксины, каталазы, глутатионпероксидазы, тиоредоксин и тиоредоксинредуктазы, глутаредоксины, сульфуредоксины) обеспечивают внутриклеточный контроль редокс-активных компонентов в клетках, защищают клетки от последствий окислительного стресса. К антиоксидантным системам относится глутатион – главный редокс-буфер многих клеток, а также различные антиоксиданты небелковой природы (например, аскорбат, каротиноиды, антоцианы, полифенолы); 5) в глобальном смысле редокс-биология охватывает все системы, участвующие в реакциях, которые сопровождаются переносом электронов (например, обширный класс оксидоредуктаз); 6) универсальные редокс-кофакторы (NAD, NADP, FMN, FAD) и системы, регулирующие их редокс-баланс.

1.1.2. Активные формы кислорода (АФК)

АФК являются наиболее изученным классом низкомолекулярных редокс-активных соединений. Все виды АФК образуются из молекулярного O_2 в результате редокс-реакций. АФК разнообразны по своему составу и свойствам. Время жизни их существования в клетке может варьировать от 10^{-9} секунд до нескольких единиц секунд. Для разных представителей АФК характерен и свой набор внутриклеточных мишеней от белковых молекул (модификации по остаткам Cys, Met, Trp, Tug, взаимодействия с Fe в составе гемовых групп и Fe-S кластеров) до молекул липидов и нуклеиновых кислот (ДНК, РНК).

Среди АФК существуют как свободные радикалы, так и соединения нерадикальной природы. Свободные радикалы содержат на внешнем орбитальном уровне неспаренный электрон, поэтому относятся к одноэлектронным окислителям. Наличие неспаренного электрона свободных радикалов определяет их свойства, в результате они отличаются низкой стабильностью и высокой реакционной способностью, запуская цепные реакции с внутриклеточными мишенями различной природы. Свободные радикалы, которые в живых системах чаще образуются именно с участием O_2 , часто реагируют со стабильными молекулами, у которых отсутствуют неспаренные электроны. Однако при взаимодействии радикала с какой-либо молекулой с образованием ковалентной связи приводит к тому, что молекула-мишень теряет электрон и сама становится радикалом. Так запускается цепочка реакций с участием радикалов. Происходит именно передача, поскольку не происходит увеличения количества радикалов по сравнению с исходными, которые инициировали процесс. По такому механизму, например, протекает перекисное окисление липидов. Этот процесс, обеспечиваемый одноэлектронными окислителями, протекает до тех пор, пока не

происходит обрыва цепи реакции. В этом случае образуются ковалентные связи без образования радикалов, что приводит к их уменьшению в системе. Это происходит, например, когда радикал взаимодействует с другим радикалом или с молекулой с антиоксидантными свойствами, такими как аскорбат или флавоноиды. Реакционную способность свободного радикала лучше всего охарактеризовать величиной его одноэлектронного восстановительного потенциала (E^0), который отражает его способность принимать электрон и, в результате, возможность быть восстановленным [69]. Основными свободными радикалами из класса АФК являются супероксид анион радикал ($O_2^{\cdot-}$), гидроксильный радикал ($\cdot OH$), алкоксильный ($RO\cdot$) и пероксильный ($ROO\cdot$), наиболее реакционноспособным является $\cdot OH$. В **таблице 1** приведены данные для наиболее распространенных свободных радикалов клетки.

Таблица 1. Относительная реакционная способность распространенных внутриклеточных свободных радикалов [69]

Оценка реакционной способности произведена на основе сравнительного анализа значений восстановительного потенциала. Значения стандартного восстановительного потенциала (E^0) даны при pH 7,0. Обозначения: $PhO\cdot$ - феноксильный радикал, $SQ^{\cdot-}$ - семихинон. $O_2^{\cdot-}$ находится в равновесии (pK_a 4,8) с гидропероксильным радикалом (HO_2^{\cdot} ; $E^0 = 1,06$ В) и $O_2/O_2^{\cdot-}$ ($E^0 = -0,16$ В для 1 М кислорода).

Радикал	Восстановительный потенциал (В), pH 7
$\cdot OH, H^+/H_2O$	2,31
$CO_3^{\cdot-}$	1,78
$RO\cdot$	~1,60
$\cdot NO_2$	1,04
$O_2^{\cdot-}/2H^+/H_2O_2$	0,94
$PhO\cdot, H^+/PhOH$	0,90
$ROO\cdot, H^+/ROOH$	0,77–1,44
Катехол $SQ^{\cdot-}, H^+/катехол$	0,53
$\cdot NO$	-0,80

К двух-электронным окислителями из класса АФК, которые по своей природе не являются радикалами, относятся: пероксид водорода (H_2O_2) – важная редокс-сигнальная молекула; органические гидропероксиды ($ROOH$), которые образуются, например, в результате перекисного окисления полиненасыщенных жирных кислот; синглетный кислород (1O_2), представляющий электронно-возбужденную форму обычного O_2 и, следовательно, более высокоэнергетическую [70]. 1O_2 сильный окислитель и способен вызывать модификации, нарушая свойства многих молекул, включая белки, нуклеиновые кислоты и липиды [70]. Воздействие 1O_2 на внутриклеточные мишени неспецифично, как правило, значительное производство и выраженный эффект может достигаться в тканях, подверженных воздействию света, например, в поверхностных тканях кожи и глаза. Также

к рассматриваемой категории АФК можно отнести озон (O_3), который является сильным окислителем, вызывающим окислительный стресс при взаимодействии с клетками, однако на данный момент неизвестно об его эндогенном образовании в организме.

АФК образуются в клетках постоянно при физиологических условиях как целенаправленно, так и в качестве побочных продуктов реакции. Поддержание их уровня в диапазонах концентраций, безопасных для конкретной клетки, обеспечивается различными механизмами, которые направлены на 1) регуляцию образования АФК; 2) регуляцию доступности их потенциальных мишеней; 3) своевременное превращение их в менее реакционноспособные компоненты за счет работы антиоксидантных систем. В случае сбоя одного из этих механизмов и нарушение равновесия в сторону прооксидантов приводит к развитию окислительного стресса.

Прежде, чем рассмотреть отдельные свойства представителей АФК и взаимодействующие с ними системы, поговорим об их источниках возникновения в клетках. Различные виды АФК преобразуются друг в друга, однако образующими АФК семейство можно считать $O_2^{\cdot-}$ и H_2O_2 . Основными генераторами АФК в клетках считают ферменты NADPH-оксидазы и комплексы дыхательной цепи митохондрий. Кроме того, на сегодняшний день известно около 40 ферментативных систем, функционирование которых приводит к генерации $O_2^{\cdot-}/H_2O_2$ (таблица 2).

$O_2^{\cdot-}$ образуется в результате одноэлектронного восстановления O_2 , что обеспечивает заряд -1 . Универсальными одноэлектронными донорами в клетках являются молекулы NADPH и NADH, чаще всего именно с них электрон через посредников сбрасывается на O_2 . Универсальность этих переносчиков восстановительных эквивалентов обеспечивает возможность участия разных ферментативных систем в этом процессе.

Утечка электронов с образованием $O_2^{\cdot-}$ происходит на разных уровнях дыхательной цепи митохондрий. NADH является ключевым поставщиком электронов для электрон-транспортной цепи митохондрий на уровне NADH-дегидрогеназного комплекса (комплекс I). Комплекс I принимает электроны от NADH на кофактор FMN, передавая их затем через последовательность из семи Fe-S кластеров до места связывания и восстановления коэнзима Q [72,73]. Эти семь центров с Fe-S кластерами хорошо закрыты структурой комплекса и поэтому ограничены от доступа O_2 в отличие от сайтов, связывающих FMN и коэнзим Q [73]. Образование $O_2^{\cdot-}$ происходит при взаимодействии O_2 с восстановленным FMN, редокс-статус которого в комплексе I напрямую зависит от соотношения $NAD^+/NADH$ [74].

Таблица 2. O_2^-/H_2O_2 образующие ферментативные системы в клетках человека.
 Создано на основе [71] с изменениями и дополнениями. В таблицу не включены белки, для которых еще недостаточно известно об их значимой для клетки роли в продукции АФК. Так, например, для некоторых отмечена очень низкая скорость образования АФК (некоторые цитохромы P450, гемоглобины).

Название фермента	Локализация	Продукт
Альдегидоксидаза	цитоплазма	H_2O_2
пиридоксин-5'-фосфат оксидаза	цитоплазма	H_2O_2
Флавин-содержащая аминоксидаза А	митохондрии	H_2O_2
Флавин-содержащая аминоксидаза В	митохондрии	H_2O_2
Сульфитоксидаза	митохондрии	H_2O_2
Супероксиддисмутаза [Mn]	митохондрии	H_2O_2
Цитохром P450 3A4	ЭПР	O_2^-/H_2O_2
Цитохром P450 2D6	ЭПР	O_2^-/H_2O_2
Цитохром e P450 2E1	ЭПР, митохондрии	O_2^-/H_2O_2
Цитохром P450 4A11	ЭПР	O_2^-/H_2O_2
Ero1-подобный белок- α	ЭПР	H_2O_2
Ero1-подобный белок- β	ЭПР	H_2O_2
Сульфгидрилоксидаза 1	Аппарат Гольджи	H_2O_2
Мембранная первичная аминоксидаза	Плазматическая мембрана	H_2O_2
NADPH-оксидаза 1	Плазматическая мембрана	O_2^-
NADPH-оксидаза 2	Плазматическая мембрана	O_2^-
NADPH-оксидаза 3	Плазматическая мембрана	O_2^-
NADPH-оксидаза 4	Плазматическая мембрана, ЭПР, ядро	O_2^-
NADPH-оксидаза 5	ЭПР	O_2^-
Dual оксидаза 1	Плазматическая мембрана	O_2^-
Dual оксидаза 2	Плазматическая мембрана	O_2^-
Оксидаза L-аминокислот	Лизосома	H_2O_2
Пренилцистеиноксидаза 1	Лизосома	H_2O_2
Оксидаза D-аминокислот	Пероксисома	H_2O_2
Оксидаза D-аспартата	Пероксисома	H_2O_2
Гидроксикислотная оксидаза 1	Пероксисома	H_2O_2
Гидроксикислотная оксидаза 2	Пероксисома	H_2O_2
Пероксисомальный N ¹ -ацетилспермин/спермидиноксидаза	Пероксисома, цитоплазма	H_2O_2
Ацил-КоА-оксидаза 1	Пероксисома	H_2O_2
Ацил-КоА-оксидаза 3	Пероксисома	H_2O_2
Саркозиноксидаза	Пероксисома	H_2O_2
[Cu] аминоксидаза сетчатки	Плазматическая мембрана, цитоплазма	H_2O_2
Сперминоксидаза	Цитоплазма, ядро	H_2O_2
Супероксиддисмутаза [Cu-Zn]	Цитоплазма, ядро, митохондрии	H_2O_2
FAD-связывающая сульфгидрилоксидаза	Цитоплазма, митохондрии, секреторируемая	H_2O_2
Сульфгидрилоксидаза 2	Ядро, плазматическая мембрана, секреторируемая	H_2O_2
Ксантиндегидрогеназа/оксидаза	Цитоплазма, плазматическая мембрана, секреторируемая	H_2O_2
Супероксиддисмутаза [Cu-Zn]	плазматическая мембрана, секреторируемая	H_2O_2
Амилоридчувствительная аминоксидаза [Cu]	Секреторируемая	H_2O_2
Лизилоксидаза	Секреторируемая	H_2O_2
Пренилцистеиноксидазоподобный белок	Секреторируемый	H_2O_2

Сброс электронов может происходить также на уровне сайта коэнзима Q [75]. Примечательно, что $O_2^{\cdot-}$ может появляться на комплексе I в результате не только прямого транспорта электронов от NADH к коэнзиму Q, но и при обратном [76]. Образованный комплексом I $O_2^{\cdot-}$ высвобождается в матриксе митохондрий.

Комплекс III является еще одним потенциально возможным источником $O_2^{\cdot-}$ в дыхательной цепи митохондрий. Этот комплекс ответственен за перенос электронов от восстановленного пула коэнзима Q на цитохром *c*. Комплекс состоит из 11 белковых субъединиц и в общей сложности содержит три гемовые группы с разными свойствами, а также Fe-S центр. В ходе так называемого Q-цикла комплекс III взаимодействует по сайтам Q_i и Q_o с восстановленным коэнзимом Q [77]. При достаточном количестве восстановленного пула коэнзима Q и при ингибировании комплекса III антимицином на уровне сайта Q_i происходит продукция $O_2^{\cdot-}$ в результате взаимодействия O_2 с семихиноном, связанным с сайтом Q_o [78,79]. Высвобождение $O_2^{\cdot-}$ возможно в обе стороны от внутренней митохондриальной мембраны [80]. Однако считается, что при нормальном функционировании митохондрий в отсутствие соответствующих ингибиторов продукция $O_2^{\cdot-}$ комплексом III мала по сравнению с комплексом I [81].

Сукцинатдегидрогеназа или комплекс II, состоящий из 4 субъединиц, катализирует реакцию окисления сукцината до фумарата и является дополнительной точкой входа электронов в дыхательную цепь, передавая их от сукцината до пула коэнзима Q через кофактор FAD и цепь из трех Fe-S кластеров [82–84]. $O_2^{\cdot-}$ образуется в комплексе II в его сайте связывания FAD, поскольку эта часть комплекса расположена ближе к матриксу, то $O_2^{\cdot-}$ попадет исключительно внутрь митохондрии [85]. Продукция $O_2^{\cdot-}$ существенно падает, если сайт связывания FAD заблокирован субстратом, ограничивающим доступ сайта к O_2 [82]. Комплекс II также осуществляет обратный поток электронов, который усиливается при некоторых патологических состояниях и приводит к увеличению продукции $O_2^{\cdot-}$. В частности, при ишемии тканей происходит накопление сукцината из-за обратимой работы сукцинатдегидрогеназы, чему способствует увеличение фумарата в результате распада пуриновых нуклеотидов. Однако при реперфузии ткани накопленный сукцинат очень быстро вновь окисляется, что в итоге приводит к избыточному потоку электронов на комплекс I с образованием $O_2^{\cdot-}$ [86].

Комплекс IV, представляющий собой цитохром *c* оксидазу, обеспечивает перенос электронов от цитохрома *c* на конечный акцептор электронов O_2 с образованием H_2O . Комплекс IV состоит из 13 субъединиц и содержит 4 металлсвязывающих центра: Cu_A , гем *a* (Fe_a) и биядерный центр ($Fe_{a3}-Cu_B$), состоящий из гема *a3* и атома меди Cu_B [87]. В механизме работы комплекса IV вероятность образования $O_2^{\cdot-}$ очень мала. В произвольном

порядке связанный O_2 в результате конформационных перестроек комплекса получает восстановительные эквиваленты от Cu^{1+} , Fe^{3+} и гидроксильной группы Tyr244, что обеспечивает сразу полное восстановление O_2 [88].

На рисунке 3 представлена схема митохондриальной электрон-транспортной цепи с возможными сайтами утечки электронов с образованием $O_2^{\cdot-}$. Однако к образованию $O_2^{\cdot-}$ в митохондриях ведет работа не только дыхательной цепи. Ряд митохондриальных ферментов, например, α -кетоглутаратдегидрогеназа [89], α -глицерофосфатдегидрогеназа [90], дигидро-оротатдегидрогеназа [91] и другие могут образовывать $O_2^{\cdot-}$ в качестве побочных продуктов. В настоящий момент не для всех потенциально возможных $O_2^{\cdot-}$ -продуцирующих систем можно оценить их реальный вклад в редокс-регуляцию клетки.

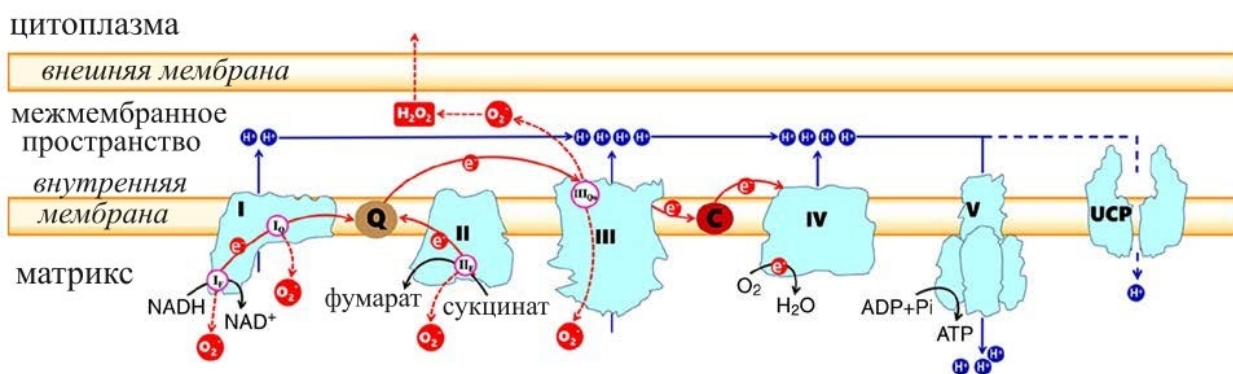


Рисунок 3. Схема дыхательной цепи митохондрий эукариот. Электроны поступают в электрон-транспортную цепь на уровне I или II комплексов. В ходе энергетически выгодного переноса электронов (красные стрелки) выделяющаяся энергия используется для создания градиента H^+ при переносе через внутреннюю мембрану (синие стрелки), который затем использует АТФ-синтаза для производства в клетке АТФ. Черные стрелки обозначают катализируемые комплексами реакции. Q – коэнзим Q (убихинон); C – цитохром c; UCP – разобщающий белок (uncoupling protein), сбрасывающий H^+ без синтеза АТФ, преобразуя накопленную энергию в тепло. На изображениях комплексов отмечены возможные сайты образования $O_2^{\cdot-}$. Адаптировано с изменениями из [75].

Непростой задачей является оценка реального вклада всех митохондрий в продукцию $O_2^{\cdot-}$ на уровне всей клетки. Утверждение о том, что митохондрии являются основными источниками образования АФК в клетке, до сих пор активно обсуждается. По некоторым сведениям, при физиологических условиях от 0,2% до 2% электронов, поступающих в дыхательную цепь, может быть задействовано в образовании АФК в результате утечек [11,92]. Очевидно, что этот показатель должен зависеть от типа клеток и их состояния. Однако при оценке таких параметров важно учитывать и в какой системе проводятся измерения: в системе *in vitro* или *in vivo*.

И все же $O_2^{\cdot-}$, который образуется митохондриями, представляет собой побочный продукт реакций, обеспечивающих глобальный процесс дыхания митохондрий. Однако в

разнообразных клетках эукариот присутствует семейство белков, функция которых заключается в направленной генерации $O_2^{\cdot-}$. Это семейство мембранных белков NADPH-оксидаз (NOX), они осуществляют трансмембранный перенос электронов на O_2 , используя в качестве донора восстановительных эквивалентов NADPH. Во многих клетках при определенных процессах именно NOX считают основным источником образования $O_2^{\cdot-}$.

Первый представитель семейства NOX был найден и описан в клетках-фагоцитах. Образующийся в результате работы NOX $O_2^{\cdot-}$ важен для создания окислительного стресса, направленного на нейтрализацию фагоцитируемых чужеродных агентов. Образование $O_2^{\cdot-}$ происходит в фagosоме. Следует отметить, что направленное формирование окислительного стресса или, как его еще называют дыхательного взрыва, в фагоцитирующих клетках было описано еще до самого открытия белков NOX [93,94]. Предпосылками открытия нового класса белков послужили исследования механизма патогенеза редкого заболевания человека – хронического грануломатоза. У таких пациентов лейкоциты сохраняют способность к таксису, фагоцитированию и дегрануляции, однако в фagosомах не развивается дыхательный взрыв [95,96]. Из-за нарушений работы иммунитета пациенты страдают от инфекционных заболеваний. В 1978 году Segal и Jones выяснили, что нейтрофилы таких пациентов отличаются дефицитом некоего мембранного белкового комплекса [97], в дальнейшем ему неоднократно присваивали различные названия (флавоцитохром b₂₄₅, b₅₅₈, gp91^{phox} и, наконец, NOX2). Было показано, что данный белковый комплекс содержит два гема и связывает кофактор FAD. Однако позднее было обнаружено, что данный комплекс устроен сложнее и помимо части, организованной в мембране, имеет несколько регуляторных элементов, расположенных в цитозоле (p47^{phox}, p67^{phox}, p40^{phox}). Вдобавок к этому, в работе комплекса было доказано участие GTP-связывающих белков [98–100] (**рис. 4**). Этот комплекс находится в сборке непостоянно, а лишь при активации. В литературе встречается, что название NOX относится как ко всему комплексу в целом, так и исключительно по отношению к каталитической части. При активации, вызванной, например, бактериальной инфекцией, неактивный мембранный гетеродимер, состоящий из NOX2 (он же gp91^{phox}) и p22^{phox}, взаимодействует с регуляторными элементами со стороны цитозоля. Причем за взаимодействия с регуляторными элементами отвечает именно p22^{phox}. Для взаимодействия p22^{phox} с p47^{phox} необходимы конформационные переходы последнего, регулируемые через фосфорилирование. На заключительном этапе к комплексу присоединяется GTP-аза Rac [101,102]. На **рисунке 4** представлена схема сборки активированного комплекса NOX2.

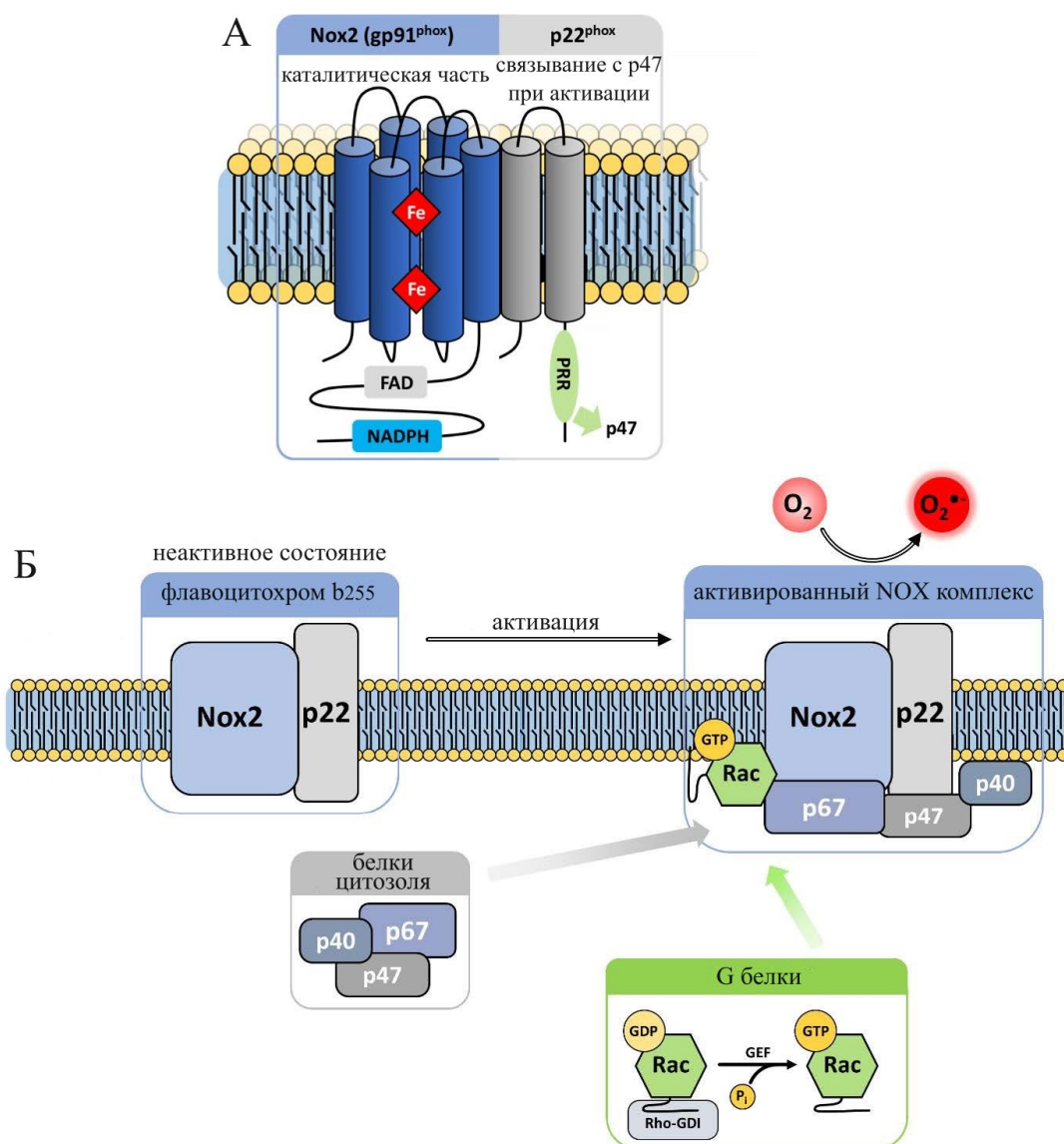


Рисунок 4. Организация комплекса NOX2. (А) Каталитическая часть комплекса содержит 6 трансмембранных спиралей, His остатки на 3-й и 5-й спиралей участвуют в формировании гемовых групп типа *b*. Цитозольная часть связывает FAD и NADPH. Точное количество трансмембранных элементов для регуляторного комплекса $p22^{phox}$ к настоящему времени не определено, на рисунке отмечено двумя спиральями. Цитозольная часть комплекса PRR (proline-rich region), богатая Pro, взаимодействует с регуляторным фактором $p47^{phox}$.

(Б) Схема процесса активации NOX2. Сигнальные пути, запущенные, например, фагоцитированием лейкоцитом чужеродного агента, приводят к фосфорилированию цитозольного фактора $p47^{phox}$, что приводит к его транслокации и связыванию с $p22^{phox}$. Одновременно с этим на комплексе собираются $p67^{phox}$ и $p40^{phox}$. На стадии окончательной сборки активированного комплекса присоединяется GTP-связывающий белок Rac, после этого начинается производство $O_2^{\bullet -}$. Адаптировано из [26].

Активный комплекс NOX2 осуществляет транспорт электронов через мембрану. Процесс инициируется переносом H^- от NADPH в цитозоле на FAD, далее происходит перенос электрона с восстановленного FAD на внутренний гем, образуется семихинон-радикал. Электрон от внутреннего гема переходит на внешний и далее на финальный

акцептор O_2 с образованием $O_2^{\cdot-}$. Освободившийся внутренний гем готов вновь принять электрон от семихинон-радикала, далее цикл повторяется [27,103].

Открытие внутриклеточного комплекса, который целенаправленно производит АФК в фагоцитирующих клетках, не вызвал сильного удивления у научного сообщества. Поскольку основной задачей таких клеток является борьба с патогенами, то использование АФК в качестве повреждающего фактора является вполне надежным подходом для этой цели [23]. Однако чуть позднее аналогичные комплексы стали находить в других типах клеток, причем не имеющих отношения к иммунной системе. Гомологи NOX2 встречаются не только в разных тканях у человека, но и других организмах, включая позвоночных и беспозвоночных животных, а также в растениях, грибах [104,105].

Вслед за открытием NOX2 несколько научных групп одновременно обнаружили гомолог, который, согласно современной номенклатуре, носит название NOX1 [106–108]. NOX1 встречается в клетках различных тканей человека, например, в толстом кишечнике [106,109], в клетках кровеносных сосудов [106,110,111], предшественниках остеокластов [112] и других. Во внутреннем ухе была обнаружена экспрессия гена третьего гомолога, получившего название NOX3, показана роль этого комплекса в работе вестибулярного аппарата [113]. NOX1-3 очень близки по организации структуры комплекса (**рис. 5**). Точно также, как и для NOX2, для активации NOX1 и NOX2 требуется присутствие цитозольных элементов, которые назвали NOXO1 и NOXA1 [114]. Примечательно, что в условиях *in vitro* цитозольные регуляторы NOX2 p47^{phox} и p67^{phox} могут заменить NOXO1 и NOXA1 для сборки и активации NOX1 и NOX2 [114,115]. Таким образом, изоформы NOX1-3 не специфичны по отношению к их цитозольным регуляторам.

Во многих тканях была обнаружена экспрессия NOX4. Особенно высокий уровень отмечен для тканей почек, но комплекс содержится также в фибробластах, эндотелиальных клетках, остеокластах, нейронах [27,116]. NOX4 довольно сильно отличается от NOX1-3, однако для его функционирования также необходим мембранный регуляторный компонент p22^{phox} [117]. Особенностью NOX4 является отсутствие привычных дополнительных регуляторов, расположенных в цитозоле и необходимых для сборки активного комплекса, как у NOX1-3. Однако с NOX4 колокализуются другие белки, в частности, протеиндисульфидизомераза и фактор Poldip2, предполагают, что они могут участвовать в регуляции комплекса [118,119].

Не требуется привычных для NOX1-3 цитозольных регуляторов и для активности еще одного найденного гомолога – NOX5, который был обнаружен в селезенке, семенниках, почках, а также в кардиомиоцитах и клетках сосудов [120–122]. Для комплекса NOX5 также не характерно наличие p22^{phox}, но при этом на N-конце расположен домен,

содержащий 4 EF-мотива для связывания Ca^{2+} . Таким образом, активация NOX5 является Ca^{2+} -зависимой [123,124].

Двойные оксидазы DUOX1 и DUOX2 являются еще одними представителями семейства NOX. Их обнаружили в клетках щитовидной железы при изучении в них NADPH и Ca^{2+} -зависимой продукции АФК [125]. Для DUOX помимо каталитического трансмембранного центра, как у всех NOX, и домена с Ca^{2+} -связывающими EF-мотивами, как у NOX5, характерно наличие внеклеточного пероксидаз-подобного домена, который связан с основным комплексом через дополнительную трансмембранную спираль [27,126–128]. DUOX комплексы в эндоплазматическом ретикулуме находятся в неактивном состоянии, для активации им необходимы факторы DUOXA1 или DUOXA2, после чего происходят конформационные перестройки и определенные посттрансляционные модификации, что приводит к транслокации комплексов в плазматическую мембрану и их активации [129,130].

Таким образом, NOX разнообразны по своему строению. На **рисунке 5** отражены особенности представителей этого семейства. Для NOX белков характерны тонкие механизмы регуляции, причем отличающиеся у разных типов. Посттрансляционные модификации по разным мишеням, наличие дополнительных регуляторных элементов, сборка активных комплексов в несколько этапов – все эти механизмы позволяют строго контролировать функцию NOX по направленной продукции $\text{O}_2^{\cdot-}$ в клетке. NOX распространены повсеместно в разных типах клеток и на разных мембранах: не только на плазматической, но и внутриклеточных компартментов. Начали появляться работы, подтверждающие наличие аналогов NOX у прокариот [131]. В некоторых работах можно встретить информацию о том, что NOX4, DUOX1/2 образуют не $\text{O}_2^{\cdot-}$, а сразу H_2O_2 [132,133]. Однако переход двух электронов с гемовой группы на O_2 маловероятен, поэтому все же продуктом реакции NOX считают $\text{O}_2^{\cdot-}$, который разными путями дисмутирует в H_2O_2 .

Случайно из-за утечек электронов или целенаправленно в клетках непрерывно происходит образование $\text{O}_2^{\cdot-}$ – предшественника всех остальных АФК. $\text{O}_2^{\cdot-}$ является довольно слабым радикалом ($E^0(\text{O}_2^{\cdot-}/\text{H}_2\text{O}_2) \sim 0,9 \text{ В}$ [134]), при этом он несет заряд аниона, что ограничивает его диффузию в живых системах. Наиболее предпочтительными мишенями для $\text{O}_2^{\cdot-}$ являются белки, содержащие в каталитических центрах переходные металлы, главным образом, мишенями выступают Fe-S кластеры белков. Примерами являются аконитаза [135], гуанилатциклаза [136], протеинфосфатаза 2В [137], бактериальный фактор транскрипции SoxR [138]. При взаимодействии $\text{O}_2^{\cdot-}$ с Fe-S кластерами происходит их окисление, такие окисленные кластеры отличаются меньшей стабильностью, что приводит к их разрушению и высвобождению Fe^{2+} [139], который, в

свою очередь, в клетке может вступить в дальнейшие редокс-реакции. Например, особенную опасность для внутриклеточного окружения представляет реакция Fenton, о которой речь пойдет далее. Интересно, что даже такой неспецифичный механизм окисления в некоторых белках используется в качестве редокс-регулятора. Наиболее известным примером является бактериальный белок SoxR, который определяет транскрипционный ответ клетки в условиях окислительного стресса. [2Fe–2S] кластер этого белка может обратимо окисляться, причем окисленное ($\text{Fe}^{3+}\text{--Fe}^{3+}$) и восстановленное ($\text{Fe}^{2+}\text{--Fe}^{3+}$) состояния белка сопровождаются конформационными переходами в структуре, что влияет на ДНК-связывающую способность этого белка [140].

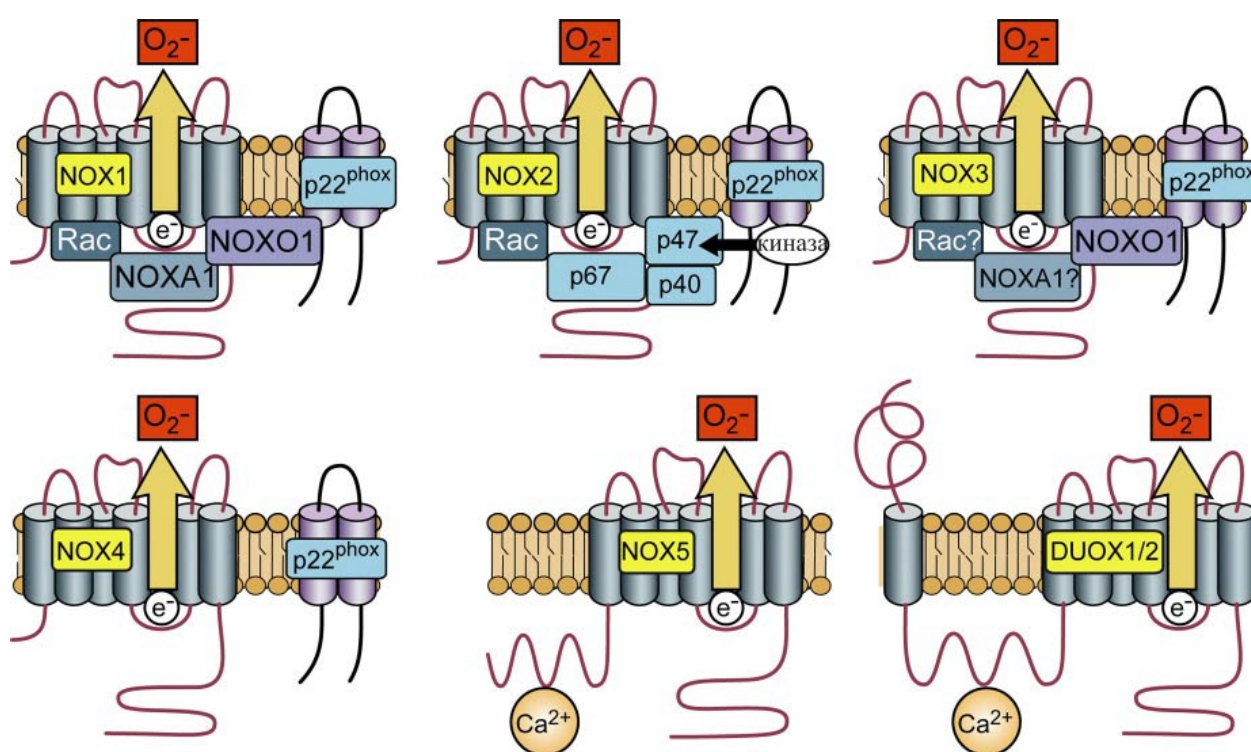
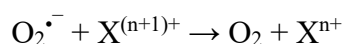


Рисунок 5. Структурные особенности NADPH-оксидаз (NOX). Для активации *NOX1* необходимы *p22^{phox}*, *NOXO1*, *NOXA1*, малая GTPase *Rac*; для активации *NOX2* – *p22^{phox}*, *p47^{phox}*, *p67^{phox}* и *Rac*; *NOX3* – *p22^{phox}* и *NOXO1*, в некоторых случаях *NOXA1*, участие *Rac* точно не установлено; *NOX4* связывает *p22^{phox}* и функционирует в клетке постоянно без участия дополнительных элементов; *NOX5*, *DUOX1* и *DUOX2* активируются Ca^{2+} ; для *DUOX1* и *DUOX2* необходимы дополнительные факторы *DUOX1A1* и *DUOX1A2*. Адаптировано из [27].

$\text{O}_2^{\cdot-}$ хорошо взаимодействует с $\cdot\text{NO}$. При взаимодействии этих довольно слабых радикалов образуется соединение пероксинитрит (ONOO^-), которое отличается высокой реакционной способностью [141,142]. Неспецифичные реакции $\text{O}_2^{\cdot-}$ в клетке ограничены его коротким временем жизни. В норме $\text{O}_2^{\cdot-}$ очень быстро преобразуется в H_2O_2 .

Большая часть продуцируемого $O_2^{\cdot-}$ дисмутирует в H_2O_2 по реакции $2O_2^{\cdot-} + 2H^+ \rightarrow O_2 + H_2O_2$. Эта реакция может протекать спонтанно, но гораздо быстрее она проходит с участием специализированных ферментов – супероксиддисмутаз (SOD), содержащих в активном центре ион переходного металла. Для клеток млекопитающих характерны три изоформы SOD: Cu/Zn-содержащие цитоплазматическая SOD1 и экстраклеточная SOD3, а также митохондриальная SOD2, которая содержит Mn в активном центре [143–145]. SOD распространены не только в клетках млекопитающих, но и других аэробных организмах [146]. В клетках прокариот помимо Mn-SOD также были обнаружены схожие по структуре Fe-содержащие SOD [147]. Кроме этого, существуют SOD с Ni в активном центре, например, такие ферменты были обнаружены у цианобактерий и стрептомицетов [148,149]. Примечательно, что несмотря на то, что все SOD выполняют в различных клетках одну и ту же функцию – катализируют реакцию диспропорционирования $O_2^{\cdot-}$, все они существенно отличаются по своей структуре за исключением схожих друг с другом бактериальных Mn-SOD и Fe-SOD. У большинства SOD реакция протекает в два этапа. При взаимодействии с $O_2^{\cdot-}$ сначала происходит восстановление металла в активном центре фермента, который затем вновь окисляется при взаимодействии со вторым $O_2^{\cdot-}$:



$O_2^{\cdot-} + 2H^+ + X^{n+} \rightarrow X^{(n+1)+} + H_2O_2$, где $M^{(n+1)+}$ - окисленная форма активного центра, M^{n+} - восстановленная. В результате общая реакция:



Таким образом, механизм построен на последовательном восстановлении и окислении металлических центров SOD. В Cu/Zn-SOD в данной реакции участвует только Cu, а Zn участвует в стабилизации структуры белка [144,146,150]. Из-за более сложной организации структуры в каталитический цикл Mn-SOD входят дополнительные стадии переноса H^+ [151].

В норме SOD обеспечивают очень эффективное удаление $O_2^{\cdot-}$, это обеспечивается не только высокой константой скорости, оставляющей $\sim 10^9 \text{ M}^{-1} \cdot \text{c}^{-1}$ [152], но и значительным количеством этих ферментов в клетке. Например, концентрация Mn-SOD в митохондриях составляет около 10 – 15 мкМ [153]. Генетические поломки по SOD приводят к глобальным нарушениям редокс-регуляции клетки. Например, мыши с полным отсутствием функциональной SOD2 демонстрируют множественные нарушения и погибают в течение первых нескольких дней жизни, поэтому нуждаются в антиоксидантной терапии [154,155]. У человека мутация в SOD1 связана с развитием бокового амиотрофического склероза [156]. Некоторые нейродегенеративные заболевания,

дисфункции скелетных и сердечной мышц также могут быть обусловлены у человека нарушениями работы SOD [143].

Далее мы переходим к рассмотрению свойств H_2O_2 – наиболее изученного и важного для редокс-регуляции представителя АФК. Основная часть H_2O_2 образуется в клетках благодаря реакции дисмутации $\text{O}_2^{\cdot-}$, катализируемой различными SOD. Однако H_2O_2 может образовываться также в результате других реакций, катализируемых, например, моноаминоксидазой А/В [157], оксидоредуктином 1 (Ero1) в эндоплазматическом ретикулуме [158], оксидазой D-аминокислот [159] и другими.

H_2O_2 является двухэлектронным окислителем, при этом достаточно стабилен по сравнению с другими АФК. Роль H_2O_2 в качестве сигнальной молекулы обусловлена свойством обратимо модифицировать определенные аминокислотные остатки белков, что приводит к структурным изменениям и, таким образом, влияет на их функции. Основной мишенью для H_2O_2 являются остатки Cys, окисляется сера в составе тиоловой группы (-SH) боковой цепи. При этом далеко не все Cys белков взаимодействуют с H_2O_2 . Во-первых, H_2O_2 может взаимодействовать только с доступными Cys, экспонированными наружу. Во-вторых, важно состояние -SH групп. Тиолы с низким значением pK_a пребывают в депротонированном состоянии во внутриклеточных условиях с характерным нейтральным pH, это увеличивает реакционную способность таких групп в нуклеофильных реакциях и, таким образом, обеспечивает кинетическое преимущество. Поэтому тиолат анион (P-S^- , где в качестве P выступает белковая цепь) реагирует с H_2O_2 гораздо быстрее по сравнению с протонированной P-SH группой [160,161]. Для редокс-активных Cys в составе белков, как правило, характерно соответствующее окружение. Например, характерно наличие положительно заряженных остатков, которые позволяют стабилизировать P-S^- или остатки, участвующие в стабилизации переходных состояний [161–163]. Результатом взаимодействия P-S^- с H_2O_2 является образование нестабильной сульфеновой кислоты (P-SOH) – универсального соединения, проявляющую как нуклеофильную, так и электрофильную реакционные способности. Наличие $\text{P}_1\text{-S}^-$ в непосредственной близости от образовавшегося $\text{P}_2\text{-SO}^-$ приводит к образованию дисульфидной связи $\text{P}_1\text{-S-S-P}_2$. По такому принципу образуются как внутри-, так и межмолекулярные -S-S- связи (т.е. P_1 и P_2 могут быть цепями как одного белка, так и разных) [33,164]. При доступе к амидной группе возможно образование сульфенамидной связи (-S-N=) [163,165]. P-SO^- могут взаимодействовать с низкомолекулярными тиолатами R-S^- , в качестве которых могут выступать, например, цистеин или глутатион, в этом случае образуются смешанные дисульфиды P-S-S-R . В качестве примера можно привести также обратимую реакцию глутатионилирования, эта модификация используется для регуляции свойств многих

белков [166]. Кроме того, нестабильный P-SOH может быть вновь восстановлен антиоксидантными системами до P-SH. Однако при избытке H_2O_2 P-SO⁻ может быть окислен до сульфеновой кислоты (P-SO₂H), которая по сравнению с сульфеновой (P-SOH) является лучшим электрофилом. Образование этой модификации является важным регулятором функции пероксиредоксинов (Prx) [167], при этом обратимую реакцию обеспечивают АТФ-зависимые сульфиредоксины (Srx) [54]. P-SO₂H может окисляться далее до образования сульфоновой кислоты (P-SO₃H), эта модификация уже необратима, ее появление в белках, как правило, приводит к ингибированию их свойств, что наблюдается при развитии окислительного стресса. На **рисунке 6** представлены возможные модификации, вызванные H_2O_2 , по редокс-активным Cys в белках.

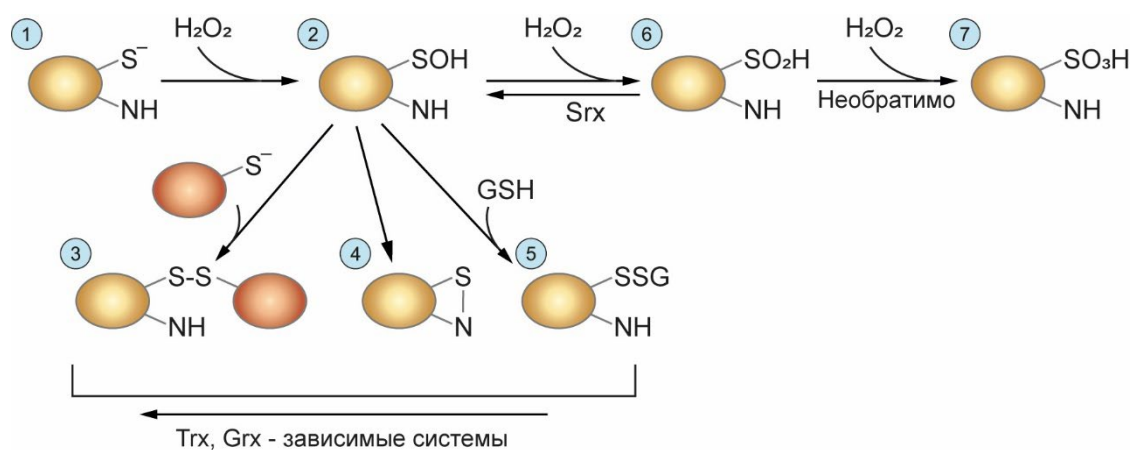


Рисунок 6. Модификации редокс-активных остатков цистеина в белках, вызванные взаимодействием с H_2O_2 . Окисление тиолат аниона (1) приводит к образованию сульфеновой кислоты (2). Эта модификация нестабильна и в присутствии еще одного тиолата происходит формирование внутри/межмолекулярных дисульфидных связей (3). Наличие в окружении амина может привести к образованию сульфенамидной связи (4). В реакции взаимодействия с сульфенатами могут вступать также низкомолекулярные тиолы, например, GSH, что может приводить к глутатионилированным интермедиатам (5). Все эти модификации (2-5) изменяют свойства белков, но они обратимы, за что отвечают глутатион- и тиоредоксин-зависимые системы, поддерживающие внутриклеточный тиол-дисульфидный обмен. Однако при избытке H_2O_2 сульфенаты окисляются до сульфинатов (6), обратное восстановление которых осуществляется лишь специализированными белками Srx и АТФ-зависимо. Дальнейшее окисление и образование сульфоновой кислоты (7) уже является необратимой модификацией. Адаптировано с изменениями из [168].

H_2O_2 является ключевой молекулой, участвующей в редокс-сигналинге. Ниже представлены свойства, которые позволяют классифицировать это соединение в качестве сигнального регулятора:

1) концентрация H_2O_2 во внутриклеточных компартментах строго контролируется и поддерживается в определенном диапазоне. Общая концентрация H_2O_2 при

физиологических условиях оценивается в клетке в пределах 1-10 нМ [11,169]. Этот показатель может зависеть от состояния и типа клетки. Важно, что в клетке распределение H_2O_2 по компартментам неравномерно, например, в люмене эндоплазматического ретикулума, характеризующегося более окисляющей средой, концентрация H_2O_2 оценивается в ~ 700 нМ [170];

2) продукция H_2O_2 в клетках запускается в ответ на определенные стимулы, например, через активацию сигнальных каскадов факторами роста, инсулином или хемокинами [134,171];

3) для H_2O_2 характерно наличие большого количества мишеней. Самые разнообразные белки подвергаются специфичным модификациям со стороны H_2O_2 , в результате чего меняются их свойства, в том числе ферментативная активность или взаимодействие с лигандами и другими белками. Это позволяет регулировать множество внутриклеточных процессов, включая такие глобальные, как клеточную пролиферацию и дифференцировку, миграцию клеток, ангиогенез [68,172].

4) модификации белков, вызванные взаимодействием с H_2O_2 , носят обратимый характер, что позволяет отменить запускаемый сигнал;

5) для H_2O_2 характерно наличие внутриклеточной системы транспорта. H_2O_2 является незаряженной молекулой и поэтому может путем пассивной диффузии проходить через биологические мембраны. Однако было показано, что гораздо быстрее H_2O_2 преодолевает мембраны через аквапорины [173,174]. Такие транспортирующие системы при этом сами подвержены редокс-регуляции. Например, для аквапорина 8 был выявлен механизм регуляции через персульфидацию ключевого остатка Cys [175].

Таким образом, в разных компартментах клетки H_2O_2 действует на определенные белки, выступающие в роли специфичных редокс-переключателей, их редокс-состояние определяет протекание того или иного сигнального пути. Важно отметить, что редокс-регуляция белка может осуществляться по нескольким аминокислотным остаткам, модификация каждого из которых обуславливает определенный эффект. Например, окисление Cys62 и Cys69 в человеческом Trx1 ингибирует взаимодействие с TrxR1, при этом окисление Cys73 ингибирует взаимодействие с Prx [176]. Многочисленным примерам редокс-регуляции белков с участием H_2O_2 посвящены подробные обзорные статьи [68,177–179].

Доступные остатки Cys с низким значением pK_a являются основными, но не единственными мишенями для H_2O_2 в клетке. Так, например, селеноцистеин (Sec) более реакционноспособен по отношению к H_2O_2 . Sec более сильный нуклеофил по сравнению с

Cys и при физиологических условиях в основном пребывает в депротонированном состоянии. Большинство белков, содержащих остаток Sec, являются оксидоредуктазами. Известными примерами селенобелков в клетках млекопитающих являются тиоредоксинредуктазы, глутатионпероксидазы, одна из метионинсульфоксидредуктаз, дейодиназы [180]. Остаток Sec в этих белках по аналогии с Cys окисляется до селеновой кислоты с последующим восстановлением тиолами [181].

Met – еще один серосодержащий аминокислотный остаток, также может обратимо окисляться в белках в присутствии H_2O_2 [182–184]. Окисление Met приводит к образованию метионинсульфоксида, для которого характерны R- и S-стереоизомеры [185]. Наличие в клетках метионинсульфоксид редуктаз (Msr) делает эту реакцию обратимой [186]. Существует несколько видов Msr, они отличаются по структуре, однако механизм катализируемой реакции достаточно схож. Каталитический остаток Cys этих белков взаимодействует с метионинсульфоксидом, что приводит к высвобождению продукта реакции и образованию сульфеновой кислоты. В ближайшем окружении расположен еще один остаток Cys, который выполняет регенерирующую функцию, поскольку между ним и каталитическим Cys образуется дисульфидная связь. Дисульфид в активном центре восстанавливается Trx, после чего Msr вновь может участвовать в реакции восстановления [187]. Каталитический механизм у разных представителей Msr может отличаться, например, по количеству и позициям редокс-активных Cys. Среди Msr также есть селенопротеины, например, MsrB1 [188].

H_2O_2 реагирует также с гем-содержащими белками. Причем для некоторых таких белков взаимодействие с H_2O_2 является их основной функцией в клетке. Яркими примерами являются каталазы, нейтрализующие H_2O_2 , а также различные гемовые пероксидазы, как миелопероксидаза, которая осуществляет реакцию образования гипохлоритных кислот. О подобных специализированных белках мы еще поговорим далее. Однако функции многих гем-содержащих белков не связаны с реакцией с H_2O_2 , но все же при определенных обстоятельствах такая реакция возможна. Это происходит, когда гемовая группа переходит в окисленное состояние (Fe^{3+}) при вакантном 6-м координационном положении. В таком случае при взаимодействии с H_2O_2 гем окисляется до оксоферрильного состояния ($Fe^{4+}=O$) с образованием радикала на порфириновой части гема или на аминокислотном остатке в окружении. Поэтому даже такие гемовые белки, как гемоглобин и миоглобин, могут взаимодействовать с H_2O_2 , хотя и значительно медленнее по сравнению со специализированными каталазами и пероксидазами [189]. При этом даже такой неспецифический механизм взаимодействия H_2O_2 с переходными металлами в составе белков может быть использован в редокс-регуляции и передаче сигнала. Например,

транскрипционный репрессор PerR из бактерии *Bacillus subtilis* содержит Fe²⁺, координируемый остатками His. При взаимодействии с H₂O₂ происходит необратимое окисление и инактивация PerR, в результате чего запускается экспрессия генов антиоксидантных белков, например, каталазы, что позволяет бактерии выжить в условиях окислительного стресса [190].

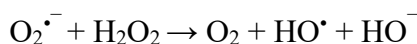
Главная опасность для клетки при неконтролируемых высоких концентрациях H₂O₂ заключается именно во взаимодействии H₂O₂ с редокс-активными ионами металлов, преимущественно с железом и медью. В этом случае протекает так называемая реакция Fenton, названная в честь Henry Fenton, изучавшего особенности переноса электронов различными металлами. Так, в присутствии ионов Fe²⁺ происходит образование высоко реакционноспособного гидроксильного радикала HO•:



Одновременно может протекать реакция обратного восстановления Fe³⁺ с помощью H₂O₂ с образованием гидропероксильного радикала HOO•:

$\text{Fe}^{3+} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{Fe}^{2+} + \text{HOO}\cdot + \text{H}^+$, т.е., по сути, ион металла выступает в роли катализатора. По такому же принципу протекает реакция Haber–Weiss (названа в честь Fritz Haber и Joseph Weiss). В этом случае O₂^{•-} взаимодействует с Fe³⁺:

$\text{Fe}^{3+} + \text{O}_2^{\cdot-} \rightarrow \text{Fe}^{2+} + \text{O}_2$, в результате взаимодействия с H₂O₂ по уже представленной выше реакции образуется HO•, таким образом суммарная реакция:



Именно образование HO• и HOO• в ходе описанных реакций обеспечивает основной цитотоксический эффект H₂O₂ при его неконтролируемой продукции [191,192].

HO• является наиболее реакционноспособным радикалом (E⁰ ~ 2,3 В) [134], образующимся в живых системах. HO• не селективно реагирует со множеством внутриклеточных мишеней, вызывая их повреждения, включая белки, нуклеиновые кислоты, углеводы, липиды, низкомолекулярные органические соединения, характерны высокие константы скоростей в пределах 10⁹ – 10¹⁰ М⁻¹с⁻¹ [134,193]. HO• реагирует с ближайшим своим окружением мгновенно после образования и практически не диффундирует в клетке. Поэтому внутриклеточные сайты токсичности HO•, как правило, определены доступностью ионов металлов для протекания соответствующих реакций образования. При взаимодействии с мишенями HO• может отобрать H⁺ от взаимодействующего с ним субстрата, наоборот присоединиться к чему-то или осуществить перенос электрона. HO• взаимодействует с белками и способен вызывать модификации по любым аминокислотным остаткам, что приводит к их окислению, образованию новых радикалов (например, пероксильных) и даже разрыву полипептидных

цепей [194,195]. При взаимодействии с ДНК и РНК HO^\bullet вызывает их модификации с образованием, например, 8-оксо-2'-дезоксигуанозина (8-охо-dG) и 8-оксо-2'-дезоксаденозина (8-охо-dA) [196,197], эти модификации нуклеиновых кислот носят повреждающий характер и служат надежным маркером мощного внутриклеточного окислительного стресса. HO^\bullet также атакует липиды, содержащие $\text{C}=\text{C}$ связи. Реакция происходит с отрывом H^+ от углерода рядом с двойной связью, в результате образуется липидный радикал (L^\bullet), который быстро реагирует с O_2 с образованием пероксильного радикала липида (LOO^\bullet). В свою очередь LOO^\bullet отрывает H^+ от другой липидной молекулы и переходит в гидропероксид липида (LOOH) с образованием нового L^\bullet . Подобные реакции носят цепной характер, образование всё новых радикалов происходит пока не наступит стадия терминации с участием, например, антиоксидантных соединений или при взаимодействии с каким-то другим радикалом [198,199]. На **рисунке 7** наглядно представлен цикл таких реакций. В результате окислительного повреждения липидов спонтанно образуются продукты распада липидных пероксидов, которые тоже используют в качестве маркеров для определения окислительного стресса, прежде всего к таким маркерам относят малоновый диальдегид, пропаналь, гексаналь и 4-гидроксиноненаль [199].

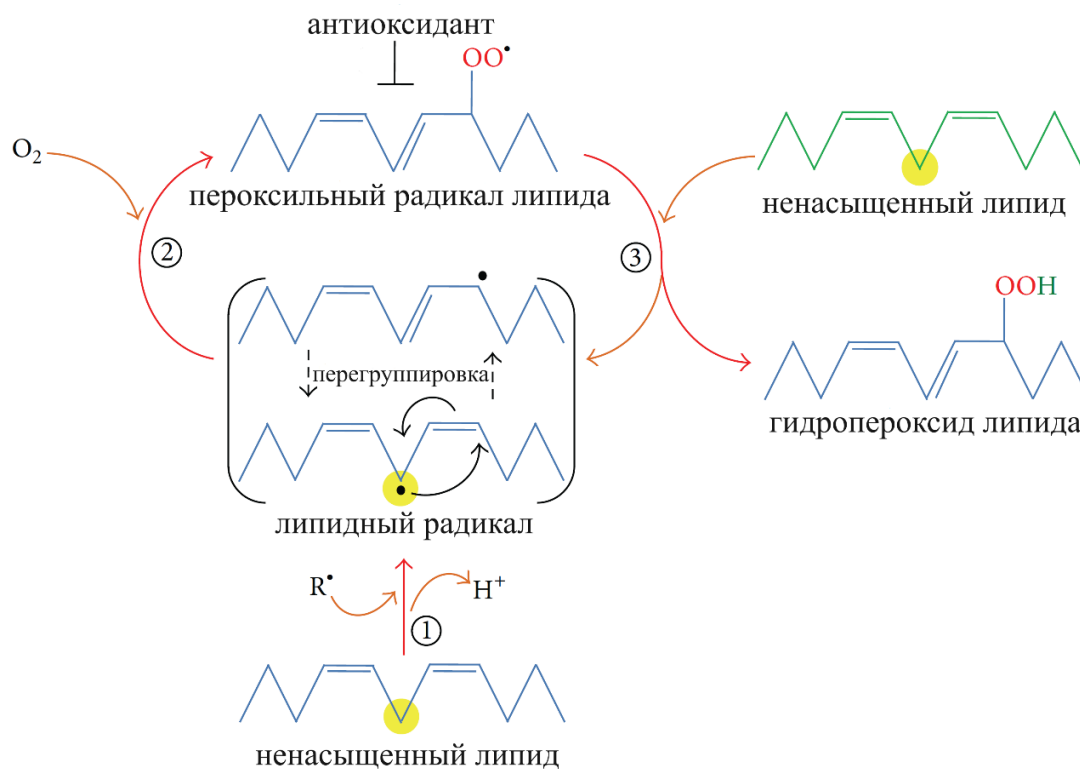


Рисунок 7. Процесс перекисного окисления липидов. Адаптировано из [199].

Итак, гидропероксиды липидов, пероксильный и алкоксильный радикалы дополняют группу АФК. Такие модификации липидов приводят к изменениям структур мембран и их свойств. С другой стороны, окисленные липиды также играют важную роль в передаче редокс-сигналов в клетке [200], особенно эти механизмы широко распространены в передаче сигналов, обеспечиваемых иммунной системой [201,202]. В частности, редокс-активные продукты реакций, катализируемых липоксигеназой и циклооксигеназой, участвуют в активации и контроле воспалительных процессов [203].

Таким образом, H_2O_2 с одной стороны является важной сигнальной молекулой для клетки, а с другой стороны H_2O_2 может привести к всплеску еще более редокс-активных видов АФК, которые неспецифично и необратимо взаимодействуют со многими мишенями, вызывая внутриклеточные повреждения. Поэтому в ходе эволюции были выработаны механизмы, позволяющие надежно регулировать концентрацию H_2O_2 внутри клетки на уровне отдельных компартментов. Мы уже обсудили, что производство H_2O_2 может быть направленным процессом благодаря тонкой регуляции работы различных представителей NOX. Образующийся $\text{O}_2^{\cdot-}$ при участии SOD очень быстро дисмутирует в H_2O_2 , однако и его время жизни в клетке должно быть ограничено для предотвращения негативных процессов окислительного повреждения. Для эффективной нейтрализации H_2O_2 , а также гидропероксидов, в клетках различного происхождения присутствует целый набор высокоспециализированных ферментов. Рассмотрим основные из них.

Эффективное удаление H_2O_2 обеспечивают железосодержащие каталазы. Эти ферменты катализируют реакцию диспропорционирования, в которой H_2O_2 выступает одновременно как в роли окислителя, так и восстановителя. Диспропорционирование $\text{O}_2^{\cdot-}$, катализируемое SOD, отчасти имеет схожий принцип. Только SOD осуществляет перенос одного электрона, а каталаза отдает два электрона H_2O_2 с образованием H_2O и при этом отнимает два электрона от H_2O_2 с образованием O_2 . В результате общая реакция: $2\text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow 2\text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$. Нейтрализация H_2O_2 не может идти с бóльшим или мёньшим участием электронов, в противном случае будут образовываться опасные для клетки $\text{O}_2^{\cdot-}$ и HO^{\cdot} . Каким же образом каталазе удастся осуществлять реакцию передачи двух электрона с железом в активном центре? Ранее мы уже коснулись темы необычного редокс-механизма некоторых железосодержащих белков при взаимодействии с АФК на примере гемоглобина и миоглобина. Каталазы являются более специализированными ферментами. Fe^{3+} в активном центре каталаз также взаимодействует с H_2O_2 с образованием оксоферрильной группы ($\text{Fe}^{4+}=\text{O}$) и катион-радикала в окружении, при этом H_2O_2 восстанавливается до H_2O . Затем вторая молекула H_2O_2 действует уже как восстановитель, что приводит к регенерации активного центра с образованием O_2 [189]. Т.е. для функционирования каталаз не требуется

дополнительных восстановителей, как, например, для Grx и Prx. Это позволяет эффективно удалять H₂O₂, но при этом отсутствует система обратной связи, важной для регуляции. В тканях млекопитающих значительное количество каталаз синтезируются в клетках печени и эритроцитах. По распределению между клеточными компартментами больше всего каталаз содержится в пероксисомах [204,205] – органеллах, в которых происходят окислительные процессы, поэтому в них содержится большое количество оксидаз, продуцирующих H₂O₂ [206]. Константа скорости реакции каталаз с H₂O₂ составляет $\sim 8 \times 10^6$ М⁻¹с⁻¹ [207], однако из-за высокого значения K_m каталазы эффективны в нейтрализации именно высоких концентраций H₂O₂ [208]. Поэтому вклад этих ферментов в регуляцию низких концентраций H₂O₂, например, в цитозоле или ядре, незначителен. Для этих целей, осуществляющих более тонкую регуляцию H₂O₂, предназначены другие белки.

Такими специализированными белками являются глутатион пероксидазы (Grx), которые катализируют реакцию восстановления H₂O₂ до H₂O, при этом сами Grx инактивируются. Эта реакция обратима, Grx вновь восстанавливаются при взаимодействии с GSH, редокс-статус которого в клетках поддерживают GR. Таким образом, общая реакция: $2\text{GSH} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{H}_2\text{O} + \text{GSSG}$. Константа скорости реакции Grx с H₂O₂ составляет $\sim 4,0 \times 10^7$ М⁻¹с⁻¹ [209], и в отличие от каталаз эти белки работают в диапазоне низких концентраций H₂O₂. Grx представляют собой целое семейство схожих белков [64,210]. В млекопитающих Grx1-4 являются селенобелками, содержащими Sec в активном центре, что и определяет высокую чувствительность к H₂O₂. Grx1-4 исторически были открыты первыми в семействе. Самым распространенным селенобелком в клетках человека как раз является Grx1, он присутствует в клетках повсеместно и содержится в цитозоле и митохондриях [211]. Селенат (-Se⁻) в активном центре Grx при взаимодействии с H₂O₂ окисляется до селеновой кислоты (-Se-O⁻), данная модификация при реакции с GSH образует сначала промежуточный продукт селенилсульфид (-Se-SG), который восстанавливается до исходного состояния при тиол-дисульфидном обмене с еще одной молекулой GSH и с высвобождением GSSG [64] (**рис. 8**). Однако вскоре к Sec-содержащим Grx1-4 в данное семейство белков были добавлены Grx5-8, которые содержат в активном центре Cys. Примечательно, что у человека Grx6 тоже является селенобелком, но у некоторых других млекопитающих, например, грызунов, Grx6 содержит Cys [212]. Grx3 и Grx5 являются секретруемыми [213,214]. Для Grx7 и Grx8 по сравнению с Sec-пероксидазами этого же семейства характерна меньшая активность [64]. Для Grx, содержащих в активном центре Cys, характерен другой механизм реакции. Cys окисляется до сульфеновой кислоты и при наличии дополнительного Cys образуется внутримолекулярная S-S связь, которая восстанавливается при участии Trx. Таким образом,

этим ферментам по механизму реакции больше подходит название тиоредоксин пероксидазы [64]. В отличие от каталаз, Gpx могут восстанавливать не только H_2O_2 , но и органические пероксиды, включая пероксиды липидов [64,210].

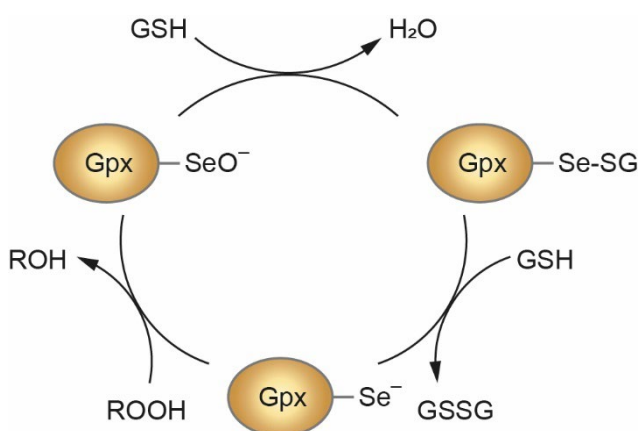


Рисунок 8. Схема каталитического цикла Sec-содержащих Gpx на примере Gpx1.

Пероксиредоксины (Prx) составляют еще одну группу специализированных белков, которые катализируют восстановление H_2O_2 и органических гидропероксидов различной природы [215,216]. Константа скорости реакции взаимодействия Prx с H_2O_2 составляет $\sim 10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ [217], что делает их также эффективными внутриклеточными нейтрализаторами пероксидов. Prx распространены повсеместно в различных типах клеток в разных их компартментах. В тканях млекопитающих семейство Prx насчитывает шесть типов [218]. В активном центре всех Prx расположен каталитический остаток Cys. В этой главе мы уже неоднократно рассматривали механизмы взаимодействия редокс-активных Cys белков с H_2O_2 . Prx также не являются исключением и демонстрируют этот универсальный механизм функционирования. $-\text{S}^-$ в активном центре окисляется H_2O_2 с образованием $-\text{SO}^-$. Большинство Prx в окружении активного центра имеет еще один остаток Cys, с которым каталитический Cys образует S-S связь. Такой механизм характерен для типичных двухцистеиновых Prx (Prx1-4) и атипичного двухцистеинового Prx5. Все двухцистеиновые Prx функционируют в виде димера, каждая субъединица содержит по два Cys. В типичных Prx1-4 каталитический Cys-SO^- взаимодействует с Cys на соседней субъединице, образуя межсубъединичную S-S связь. Для Prx5 образование S-S связи происходит в пределах каждой субъединицы, т.е. с образованием внутрисубъединичной S-S связи, поэтому этот тип отнесли к атипичной форме [216,218]. В Prx6 в активном центре содержится один остаток Cys, который также образует $-\text{SO}^-$, однако он взаимодействует с низкомолекулярными тиолами, чаще всего происходит S-глутатионилирование [219]. Prx так же, как и Gpx, при окислении инактивируются. Цикличность работы Prx поддерживается Trx, восстанавливающими их. Prx6 восстанавливается GSH в присутствии

глутатион трансферазы (GST). Активность Prx регулируется в клетке посредством различных посттрансляционных модификаций [220,221]. Для некоторых Prx характерен еще один уникальный путь регуляции их активности. В активном центре Prx может образоваться сразу сульфоновая кислота ($-\text{SO}_2^-$) [222], что приводит к инактивации фермента. Такое переокисление Prx может происходить как при больших концентрациях H_2O_2 , так и относительно малых благодаря чувствительности белка [167,223]. Однако АТФ-зависимые белки сульфиредоксины (Srx) обеспечивают восстановление $-\text{SO}_2^-$ в активном центре Prx [224]. Биологический смысл такого переокисленного состояния Prx может быть в том, что на время эти белки перестают выполнять свои функции, что увеличивает время жизни пероксидов, позволяя инициировать внутриклеточные события через редокс-регуляцию [225]. Примечательно, что Prx5 и Prx6 в меньшей степени подвергаются переокислению, кроме того, они не восстанавливаются Srx [226]. При развитии окислительного стресса увеличивается производство Srx в клетке, обеспечивающего эффективную работу Prx [225]. На **рисунке 9** представлены схемы функционирования различных типов Prx.

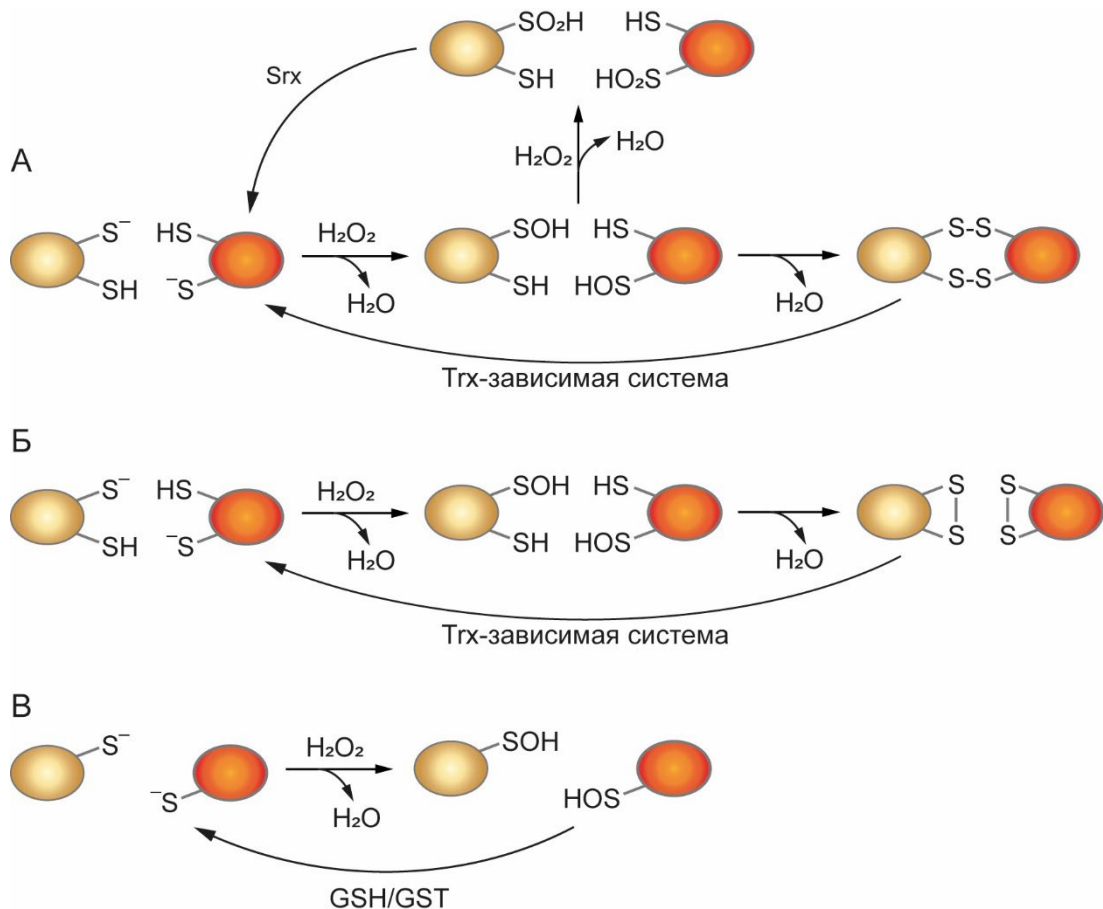


Рисунок 9. Схема механизмов реакций Prx. Цикл А) 2-Cys типичных Prx, Б) 2-Cys атипичных Prx и В) 1-Cys Prx. Srx – сульфиредоксин, GST – глутатион трансфераза.

Мы рассмотрели свойства основных биологически значимых представителей АФК, а также главные механизмы их внутриклеточного образования и контроля. Однако АФК нельзя приписать исключительную роль в регуляции редокс-процессов в живых системах. Более того, АФК формируют сложную сеть взаимодействий с другими низкомолекулярными редокс-активными соединениями.

1.1.3. Активные формы галогенов (АФГ)

После рассмотрения свойств АФК логично перейти к АФГ, поскольку именно H_2O_2 лежит в основе их образования. К АФГ относятся гипогалогенные кислоты и их производные. Наиболее распространенными и биологически значимыми для клеток позвоночных организмов являются хлорноватистая кислота (HOCl) и бромноватистая (HOBr). Однако к этому же классу соединений на основе схожих химических свойств относят и гипотиоциановую кислоту (HOSCN), в литературе по отношению к данному соединению часто встречается термин «псевдогипогалогенная кислота», что, таким образом, подчеркивает ее происхождение не от галогена. Как и любые кислоты, HOCl , HOBr и HOSCN диссоциируют и поэтому в условиях биологических систем они представлены как в протонированной форме, так и в виде сопряженных оснований OCl^- , OBr^- и OSCN^- . (Псевдо)гипогалогенные кислоты образуются в клетках в результате реакций, которые катализируют гемовые пероксидазы. На сегодняшний день известно пять таких ферментов: миелопероксидаза, лактопероксидаза, пероксидаза эозинофилов, тиреопероксидаза [227] и недавно открытая и еще малоизученная сосудистая пероксидаза 1 [228].

В 1941 г. доктором Agner впервые был получен из лейкоцитов белковый препарат фермента, известного сейчас под названием миелопероксидаза (прежнее название вердопероксидаза) [229]. Миелопероксидаза в настоящий момент является наиболее изученным ферментом класса гемовых пероксидаз. Этот белок функционирует в виде димера, в котором каждая субъединица состоит из тяжелой и легкой цепей. Каталитический цикл, состоящий из нескольких этапов (**рис. 10**), осуществляется благодаря наличию гемовой группы, которая расположена на дне глубокой полости, сформированной структурой белка. На первом этапе реакционного цикла происходит двух-электронное восстановление H_2O_2 до H_2O с образованием оксоферрильного центра ($\text{Fe}^{4+}=\text{O}$) и катион-радикала на порфириновой части гема [230]. Это состояние фермента было названо соединением I. Далее соединение I может вернуться в исходное состояние гема Fe^{3+} двумя независимыми путями. Соединение I может участвовать в последовательных

одноэлектронных реакциях восстановления при окислении подходящего субстрата в окружении. После первой реакции образуется промежуточное соединение II ($\text{Fe}^{4+}=\text{O}$ без радикала в окружении), которое сразу же по такой же реакции восстанавливается до состояния Fe^{3+} . При некоторых условиях фермент может переходить в инертное состояние, при котором железо в активном центре находится в состоянии Fe^{2+} (соединение III). Например, это происходит при избытке H_2O_2 [231] или при воздействии некоторых ксенобиотиков [232,233]. При этом соединение III реагирует с $\text{O}_2^{\cdot-}$, что переводит фермент в активное состояние [234]. Примечательно, что данная реакция может протекать и в обратную сторону, в этом случае фермент начинает работать как супероксиддисмутаза [231,235]. Соединение III также может образовываться путем одноэлектронного восстановления основного состояния Fe^{3+} до Fe^{2+} и последующего взаимодействия с O_2 [236]. Реакцию миелопероксидазы с H_2O_2 при последующем восстановлении назвали пероксидазным циклом фермента. Альтернативным путем реакции соединения I ($\text{Fe}^{4+}=\text{O}$) является его двух-электронное восстановление анионами галогенов (Cl^- , Br^- , I^-) и псевдогалогена SCN^- с образованием соответствующих кислот (рис. 10). Этот каталитический цикл фермента получил название галогенирующий. Данная реакция образования (псевдо)гипогалогенных кислот проходит в одну стадию без промежуточных интермедиатов [237].

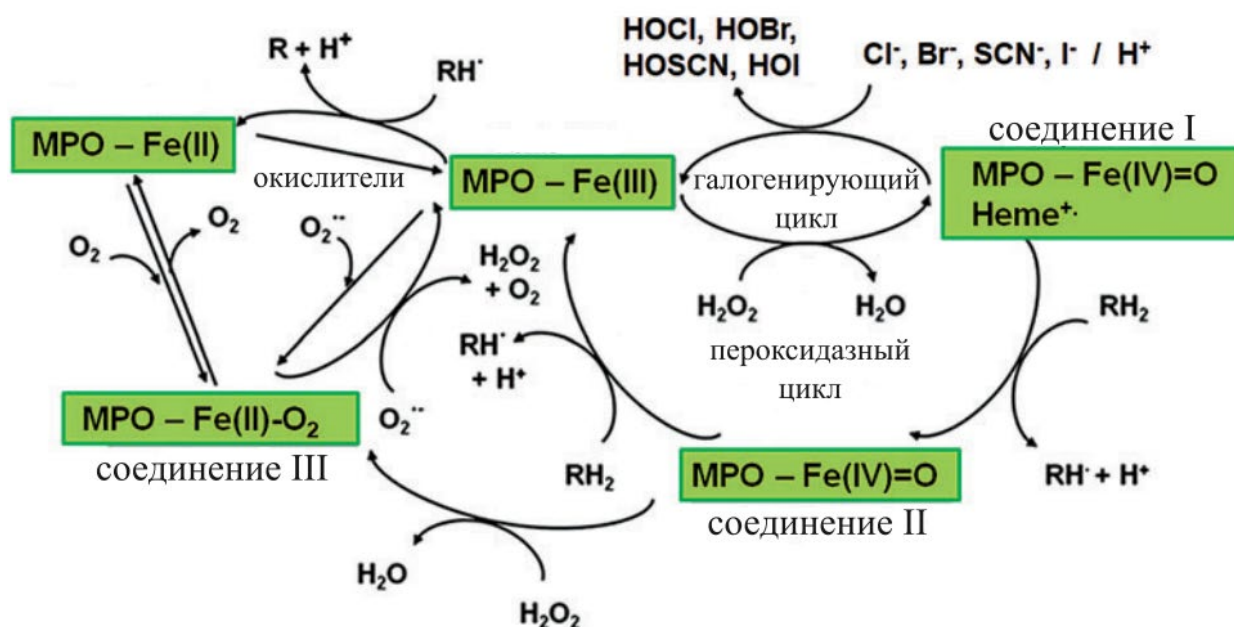


Рисунок 10. Схема каталитических циклов, осуществляемых миелопероксидазой. Пояснения приведены в тексте. RH_2 – органический субстрат, MPO – миелопероксидаза. Адаптировано из [230].

Таким образом, миелопероксидаза и схожие с ней ферменты при наличии соответствующих анионов производят смесь продуктов HOCl , HOBr , HOSCN , HOI . Однако накопленные сведения о функционировании гемовых пероксидаз свидетельствуют все же о том, что эти ферменты демонстрируют разные субстратные предпочтения. Например, считается, что SCN^- является основным субстратом миелопероксидазы, поскольку демонстрирует к этому аниону константу сродства примерно в 700 раз бóльшую по сравнению с Cl^- [238]. SCN^- является для миелопероксидазы более предпочтительным субстратом и с точки зрения кинетики. Так, значение константы скорости реакции миелопероксидазы с SCN^- составляет $9,6 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, что сравнимо со значением для I^- , которое составляет $7,2 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, при этом для Br^- – $1,1 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ и еще ниже для Cl^- – $2,5 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ [239]. Cl^- , участвующий в регуляции многих процессов в биологических системах, имеет преимущество в концентрации по отношению к остальным рассматриваемым анионам (в плазме крови человека диапазон составляет 100-140 мМ). При этом важно учитывать, что концентрации SCN^- и Br^- могут существенно изменяться в зависимости от различных факторов [240,241]. Так, например, SCN^- при курении, приема определенных лекарственных препаратов или при некоторых диетах может увеличиться в плазме крови людей примерно в 10 раз от нормы: от $\sim 20 \text{ мкМ}$ до 250 мкМ [241,242]. В этих случаях предполагают, что миелопероксидаза использует до 50% H_2O_2 на синтез HOSCN [240]. Селективность рассматриваемых ферментов также может меняться при изменении некоторых внутриклеточных параметров, например, повышение pH увеличивает селективность миелопероксидазы по отношению к Br^- , что приводит к увеличению доли HOBr в смеси продуктов реакции [243]. Сами представители класса гемовых пероксидаз также отличаются друг от друга по селективности. Так, основными продуктами миелопероксидазы в биологических условиях являются HOCl и HOSCN , лактопероксидаза в основном синтезирует HOSCN , а пероксидаза эозинофилов образует смесь HOBr и HOSCN [237].

Среди гипогалогенных кислот наиболее изучены свойства HOCl . HOCl является сильным двух-электронным окислителем ($E^0 \sim 1,28 \text{ В}$) [244], реагирующий с разнообразными внутриклеточными мишенями. HOCl осуществляет хлорирование серо- и азотсодержащих молекул, а также участвует в электрофильных реакциях замещения и присоединения с молекулами, содержащими ненасыщенные связи. Это означает, что HOCl способен реагировать практически со всеми аминокислотами [245]. Наиболее предпочтительными мишенями являются остатки Met и Cys, для них константы скоростей реакции взаимодействия с HOCl составляют $\sim 3 \times 10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ [246]. Хлорирование по Cys приводит к образованию нестабильной S-Cl связи, которая может гидролизиться с

образованием уже неоднократно упоминавшейся модификации -SOH с последующим формированием внутри- или межмолекулярной S-S связи [247]. Напомним, переокисление -SOH приводит к образованию -SO₂H и невосстанавливаемой в клетках модификации -SO₃H. Если поблизости от модифицируемого остатка присутствует остаток Lys, то между его аминной группой и модификацией -S-Cl может происходить образование сульфенамидной связи (-S-N-), которая в условиях избытка HOCl может окисляться далее до сульфинамидной группы (-S(O)-N-) и сульфонамидной (-S(O₂)-N-) [248,249]. Для изолированной модификации S-Cl наиболее вероятен путь гомолитического разрыва с образованием тиольных радикалов RS[•] [250]. Остатки Met при взаимодействии с HOCl окисляются до сульфоксидов (-S(O)-) и сульфонов (-S(O₂)-) [251]. Известно, что остатки Met, расположенные на N-конце, после взаимодействия с HOCl могут подвергаться циклизации с образованием дегидрометионина, выступающего маркером гипогалогенного стресса [252]. Остатки His и α-аминогруппы также представляют собой хорошие мишени для HOCl, демонстрируя скорость реакции $\sim 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ [246]. Взаимодействие HOCl с азотсодержащими молекулами приводит к образованию N-Cl связей, которые при взаимодействии с одноэлектронными донорами могут образовывать азотцентрированные радикалы [253,254]. N-Cl α-аминогрупп могут также образовывать имины с высвобождением HCl и протеканием реакции декарбоксилирования, нестабильные имины далее гидролизуются с образованием альдегидов, которые выступают в роли субстратов для оснований Шиффа [255]. HOCl реагирует с ароматическими соединениями с образованием Cl-производных, в белках мишенями выступают остатки Trp и Tyr [245,246]. Взаимодействие HOCl по двойным связям образует галогидрины. Однако стоит отметить, что HOCl действует достаточно медленно с ненасыщенными жирными кислотами, константа скорости реакции находится в пределах $1\text{-}50 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ [245]. На **рисунке 11** представлены константы скорости реакций HOCl с соединениями различной природы.

Биологически значимыми продуктами реакций взаимодействия HOCl с азотсодержащими молекулами являются хлорамины и хлорамиды, которые также могут участвовать в редокс-процессах. Они менее реакционноспособны по сравнению с HOCl и демонстрируют селективность по отношению к тиоловым группам, демонстрируя более низкие величины констант скоростей реакций. Например, константа скорости реакции хлоротаурина с Cys составляет $\sim 200 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ [256]. Предполагают, что именно хлорамины в условиях гипогалогенного стресса могут опосредовать более тонкую редокс-регуляцию. К тому же, в некоторых клетках содержится значительное количество низкомолекулярных азотсодержащих молекул. Например, таурин, который превращается в хлоротаурин, в некоторых клетках может содержаться в mM концентрациях, например, в нейтрофилах

[257]. Также можно предположить, что в некоторых случаях высокая концентрация азотсодержащих молекул позволяет перевести мощные окислители, какими являются гипогалогенные кислоты, в их более слабые производные, что несет своего рода антиоксидантную функцию.

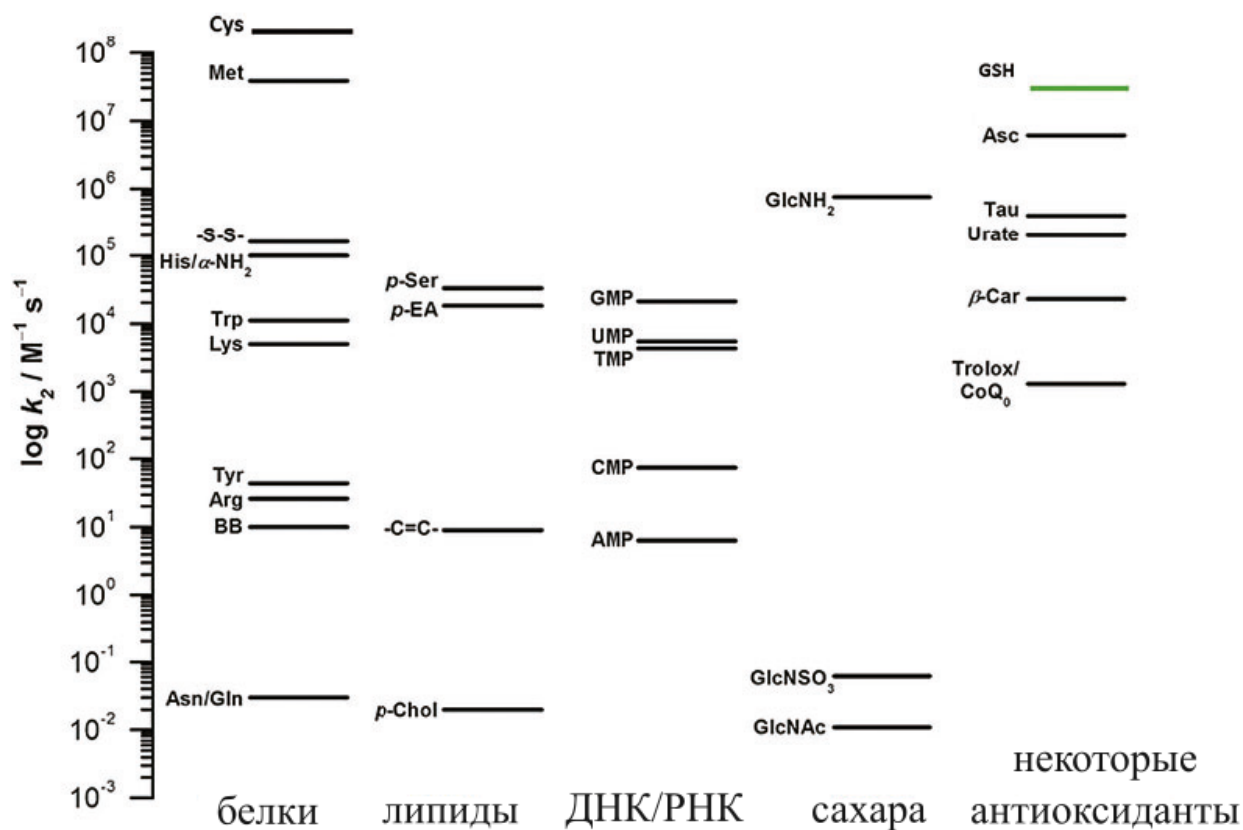


Рисунок 11. График, суммирующий значения констант скорости второго порядка в логарифмической шкале для реакций взаимодействия HOCl с соединениями различной природы. Большинство значений получено в фосфатных буферных растворах при pH 6,8–7,5 и температуре 20–25 °C за исключением β -каротена, для которого значение определяли в растворе детергента при pH 4,5. Некоторые обозначения: β -Car, β -каротен; Asc, аскорбат; BB, амиды основной цепи (от backbone amides); GlcNAc, N-ацетилированный глюкозамин; GlcNH₂, глюкозамин; GlcNSO₃, N-сульфатированный глюкозамин; p-Chol, фосфорилхолин; p-EA, фосфорилэтанолламин; p-Ser, фосфорил-Ser. Взято из оригинала [230].

Свойства других соединений данного класса исследованы значительно хуже. HOBr схож с HOCl по химическим свойствам и взаимодействует с теми же внутриклеточными мишенями, однако все же существует некоторая разница. Например, HOBr примерно на порядок медленнее реагирует с Cys и Met по сравнению с HOCl, однако на несколько порядков быстрее реагирует с ароматическими Tyr и Trp [258]. В белках главными мишенями для HOBr являются аминокислотные остатки Cys, Trp, Met, His.

Значительно по своим свойствам отличается HOscN. Это соединение преимущественно взаимодействует с тиоловой группой Cys, а также с Sec. При этом важно

значение pK_a указанных групп. Константа скорости реакции HOSCN с различными Cys лежит в диапазоне 10^3 - 10^5 $M^{-1}s^{-1}$ [259,260] и 10^3 - 10^6 $M^{-1}s^{-1}$ для Sec, что на три порядка больше при сравнении взаимодействия H_2O_2 с селенобелками, такими как Grx и TrxR [261]. Таким образом, HOSCN может инактивировать ферменты, выполняющие антиоксидантную функцию в клетке. Еще одно важное отличие HOSCN заключается в том, что вызванная ею модификация -S-SCN является устойчивой и может сохраняться в условиях биологических систем в течение продолжительного времени, в том числе на протяжении часов [262,263]. Напомним, что аналогичные модификации S-Cl и S-Br не являются стабильными. На **рисунке 12** представлено сравнение констант скоростей реакций HOCl, HOBr и HOSCN с соединениями различной природы.

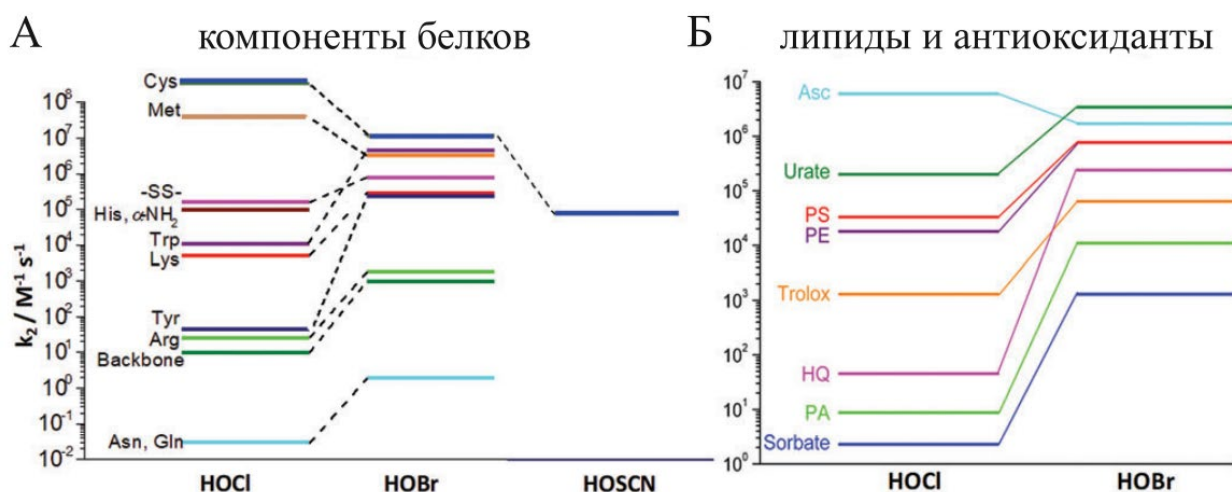


Рисунок 12. График сравнения известных значений констант скоростей реакций второго порядка для HOCl, HOBr и HOSCN при взаимодействии с соединениями различной природы. Большинство значений получено в фосфатных буферных растворах при pH 7,2–7,5 и температуре 22 °C. Некоторые обозначения: HQ, гидрохинон; PA, пентеновая кислота (двойная связь); PE, фосфорилэтаноламин; PS, фосфорил-Ser. Взято из оригинала [230].

Логично, что таким редокс-активным соединениям, как гипогалогенные кислоты, долгое время приписывали в тканях млекопитающих исключительно защитную роль при борьбе с патогенами. Например, миелопероксидаза содержится в нейтрофилах, которые по своей природе являются фагоцитами. Механизм окислительного взрыва в нейтрофилах может быть дополнен следующим образом. Как мы обсуждали выше, на мембране происходит сборка активного комплекса NOX, продуцирующего $O_2^{\cdot-}$, который в свою очередь быстро дисмутирует в H_2O_2 при действии SOD. Наличие миелопероксидазы в этой же системе позволяет образовать еще более сильные окислители. Таким образом, захваченных патоген подвергается действию не только окислительного стресса с участием

АФК, но и гипогалогенирующего, что вызывает повреждения по многим мишеням [264]. Позже был открыт уникальный тип клеточной гибели, свойственный нейтрофилам, получившим название нетоз. При запуске сигнальных каскадов в нейтрофиле запускаются редокс-процессы, вызывающие нарушения в упаковке его хроматина, в результате формируются нити ДНК, которые выходят наружу клетки при повреждении ее мембраны. Образующаяся сеть фибрилл из белков и нуклеиновых кислот служит для захвата и обездвиживания патогенов при одновременном на него воздействии различными противомикробными компонентами, включая соединения класса гипогалогенных кислот [265,266] (рис. 13).

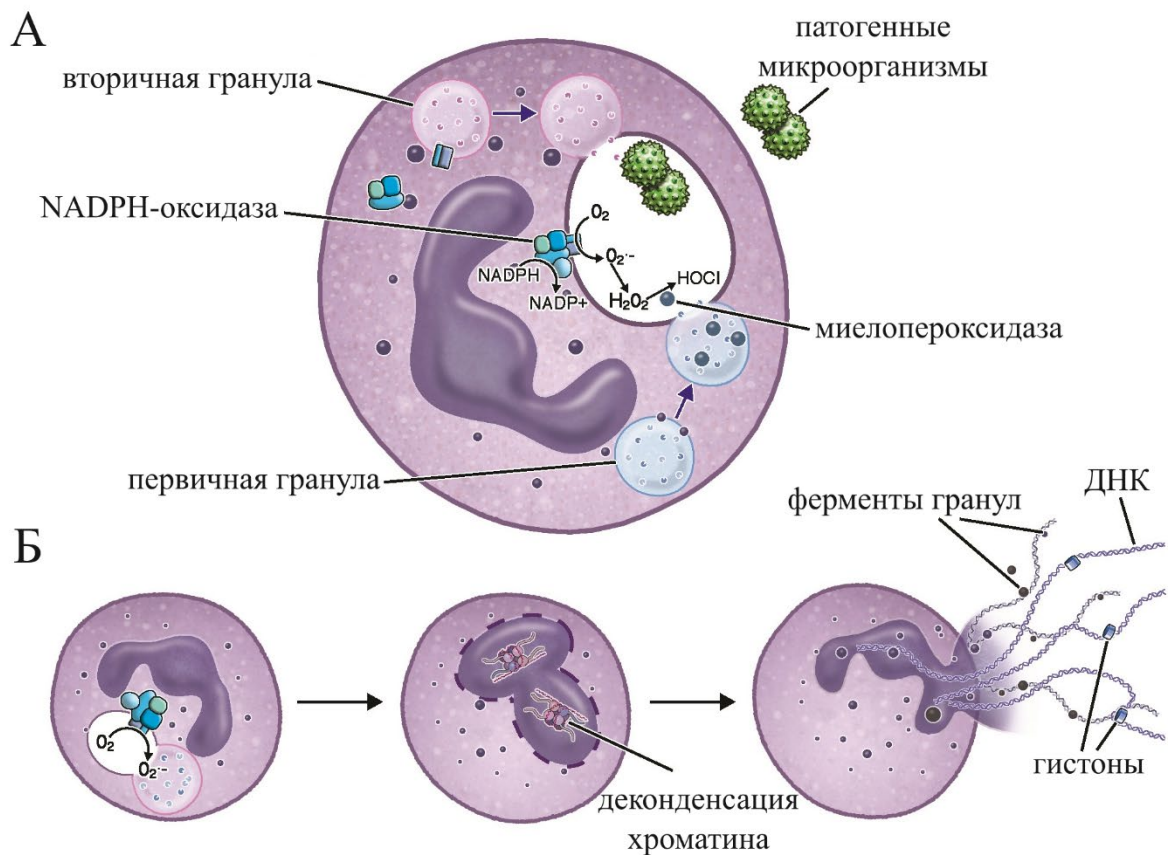


Рисунок 13. Защитные механизмы нейтрофила. *А) После фагоцитоза патогенного микроорганизма внутри нейтрофила начинается сборка активного NOX комплекса, в фагосоме развивается окислительный взрыв. Б) Представлена классическая схема развития нетоза нейтрофила. Внутриклеточные редокс-процессы, вызванные активацией сигнальных каскадов при взаимодействии с чужеродным агентом, запускают деконденсацию хроматина с образованием длинных фибрилл с основой из ДНК, которые выходят наружу нейтрофила, формируя сеть. В ней запутываются чужеродные агенты, которые при этом испытывают воздействия редокс-активных соединений, продуцируемых нейтрофилом. Адаптировано из [266].*

Важно отметить, что люди с нарушением функционирования миелопероксидазы или даже с полным отсутствием активности этого фермента не демонстрируют выраженного

фенотипа [267]. Вероятно, что нарушение работы лишь одного из ферментов для борьбы с патогенами, в данном случае миелопероксидазы, не так критично для поддержания защитных функций, поскольку запускаются некоторые компенсаторные механизмы. Например, для таких индивидуумов характерна повышенная продукция эозинофилов, а также в среднем увеличена продолжительность окислительного взрыва [267].

Все больше выходит работ, свидетельствующих о ключевой роли гипогалогенных кислот и их производных в патогенезе самых различных заболеваний, среди которых нейродегенеративные, включая болезни Альцгеймера [268] и Паркинсона [269], ишемическое повреждение сердца [270] и головного мозга [271], атеросклероз [272], астма [273], ревматоидный артрит [274] и другие. Гемовые пероксидазы встречаются в различных типах клеток, например, в клетках активированной микроглии [275], макрофагах, вовлеченных в формирование атеросклеротических бляшек [276,277]. Это примеры, когда в тканях нарушается контроль производства гипогалогенных кислот.

Но концепция гипогалогенного стресса также претерпевает изменения. Если ранее гипогалогенные кислоты рассматривали исключительно с точки зрения неспецифичных окислителей, вызывающих повреждения различного рода молекул, то сейчас накоплены сведения в пользу того, что даже такие редокс-активные соединения могут специфично взаимодействовать с определенными мишенями, что делает их полноценными участниками внутриклеточной редокс-регуляции. Уже известно, что воздействие (псевдо)гипогалогенных кислот на клетки приводит к различным внутриклеточным ответам, среди них, например, синтез некоторых цитокинов и белков антиоксидантных систем [278], активация p53 [279], NF-κB [280], ERK1/2 и p38 [281]. Но при этом на сегодняшний день (псевдо)гипогалогенные кислоты по-прежнему остаются наименее изученными редокс-компонентами клетки из-за их высокой реакционной способности и отсутствия подходящих методов их исследования в живых системах.

1.1.4. Активные формы азота (АФА)

Оксид азота ($\cdot\text{NO}$) является ключевым представителем АФА в клетке и выступает в роли важной сигнальной молекулы, участвующей в передаче редокс-сигнала. $\cdot\text{NO}$ лежит в основе образования других биологических значимых представителей АФА, среди которых пероксинитрит (ONOO^-), диоксид азота ($\cdot\text{NO}_2$), триоксид диазота (N_2O_3), тетраоксид диазота (N_2O_4) и некоторые другие. АФА вступают в реакции нитрозилирования -SH групп, а также нитрования некоторых мишеней, например, остатков Туг в белках. Вызванные модификации влияют на функционирование молекул.

Основным источником АФА в клетках млекопитающих являются белки семейства NO-синтаз (NOS). Эти ферменты с участием NADPH и O_2 катализируют реакцию образования $\cdot NO$, используя в качестве субстрата L-Arg, который через промежуточное соединение превращается в L-цитруллин (**рис. 14**). NOS функционируют в виде димера из двух одинаковых субъединиц, каждая из которых содержит домен с редуктазной функцией и оксигеназной. Между доменами расположена петля с мотивом для связывания кальмодулина. Редуктазный домен связывает кофакторы FMN и FAD и осуществляет транспорт электронов от NADPH к оксигеназному домену противоположной субъединицы. Оксидоредуктазный домен содержит гемовую группу, а также связывает кофактор тетрагидробиоптерин (BH_4) (**рис. 15**) [282–284]. При нехватке субстрата L-Arg или кофактора BH_4 NOS не формирует димер, разобщая, таким образом, реакцию. В этом случае мономер NOS также осуществляет транспорт электронов, но конечным акцептором является O_2 с образованием $O_2^{\cdot-}$ [285]. Таким образом, в некоторых условиях NOS выступает дополнительным источником образования $O_2^{\cdot-}$ в клетках.

В клетках млекопитающих известны три изоформы NOS: нейрональная NOS1, индуцибельная NOS2 и эндотелиальная NOS3. Названия были даны по мере открытия этих белков, но экспрессия их генов не ограничена указанными типами клеток и встречается во многих других. NOS1 и NOS3 экспрессируются в тканях постоянно, при этом их активность тонко регулируется взаимодействиями с различными регуляторными белками, а также на уровне посттрансляционных модификаций. Например, на активность NOS1 и NOS3 влияет комплекс Ca^{2+} /кальмодулин. NOS1 и NOS3 обеспечивают постоянный уровень внутриклеточного $\cdot NO$. Синтез NOS2 индуцируется лишь при определенных условиях, например, в ответ на сигналы, запускаемые воспалительными процессами. При этом NOS2 активен даже при низких концентрациях Ca^{2+} [283,285,287].

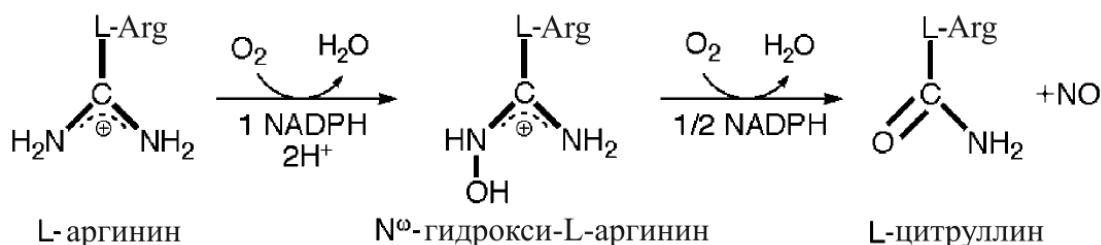


Рисунок 14. Схема реакции, катализируемой ферментами NOS. Адаптировано из [286].

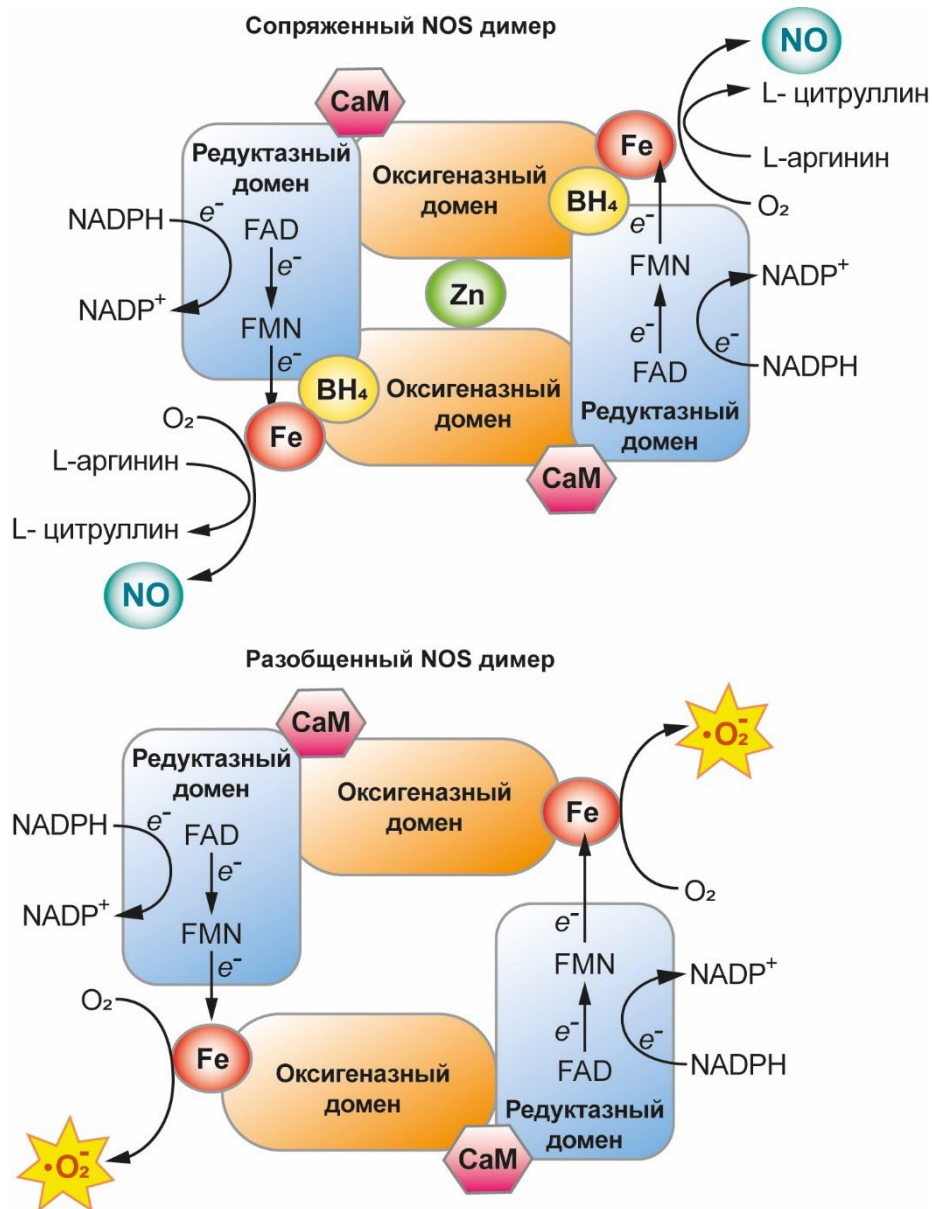
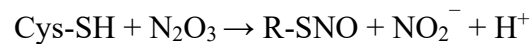
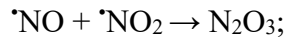
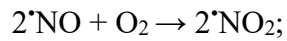


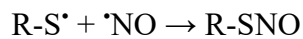
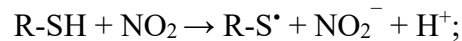
Рисунок 15. Схема функционирования NOS. *Сверху представлена схема нормального транспорта электронов с образованием конечных продуктов $\cdot\text{NO}$ и L-цитруллина. Zn^{2+} участвует в стабилизации структуры димера. Просходят реакции: 1) поток электронов: $\text{NADPH} \rightarrow \text{FAD} \rightarrow \text{FMN} \rightarrow \text{Fe}$ -содержащая гемовая группа $\rightarrow \text{O}_2$ и 2) окисление L-Arg. Снизу представлена схема биохимических событий при разобщении работы NOS, в этом случае протекает только первая реакция с образованием $\text{O}_2^{\cdot-}$. Адаптировано из [285].*

Свободный радикал $\cdot\text{NO}$ является довольно слабым окислителем (E^0 ($\cdot\text{NO}$, H^+/HNO) $\sim -0,55$ В) [288]. $\cdot\text{NO}$ нейтрален по заряду и поэтому способен проникать через клеточные мембраны, диффундируя на расстояния 50–1000 мкм [289]. Как и для большинства низкомолекулярных редокс-соединений существование $\cdot\text{NO}$ во внутриклеточной среде ограничено его взаимодействием с различными мишенями. $\cdot\text{NO}$ взаимодействует с ионами переходных металлов в составе гемов белков, изначально именно этот механизм регуляции функций белков был открыт для АФА. В частности, при взаимодействии $\cdot\text{NO}$ с гемом гуанилатциклазы происходят конформационные изменения белка, которые отражаются на

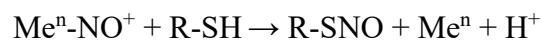
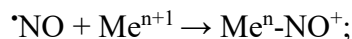
его ферментативной активности, в результате увеличивается уровень cGMP, что на физиологическом уровне через каскад реакций приводит к эффекту вазорелаксации [290]. Другим примером взаимодействия $\cdot\text{NO}$ с гем-содержащим белком является подавление комплекса IV дыхательной цепи митохондрий [291]. Однако вскоре выяснилось, что внутриклеточная роль $\cdot\text{NO}$ в качестве сигнальной молекулы не ограничивается лишь взаимодействием лишь с гемовыми белками. Вскоре были обнаружены модификации и других внутриклеточных макромолекул, вызванные взаимодействием с $\cdot\text{NO}$. Одной из таких модификаций является S-нитрозилирование -SH групп остатков Cys в белках с образованием S-нитрозотиола (-SNO), т.е. происходит ковалентное присоединение $\cdot\text{NO}$. Предполагается также, что нитрозилирующим агентом является не сам $\cdot\text{NO}$, а некоторые его производные [292]. Например, предполагаемыми нитрозилирующими агентами могут быть и другие оксиды азота, которые образуются в результате автоокисления $\cdot\text{NO}$:



NO_2 не обязательно вступает в реакцию с $\cdot\text{NO}$ и может сразу прореагировать с -SH с образованием тиильного радикала $\text{-S}\cdot$, который превращается в -SNO при взаимодействии с радикалом $\cdot\text{NO}$. Также в окружении $\cdot\text{NO}$ уже может присутствовать $\text{-S}\cdot$:



S-нитрозилирование белков может происходить также с участием металлических центров, в которых при взаимодействии с $\cdot\text{NO}$ образуется нитрозоний NO^+ . Если поблизости присутствует подходящая -SH группа, то также образуется -SNO:



В качестве примера можно привести автонитрозилирование гемоглобина [292]. Описываемый механизм достаточно прост и при этом обратим, что делает его универсальным для регуляции различных белков с самым разнообразными функциями, например, рецепторы, различные ферменты, белки цитоскелета [293]. Однако не все -SH группы могут подвергаться S-нитрозилированию. Преимущественно в реакцию вступают редокс-активные остатки в непосредственной близости от генерации $\cdot\text{NO}$ [293–295]. Эти же остатки могут подвергаться и другим модификациям, в том числе необратимым с участием АФК. И в этом контексте S-нитрозилирование Cys белков, таким образом, может выступать в роли защитного механизма от необратимого переокисления. Косвенным подтверждением служит тот факт, что развитие патологических состояний ассоциировано с изменением

профиля S-нитрозилирования белков [296,297]. Другая интересная особенность заключается в возможности переноса группы -SNO с одного белка на другой белок, такой процесс называется транснаитрозилированием. Для этого нитрозилированный остаток одного белка должен провзаимодействовать с подходящим остатком другого белка, в результате чего может быть осуществлен перенос. Такой процесс может проходить последовательно от одной мишени к другой, что обеспечивает передачу сигнала даже к областям клетки, удаленным от генерации $\cdot\text{NO}$ [298]. В конечном итоге S-нитрозилирование белков чаще всего приводит формированию внутри- или межмолекулярной S-S связи с дальнейшим вовлечением этого белка в реакции тиол-дисульфидного обмена клетки. Однако данная модификация может также регулироваться со стороны Trx и Grx с высвобождением $\cdot\text{NO}$ [299,300].

Самым реакционноспособным среди АФА является пероксинитрит (ONOO^-), который образуется в ходе реакции: $\text{O}_2^{\cdot-} + \cdot\text{NO} \rightarrow \text{ONOO}^-$. Константа скорости этой реакции составляет $6,7 \times 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ [301], что сопоставимо со значением $\sim 2 \times 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ для реакции взаимодействия SOD с $\text{O}_2^{\cdot-}$, которую мы обсуждали ранее. Таким образом, в условиях функционирования NOS и продукции $\text{O}_2^{\cdot-}$ очень высока вероятность образования ONOO^- .

ONOO^- представляет собой сильный окислитель ($E^0(\text{ONOOH}/\cdot\text{NO}_2) \sim 1,6 \text{ V}$) [302], который может взаимодействовать с различными мишенями в клетке, включая белки по разным аминокислотным остаткам, а также липиды, вызывая их перекисное окисление [142], нуклеиновые кислоты, внося повреждающие модификации как в азотистые основания, так и в сахарофосфатный остов [303–305]. Так, например, при взаимодействии с тиолом белка происходит двух-электронное окисление с образованием сульфеновой кислоты: $\text{ONOO}^- + \text{R-S}^- \rightarrow \text{R-SOH} + \text{NO}_2^-$. Если сравнивать схожую реакцию взаимодействия с H_2O_2 , то реакция некоторых S^- с ONOO^- протекает на три порядка быстрее [289]. Известно множество примеров белков, в которых окисление ключевых остатков Cys при взаимодействии с ONOO^- приводит к инактивации их функций, среди таких белков глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа [306], креатин киназа [307], белки электрон-транспортной цепи митохондрий [308].

Другой мишенью ONOO^- в белках являются остатки Tyr, к которому добавляется нитрогруппа ($-\text{NO}_2$) с образованием 3-нитротирозина. Реакция протекает не напрямую, а поэтапно по радикальному механизму с образованием промежуточного тирозильного радикала [309]. Этот процесс более выражен в присутствии переходных металлов, поскольку это способствует образованию дополнительных радикалов. Т.е. различные металлсодержащие белки, включая, например, SOD, могут катализировать реакцию нитрования Tyr [309]. Нитротирозин используют в качестве маркера образования ONOO^- в

системе. При многих заболеваниях отмечено увеличение данной модификации в белках [310], меняющей их функции. Митохондриальная SOD стала одним из первых обнаруженных подобных примеров, в результате нитрования Tyr34 происходит полная инактивация фермента [311]. ONOO^- оказывает подобный эффект нарушения функций на простаглицинсинтазу [312], Ca^{2+} -АТФ-азу (SERCA2A) [313], K^+ -каналы [314], тирозин гидроксилазу [315], белки цитоскелета [316–318] и многие другие.

ONOO^- окисляет остатки Met, образуя преимущественно метионинсульфоксид [319], эта модификация, как мы уже обсуждали ранее, является обратимой благодаря специализированным редуктазам Msr. Окисление Trp может привести к образованию целого ряда производных, среди которых нитротриптофан, N-формилкинуренин, оксиндол [319,320], при этом биологическая значимость таких модификаций в белках изучена недостаточно подробно на сегодняшний день.

ONOO^- в биологических условиях может взаимодействовать с CO_2 с образованием сильных радикалов: $\text{CO}_2 + \text{ONOO}^- \rightarrow \cdot\text{NO}_2 + \text{CO}_3^{\cdot-}$ [321]. При взаимодействии с CO_2 также может образоваться нестабильное соединение нитрозопероксикарбоксилат ONOOCO_2^- , которое подвергается распаду с образованием $\cdot\text{NO}_2$ и $\text{CO}_3^{\cdot-}$ [322].

Подводя итог, можно с уверенностью заключить, что АФА, как и АФК, являются важными редокс-модуляторами многочисленных внутриклеточных процессов. Модификации, которые образуют АФА при физиологических условиях, являются обратимыми и контролируются со стороны антиоксидантных систем клетки. Примечательно, что АФК и АФА действуют на схожие внутриклеточные мишени, например, в обоих случаях тиолы выступают ключевыми элементами, участвующими в передаче сигнала и модулировании свойств многих белков.

1.1.5. Активные формы серы (АФС)

В ходе нашего повествования мы уже не раз затрагивали примеры АФС. Собственно вся редокс-регуляция клеток во многом строится на тиол-дисульфидном обмене, который осуществляется многочисленными участниками различных реакций. Поэтому все обсуждаемые нами модификации тиоловых групп, такие как, образование сульфеновой, сульфиновой и сульфоновых кислот, а также дисульфиды, тиольные радикалы, нитрозотиолы можно с уверенностью отнести к биологически значимым АФС. Но на этом тема АФС не ограничивается. Было показано, что низкомолекулярные серосодержащие соединения также могут выступать в качестве важных сигнальных молекул. Примером служит сероводород H_2S , для которого в настоящее время известен

широкий набор внутриклеточных функций. H_2S рассматривают в качестве нейротрансмиттера, важного регулятора тонуса сосудов, также известно об его участии в воспалительных реакциях, выявлены защитные функции при окислительном стрессе в разных типах клеток [323]. О некоторых наиболее значимых АФС мы поговорим в данном разделе.

H_2S является токсичным газом с резким запахом, хорошо растворяется в водных растворах, где представляет собой слабую двухосновную кислоту со значениями $\text{pK}_1 \sim 7$ и $\text{pK}_2 > 12$, поэтому при физиологических условиях в большей степени представлен сульфид анионом $\text{H}_2\text{S} \rightarrow \text{HS}^- + \text{H}^+$ [324], хорошо проникает через липидный бислой [325]. H_2S является хорошим нуклеофилом и двух-электронным восстановителем (E^0 $\text{H}_2\text{S}/\text{S}_0 \sim -0,28$ В) [326], для сравнения при аналогичных условиях (водородный электрод, pH 7.0) E^0 GSSG/GSH составляет $\sim -0,26$ В [327]. Однако антиоксидантные свойства H_2S , как хорошего восстановителя, все же второстепенны в клетке по сравнению с GSH , поскольку важен не только потенциал, но и концентрация в клетке рассматриваемого соединения. H_2S присутствует в клетках в диапазоне концентраций $\sim 10\text{-}20$ нМ [328] против нескольких мМ для глутатиона [63].

H_2S образуется в клетках млекопитающих в ходе метаболизма серосодержащих аминокислот. На сегодняшний день известны три основных фермента, участвующих в генерации H_2S : цистатионин β -синтаза (ЦБС), цистатионин γ -лиаза/цистатионаза (ЦГЛ) и 3-меркаптопируват сульфотрансфераза (3-МСТ), причем перечисленные ферменты отличаются по субстратной специфичности, регуляции ферментативной активности, эффективности производства H_2S , а также по представленности в различных тканях [329]. Например, для центральной нервной системы в качестве генератора H_2S большее значение имеет ЦБС, хотя также отмечен вклад 3-МСТ. Для периферической нервной системы более выражен вклад ЦГЛ в производство H_2S . Для некоторых органов (печень, почки) все указанные ферменты участвуют в образовании H_2S [329]. ЦБС и ЦГЛ в качестве субстрата используют преимущественно цистеин или гомоцистеин, которые представлены в клетках в больших концентрациях. 3-МСТ, который в отличие от ЦБС и ЦГЛ локализован не только в цитозоле, но и матриксе митохондрий, в качестве субстрата использует 3-меркаптопируват [329]. На **рисунке 16** представлена наглядная схема образования H_2S с участием всех трех ферментов.

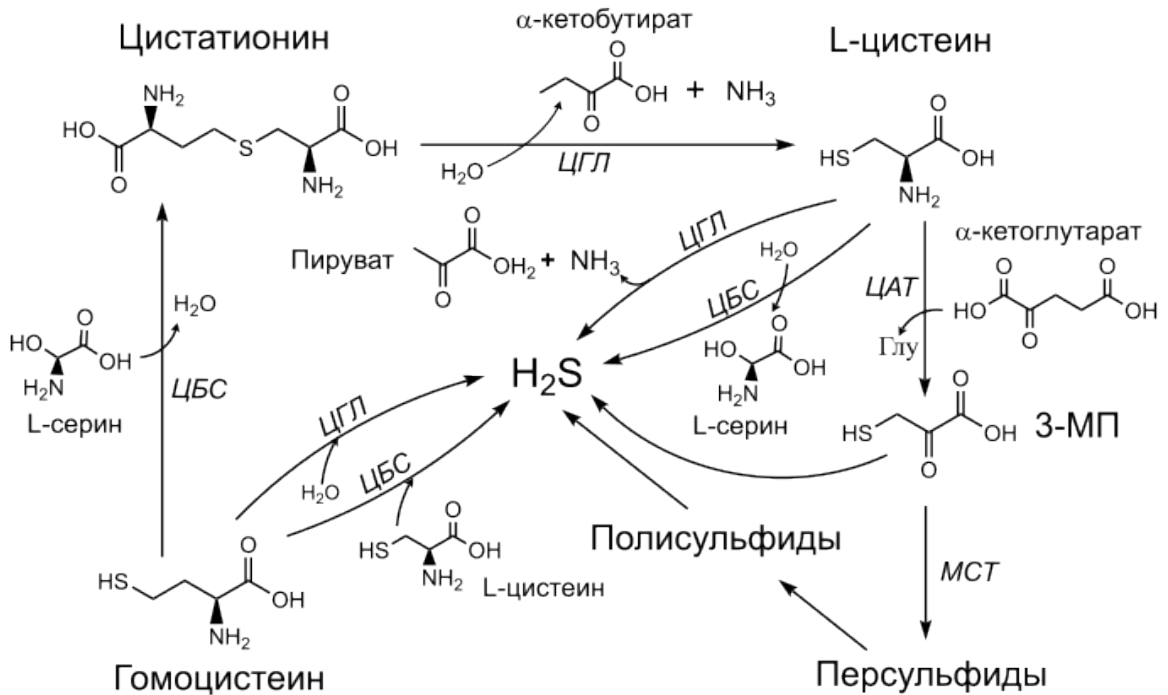


Рисунок 16. Основные пути образования H_2S в клетках млекопитающих. ЦБС, цистатионин β -синтаза; ЦГЛ, цистатионин γ -лиаза; ЦАТ, цистеинаминотрансфераза; МСТ, меркаптопируват сульфотрансфераза; 3МП, 3-меркаптопируват.

По отношению к большинству внутриклеточных дисульфидов H_2S демонстрирует слабую реакционную способность. При физиологических условиях (рН 7,4, 37 °С) HS^- реагирует со многими сильными двух-электронными окислителями, которые мы рассмотрели ранее. Например, константа скорости реакции HS^- с H_2O_2 невелика и составляет лишь $0,73 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, но значения констант реакций уже значительно выше при взаимодействии с ONO_2^- ($4,8 \times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) и HOCl ($8,0 \times 10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) [326]. При одноэлектронном окислении HS^- образуется сильный окислитель сульфгидрильный радикал HS^\bullet , который вступает в дальнейшие реакции по радикальному механизму [326]. H_2S также вступает в реакции с металлсодержащими белками, в этом случае может происходить восстановление металла с образованием HS^\bullet , или модификации происходят непосредственно по порфириновой части гемов [330]. Подобные взаимодействия изменяют свойства белков, причем в зависимости от концентрации H_2S эффект может быть разным для одного и того же белка. Например, известно, что H_2S взаимодействует с комплексом IV электрон-транспортной цепи митохондрий. При высоких концентрациях H_2S связывается с гемовыми центрами, оказывая ингибирующий эффект, что приводит к разобщению дыхательной цепи [331]. Однако при низких концентрациях H_2S действует как восстановитель, обеспечивая поток восстановительных эквивалентов и даже может напрямую восстанавливать цитохром *c* [332]. При высоких концентрациях взаимодействие

H_2S с гемовыми белками может приводить к образованию смеси тиосульфатов и железосвязанных полисульфидов [333].

АФС образуют пер- и полисульфиды – тоже важные модификации внутриклеточных мишеней. Как мы уже отметили, в большинстве случаев H_2S не реагирует напрямую с $-\text{SH}$ группами. Иначе обстоит ситуация с редокс-активными Cys, для которых, характерно низкое значение pK_a и соответствующее микроокружение, стабилизирующее тиолят анион $-\text{S}^-$. Мы обсудили, что такие остатки подвергаются различным модификациям, включая образование сульфеновой кислоты с последующим формированием S-S связей, s-глутатионилированию и s-нитрозилированию. Судя по некоторым экспериментальным данным, в биологических условиях H_2S демонстрирует слабую реакционную способность по отношению к S-S [334]. Но все другие перечисленные модификации R-S-SG, R-S-OH, R-S-NO представляют собой хорошие мишени для HS^- [335–337]. Образующиеся HSOH и HSSH в результате взаимодействия H_2S с другими низкомолекулярными редокс-активными соединениями могут взаимодействовать с $-\text{S}^-$ группами белков. Вышесказанное означает, что персульфидирование в клетке является неспецифичной модификацией, и любой модифицированный редокс-активный Cys может быть подвержен атаке со стороны HS^- . При этом персульфидирование меняет свойства белков, но данная модификация является обратимой, ее время жизни контролируют глутатион- и тиоредоксин-зависимые системы. На **рисунке 17** представлены обратимые реакции персульфидирования, которые возможны в клетках.

Существует и альтернативный взгляд на участие АФС в регуляции функций белков. Согласно некоторым данным модификации в белках образуются скорее не при взаимодействии с H_2S напрямую, а со смесью продуктов окисления сульфида – более реакционноспособных полисульфидов [326]. Например, есть предположения на основе экспериментальных данных о том, что именно полисульфиды следует рассматривать в качестве потенциальных сигнальных молекул, вызывающих, например, активацию TRP каналов и влияющих, таким образом, на Ca^{2+} -евый ток [338]. Другие исследования демонстрируют, что полисульфиды запускают сигнальный каскад, который приводит к активации транскрипционного фактора Nrf2 [339]. Таких примеров становится все больше, при этом многие вопросы по-прежнему недостаточно изучены. В частности, как именно образуются подобные АФС? Как достигается и может ли вообще достигаться специфичность при полисульфидировании белков? Ведь любой потенциальный редокс-активный Cys может атаковать любой участок полисульфида с образованием смеси продуктов реакции, отличающихся по длине (**рис. 17**).

Пер- и полисульфиды по сравнению с H_2S являются более реакционноспособными соединениями, проявляя как нуклеофильные, так и электрофильные свойства, т.е. одновременно обладают свойствами как тиолов, так и дисульфидов [340]. Поэтому полисульфиды могут вступать в реакции с низкомолекулярными тиолами или остатками Cys этого же или другого белка с образованием новых полисульфидных связей [326] (рис. 17). Еще одним существенным доказательством значимости пер- и полисульфидов в регуляции свойств белков стало открытие включения гидроперсульфида Cys (Cys-SSH) в некоторые белки на трансляционном уровне. Т.е. данная модификация не всегда носит посттрансляционный характер. Процесс происходит с участием цистеинил-тРНК-синтетаз, катализирующих синтез полисульфидов из Cys с последующим образованием Cys-S-(S)_n-H связанного с тРНК аддукта, который включается в белковую последовательность [341].

Регуляция АФС в клетке происходит как на уровне антиоксидантных систем, так и на уровне специальных механизмов нейтрализации избытка H_2S . Митохондриальный путь окисления H_2S является основным и наиболее изученным путем катаболизма H_2S . На внутренней мембране митохондрий фермент сульфохинон редуктаза катализирует двух-электронное окисление H_2S до тиосульфата $S_2O_3^{2-}$ в присутствии SO_3^{2-} или с образованием персульфида глутатиона GSSH, если акцептором выступает GSH. В ходе этой реакции также происходит восстановление убихинона, т.е. электроны от сульфида поступают в дыхательную цепь. $S_2O_3^{2-}$ нейтрализуется роданазой. Таким образом, катаболизм H_2S сводится к образованию GSSH, который в свою очередь окисляется до SO_3^{2-} и вновь высвобождается GSH в реакции, катализируемой персульфиддиоксигеназой. Сульфитоксидаза завершает катаболизм образованием SO_4^{2-} [326,337].

Рассматривая АФС, нельзя не остановиться на ключевых системах, которые поддерживают общий редокс-баланс клетки, во многом, как мы отмечали ранее, основанный на регуляции тиол-дисульфидного обмена. В настоящей главе, посвященной редокс-регуляции, мы неоднократно говорили о глутатионе – трипептиде γ -глутамилцистеинилглицине, состоящего из аминокислотных остатков Glu, Cys и Gly. Этот устойчивый трипептид является самым распространенным тиол-содержащим компонентом в клетках многоклеточных организмов. В некоторых клетках концентрация глутатиона может достигать 10 мМ [342,343]. Именно поэтому глутатион возведен в статус главного редокс-буфера клетки.

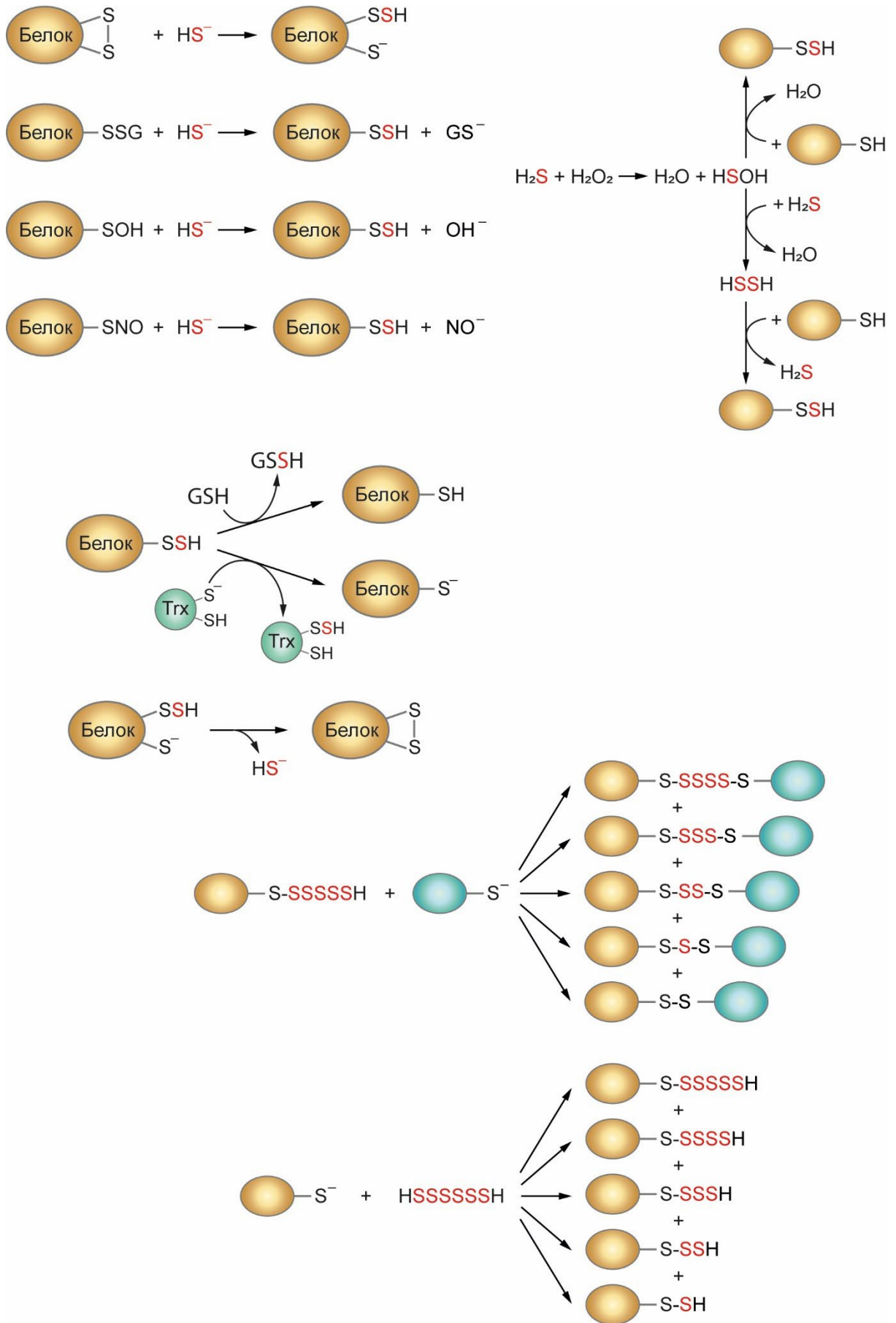


Рисунок 17. Внутриклеточные реакции с участием сульфидов и пер-/полисульфидов.

Адаптировано из [326].

Как уже было не раз отмечено, глутатион во внутриклеточной среде пребывает как в восстановленной форме (GSH), так и окисленной (GSSG), редокс-статус общего пула глутатиона зависит от соотношения этих форм 2GSH/GSSG, что отражает общий редокс-статус рассматриваемого клеточного компартмента в целом. Также глутатион формируют смешанные дисульфиды с разнообразными клеточными молекулами.

Синтеза глутатиона состоит из двух этапов. В первой реакции, катализируемой γ -глутамилцистеинсинтетазой [344], между γ -карбоксильной группой Glu и α -аминогруппой Cys образуется амидная связь, которая не узнается пептидазами именно из-за участия в формировании боковой карбоксильной группы Glu, что нетипично для внутриклеточных соединений. Глутатионсинтетаза на втором этапе синтеза катализирует формирование пептидной связи между γ -глутамилцистеином и Gly. Обе реакции ATP зависимы, а регуляция синтеза преимущественно происходит на уровне γ -глутамилцистеинсинтетазы [344–346]. Именно поэтому нарушения в работе данного фермента приводят к тяжелым последствиям. Фермент функционирует в виде гетеродимера, где одна субъединица выполняет каталитическую функцию, а другая регуляторную [344]. Наиболее опасны для клетки нарушения именно в каталитической части фермента. Например, мыши с нокаутом по гену этой субъединицы нежизнеспособны [347]. Нарушения работы регуляторной части фермента также связаны с развитием различных патологических состояний [348–351]. Ряд заболеваний также ассоциирован с нарушением глутатионсинтетазы – второго фермента в синтезе глутатиона [352].

В эукариотической клетке большая часть глутатиона содержится в цитозоле, где и происходит его синтез, однако и в других компартментах он содержится в значительных количествах и выполняет те же функции поддержания редокс-гомеостаза. GSH не может проникать через клеточные мембраны, поэтому в его переносе между внутриклеточными компартментами участвуют различные транспортные белки или каналы. Так, например, активно регулируется распределение GSH между цитозолем и ядром, отмечено общее повышение GSH в периоды фаз клеточного цикла G₁ и S [353]. Предполагают, что важную роль в переносе GSH из цитозоля в ядро выполняет белок Bcl-2, который формирует в ядерной мембране пору [354,355]. Пул митохондриального GSH также обособлен от цитоплазматического. Через внешнюю мембрану митохондрий GSH проходит свободно через порины [356], а через внутреннюю посредством регулируемого мембранного переносчика SLC25A39 [357]. В люмен эндоплазматического ретикулума GSH попадает через мембранный комплекс Sec61 [358].

GSH вовлечен во множество реакций тиол-дисульфидного обмена. Ранее мы обсудили, что Grx эффективно контролируют в клетках уровень пероксидов. В активном

центре Grx образуется смешанный конъюгат окисленного пероксидом каталитического Sec с GSH (Grx-Se-SG) с последующим взаимодействием со второй молекулой GSH для перехода в прежнее восстановленное состояние фермента. Таким образом, GSH является важным участником антиоксидантной системы клетки, участвующей в нейтрализации H_2O_2 и органических пероксидов.

Другая важная роль GSH заключается в его участии в правильном сворачивании различных белков за счет образования определенных S-S связей. Этот процесс происходит в люмене эндоплазматического ретикула с участием ферментов протеиндисульфидизомеразы (PDI), оксидазы (Ero1, QSOX) и некоторых пероксидаз (Prx4, Grx7/8) [359]. PDI представляют собой обширное семейство белков, они содержат Trx-подобный домен, редокс-активные Cys которого в каталитическом центре взаимодействуют с Cys других белков [360]. Для редокс-состояния функциональной PDI важен GSH [361,362]. PDI вступает в реакции взаимодействия с -SH группами белков, в результате происходит тиол-дисульфидный обмен с формированием S-S связи белка-субстрата, при этом PDI восстанавливается. Однако для функционирования PDI должен постоянно переходить в окисленное состояние, что обеспечивают ферменты Ero1 и Prx4 [363,364]. Ero1 окисляется напрямую O_2 [365], в результате в качестве побочных продуктов реакции образуются АФК. Поэтому пул GSH также выступает в качестве главного редокс-буфера данного компартмента [366].

Универсальными тиол-дисульфидными редуктазами являются белки глутаредоксины (Grx), которые восстанавливают S-S связи в различных белках, а также смешанные дисульфиды, образованные с GSH [61]. Grx взаимодействует с S-S связью белка с образованием смешанного конъюгата. Далее редокс-активные остатки Cys в составе Grx формируют S-S связь, при этом белок-субстрат восстанавливается. Обратное восстановление Grx происходит при его прямом взаимодействии с GSH без участия какого-либо фермента. В ходе этой реакции окисленный Grx образует смешанный дисульфид с GSH, который восстанавливается второй молекулой GSH, в результате чего образуется вновь восстановленный Grx и окисленный GSSG. Аналогичным образом Grx может восстанавливать смешанные дисульфиды белков с GSH, при этом конъюгат формируется с GSH, который также восстанавливается с участием второй молекулы GSH [367]. Разные представители Grx демонстрируют высокую степень сходства по структуре. Характерной структурной особенностью являются четыре β -листа, которые окружены тремя α -спиралями. Классическими примерами такого строения являются Grx1 и Grx3 из *E. coli* [59]. Для некоторых Grx характерно наличие дополнительного домена, например, для Grx2 из *E. coli* [368]. Отличия между Grx могут быть по активному центру, так, например, нередко

встречаются Grx с одним редокс-активным Cys [59]. Для эукариот характерны классические дитиольные Grx и монотиольные, которые устроены либо по принципу домена с одним Cys, либо имеют гибридный, так называемый Trx-Grx-подобный домен. Примером классически организованного белка является митохондриальный Grx5, цитозольный Grx3 как раз имеет такую гибридную структуру [369].

В результате редокс-реакций от двух молекул GSH пара электронов переходит к восстанавливаемому акцептору, при этом образуется дисульфид GSSG. Редокс-статус пула глутатиона поддерживает NADPH-зависимый фермент глутатионредуктаза (GR) [65]. GR функционирует в виде гомодимера и помимо NADPH использует в качестве кофактора FAD, который принимает восстановительные эквиваленты от NADPH. В человеческой GR S-S связь сформирована между редокс-активными Cys58 и Cys63. Образование FADH^- нарушает эту связь [370]. В результате Cys58 восстанавливается, а между тиолятом второго Cys и FAD образуется комплекс с переносом заряда. Окисленный NADP^+ заменяется еще одной молекулой восстановленного NADPH, после чего фермент готов к связыванию GSSG. Благодаря нуклеофильной атаки Cys63 дисульфида GSSG, чему способствует наличие поблизости остатка His467, в активном центре GR образуется смешанный дисульфид Cys58-SG. После этого оставшийся GS^- протонируется от His467, и высвобождается первая молекула GSH. Вторая молекула GSH высвобождается, когда между Cys58 и Cys63 вновь формируется S-S связь, Cys63 нуклеофильно атакует сульфид с участием Cys58 вновь с высвобождением GS^- , который захватывает H^+ из среды [370]. Таким образом, GR поддерживает внутриклеточный уровень глутатиона преимущественно в восстановленном состоянии. Недостаточность по GR ассоциирована с развитием ряда заболеваний [371,372].

Общая схема функционирования глутатион-зависимой системы представлена на рисунке 18.

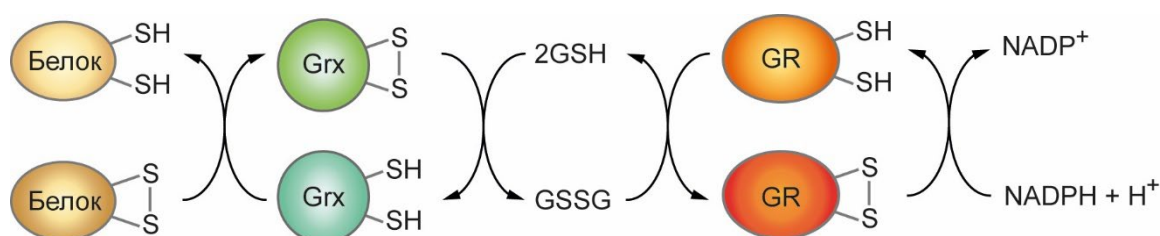


Рисунок 18. Схема глутатион-зависимой системы. Дисульфидные связи в белках могут быть восстановлены белками Grx, восстановление которых в свою очередь происходит не ферментативным путем при взаимодействии с GSH. Поддержание пула глутатиона в восстановленном состоянии обеспечивает GR, используя для этого восстановительные эквиваленты NADPH. Представлен дитиольный механизм.

Взаимодействие глутатиона с белками является важным механизмом регуляции их функций. Причем глутатионилирование может происходить как по редокс-активным Cys, так и по остаткам, которые не вовлечены в редокс-функции белков. Глутатионилирование белков по Cys, входящим в активные центры, приводит к изменению ферментативной активности напрямую, однако свойства белка могут быть изменены и при глутатионилировании менее активных Cys, поскольку такие модификации могут приводить к конформационным перестройкам структуры. Глутатион взаимодействует с белками как спонтанным образом, так и гораздо эффективнее при участии специализированных ферментов глутатионтрансфераз GST [373,374]. Степень выраженности глутатионилированного состояния белков напрямую зависит от показателя 2GSH/GSSG, отражающего общее редокс-состояние среды. Например, повышенное глутатионилирование белков наблюдается при окисляющих условиях, причем как патологических, например, при ишемии/реперфузии [375], так и физиологических, например, при генерации АФК в ходе реализации сигнальных функций [376–378]. Глутатионилирование белков по редокс-активным Cys в условиях повышенной продукции окислителей может обеспечивать защиту этих остатков от необратимых модификаций, вызванных перекислением, например, от образования сульфоновой кислоты. Эффект глутатионилирования может быть реализован на уровне регуляции транскрипционных факторов. Повышение АФК в среде приводит к глутатионилированию некоторых факторов, которые запускают транскрипционный ответ клетки на общий окислительный стресс. Например, глутатионилирование модулирует сигналинг с участием NF- κ B [379], p53 [380]. Глутатионилирование является обратимой модификацией белков, как мы обсуждали, обратную реакцию осуществляют Grx [381].

Помимо прямого участия в тиол-дисульфидном обмене GSH также вовлечен во взаимодействие с АФА и опосредует их эффекты. В частности, s-нитрозоглутатион (GSNO) является одним из наиболее распространенных внутриклеточных нитрозотиолов. GSNO стабильное соединение, которое может перемещаться по разным внутриклеточным компартментам и вступать в реакции транс-нитрозилирования с различными белками, включая различные факторы транскрипции и рецепторы, и, таким образом, влиять на их функции [382–384]. При взаимодействии GSNO с тиоредоксин-зависимой системой вновь высвобождаются GSH и \cdot NO [385], поэтому путь образования GSNO можно рассматривать своего рода механизмом депонирования \cdot NO в клетке.

Важно отметить, что GSH хоть и является широко распространенным соединением, но, во-первых, встречается все же далеко не во всех клетках, и, во-вторых, роль главного редокс-буфера может отводиться не ему одному. Так, например, среди схожих по функциям

тиолсодержащих соединений можно назвать микотиол у актиномицетов [386], глутатионамид у аэробных серобактерий [387], бациллитиол у разных представителей *Bacillus*, *Streptococcus* и *Staphylococcus* [388]. Ткани некоторых растений, в частности, бобовые, содержат глутатион и гомоглутатион (γ -глутамилцистеинил- β -аланин), при этом глутатион в больших количествах содержится в семенах, а гомоглутатион в листьях и корнях [389,390]. В растения встречаются и другие аналоги GSH, например, в злаковых найден γ -глутамилцистеинилсерин, выполняющий ту же функцию [391]. У разных организмов могут встречаться отличия не только по GSH, но и на уровне всей глутатион-зависимой системы. Так, например, у дрозофил, трипаносом, лейшмании отсутствует GR, поэтому восстановление GSSG в их клетках берет на себя другие системы: тиоредоксиновая или трипанотионовая [392,393].

Помимо глутатион-зависимой системы в поддержании общего тиол-дисульфидного баланса клетки важный вклад вносит тиоредоксин-зависимая система. Во многом функции двух этих систем перекрываются. Ключевую роль в этой системе играют небольшие белки тиоредоксины (Trx), содержащие два редокс-активных остатка Cys в составе консервативного мотива CGPC. Благодаря этим остаткам Trx вовлечены в реакции тиол-дисульфидного обмена с другими белками, в результате такого взаимодействия Trx восстанавливают дисульфиды в различных белках и окисляются сами. Trx являются хорошими восстанавливающими агентами со значением E^0 в пределах -0,23 – -0,28 В [165,176], в сравнение представители двух-Cys Grx обладают чуть меньшей восстанавливающей способностью со значением E^0 в диапазоне -0,2 – -0,23 В [165,394]. Для клеток млекопитающих характерна цитозольная изоформа Trx1, которая при определенных условиях может секретироваться, а также локализованная в матриксе митохондрий Trx2 [395]. Trx взаимодействуют со многими белками, восстанавливая их, в том числе с выполняющими антиоксидантную функцию, например, Prx, метионинсульфоксид редуктазами [395]. В свою очередь, окисленные Trx восстанавливаются специализированными ферментами тиоредоксинредуктазами (TrxR). Это димерный белок, в активном центре содержится Sec, а в качестве кофактора используются FAD и NADPH. В ходе каталитического цикла NADPH используется для восстановления дисульфидной связи между редокс-активными Cys в активном центре одной субъединицы. Селенолят-анион другой субъединицы TrxR взаимодействует с окисленным Trx с образованием селенилсульфида между Trx и TrxR, с последующим высвобождением восстановленного Trx благодаря атаке на эту связь расположенного рядом Cys. Образовавшийся внутренний селенилсульфид на субъединице TrxR затем восстанавливается тиолят-анионом второй субъединицы. В результате селенолят-анион вновь готов к взаимодействию со следующей

молекулой окисленного Trx при наличии восстановительных эквивалентов в виде NADPH [396].

В клетках млекопитающих TrxR представлены тремя изоформами: цитозольной TrxR1, митохондриальной TrxR2 и ядерной гибридной редуктазой, обнаруженной в семенниках, которая может восстанавливать как Trx, так и глутатион [397]. TrxR могут восстанавливать не только Trx, но и другие субстраты. Так, например, митохондриальный Grx2 может быть восстановлен как при взаимодействии с GSH, так и с TrxR [398]. Еще одним субстратным белком для TrxR является PDI [399]. Помимо белков TrxR могут восстанавливать и некоторые низкомолекулярные редокс-активные компоненты клетки. Например, TrxR восстанавливает дегидроаскорбат до аскорбата [400].

Общая схема функционирования тиоредоксин-зависимой системы представлена на рисунке 19.

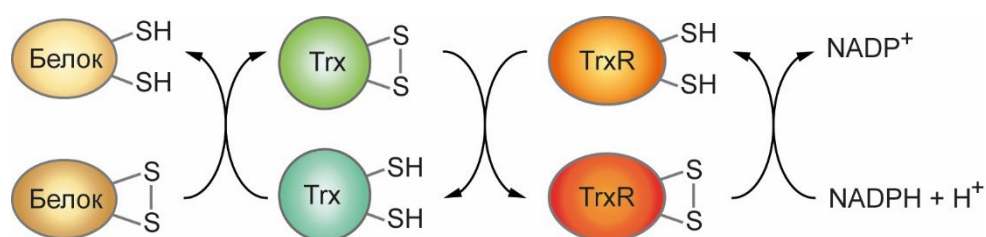


Рисунок 19. Схема тиоредоксин-зависимой системы. Дисульфидные связи в белках могут быть восстановлены белками Trx, восстановление которых осуществляется специализированными NADPH-зависимыми ферментами TrxR.

В этом разделе мы рассмотрели основных участников редокс-регуляции клетки. Внутриклеточные редокс-процессы разнообразны и образуют тонко регулируемую сеть взаимодействий, детальный масштаб описания которых достоин отдельной книги. В своем повествовании я сосредоточился на низкомолекулярных редокс-активных компонентах, их роли в клетках, основных путях образования и систем контроля. Именно низкомолекулярные соединения с высокой реакционной способностью и, как следствие, крайне малым временем существования в среде долгое время оставались вне поля зрения исследователей, главным образом, из-за отсутствия подходящих методов их изучения. В наши дни редокс-биология переживает очередной динамичный этап развития. Во многом этому способствовало развитие генно-инженерных технологий. В частности, с помощью генетически кодируемых молекулярных инструментов впервые была визуализирована динамика ключевых редокс-активных соединений в живых системах как при физиологических, так и патологических процессах. Настоящая работа посвящена разработкам и применению генетически кодируемых биосенсоров на базе флуоресцентных белков для визуализации редокс-процессов, в том числе в моделях *in vivo*. Второй раздел

данной главы посвящен анализу всех доступных на сегодняшний день инструментов данного типа.

1.2. ФЛУОРЕСЦЕНТНЫЕ ГЕНЕТИЧЕСКИ КОДИРУЕМЫЕ БИОСЕНСОРЫ

1.2.1. Определение термина биосенсор

В широком смысле термин «*биосенсор*» чаще всего ассоциируется с аналитическим прибором, в основе которого лежит принцип использования биохимических реакций для определения концентрации исследуемого аналита. В качестве примера можно привести популярные биосенсоры для определения уровня глюкозы в крови, который коммерчески доступен и массово используется населением по всему миру. Работу этого прибора обеспечивает фермент глюкозооксидаза, которая окисляет β -D-глюкозу. Благодаря току высвобождающихся электронов в данном процессе возможно измерение концентрации глюкозы в образце. Первый такой биосенсор для регистрации глюкозы на основе фермента был разработан в 1962 году биохимиком Leland Clark. В основе этого изобретения, как и других последующих подобных устройств, лежит идея амперометрического сенсора L. Clark, успешно реализованная им несколькими годами ранее при создании кислородного электрода [401,402]. Использование различных ферментов в подобных устройствах привело к появлению целого ряда аналитических приборов, позволяющих пользователям определять в среде, прежде всего в крови и плазме, важнейшие параметры: лактат (на основе лактатоксидазы или лактатгидрогеназы) [403], холестерин (на основе холеستيриноксидазы) [404] и некоторые другие. В современных приборах-биосенсорах в основе их функционирования и чувствительности к рассматриваемому параметру лежат не только биологические молекулы, такие как ферменты, иммуноглобулины, нуклеиновые кислоты, но также отдельные органеллы и даже живые клетки.

Настоящая работа посвящена разработке и применению *генетически кодируемых флуоресцентных биосенсоров*. В данном случае термином биосенсор подчеркивается биологическая природа сенсора. Речь будет идти о биосенсорах, которые по своей природе являются белковыми молекулами, кодируемыми генами. Нельзя не упомянуть сенсоры на основе РНК, которые приобретают все большую популярность в современных исследованиях [405]. Такие биосенсоры не рассматриваются в контексте данной работы по причине того, что формируют отдельную категорию молекулярных инструментов, разработка и применение которых не является целью настоящего исследования.

Итак, любой белок можно называть сенсорным, если он взаимодействует с определенным внутриклеточным параметром и изменяет некоторые свойства в ответ на это

взаимодействие. Например, сенсорный домен белка может окисляться по ключевым аминокислотным остаткам или наоборот восстанавливаться, фосфорилироваться или дефосфорилироваться, подвергаться ряду других модификаций [406,407]. Изменения в свойствах сенсорных белков могут быть вызваны изменениями концентраций некоторых ионов, различных соединений, выступающих в роли метаболитов и сигнальных молекул, а также изменениями некоторых физических характеристик системы, например, температуры. Ярким примером природных сенсорных белков, которые встречаются как в прокариотических, так и эукариотических клетках, являются факторы транскрипции – это белки, которые путем связывания специфичных участков ДНК влияют на процесс транскрипции. По своей структуре факторы транскрипции довольно схожи, несмотря на огромное их разнообразие. Чаще всего они состоят из функционально различающихся доменов, одни из которых (может быть один или несколько) ответственен за связывание определенной последовательности ДНК, тогда как другая структурная часть белка выступает в роли сенсорного домена, которая как раз осуществляет взаимодействие с другими белками или аналитами различной природы. Т.е. сенсорный домен в зависимости от конкретных внутриклеточных условий определяет, в каком состоянии находится ДНК-связывающая часть белка, осуществляя, таким образом, регуляцию транскрипции генов [408–410]. Примерами служат повсеместно распространенные редокс-чувствительные факторы, функционирование которых регулируется АФК, АФА или АФС [411,412]. Существует также множество примеров лиганд-связывающих транскрипционных факторов, например, ацил-КоА-связывающий фактор FadR [413], NAD⁺ и NADH-связывающие факторы семейства Rex [414], хинон-связывающий фактор QsrR [415] и многие другие.

На роль природных сенсоров могут претендовать белки и с другими внутриклеточными функциями. Среди них белки периплазмы грамотрицательных бактерий, которые специфично связывают субстрат, обеспечивают его транспорт и могут участвовать в различных сигнальных каскадах клетки. Примерами являются глюкоза/галактоза-связывающий белок [416], мальтоза-связывающий белок [417], фосфонат-связывающий белок PhnD [418], гистидин-связывающий белок HisJ [419] и другие.

В целом, при таком подходе биологическим сенсором можно считать любой белок, который специфично реагирует на изменение внутриклеточного параметра, запуская механизмы ответа клетки на эти изменения. К этой категории белков также могут быть отнесены различные рецепторы, например, связывающие адреналин и норадреналин α -2 адренорецепторы [420], ацетилхолиновые мускариновые рецепторы [421], дофаминовые

рецепторы [422], сенсорные части различных ферментов, например, диацилглицерол-связывающий домен протеинкиназа С [423], инозитол фосфат-связывающие домены гомологии плекстрина (РН-домен) различных белков [424,425] и многие другие. Перечисление вышеописанных примеров свидетельствует о том, что разнообразие сенсорных доменов белковой природы чрезвычайно обширно.

Однако если речь идет о биосенсорах, как инструменте для исследований, то каким образом можно выявить изменения свойств конкретного белка при взаимодействии с конкретным стимулом на фоне многообразия молекулярных событий, которые непрерывно протекают в клетках? Любой биосенсор, как инструмент, какой бы природы он ни был, должен обеспечивать возможность исследователю считывать сигнал, по изменению которого можно судить о состоянии и динамике исследуемого параметра. В биосенсорных аналитических приборах таким сигналом является интенсивность протекания заданной биохимической реакции или процесса. При этом взаимодействия чувствительных биоэлементов с аналитами преобразуются в наиболее универсальные для считывания сигналы, удобные для обработки. По аналогии с приборами изменения в белковых молекулах тоже можно переводить в более универсальный считываемый сигнал. Мы будем рассматривать преобразования свойств белковой молекулы во флуоресцентный сигнал.

Различные синтетические флуоресцентные красители давно используются в биологии [426–428], в частности, широко применяется иммунофлуоресцентное окрашивание биологических образцов с использованием антител с флуоресцентными метками [429]. По-настоящему революционные изменения в области медико-биологических исследований произошли с открытием зеленого флуоресцентного белка (GFP, green fluorescent protein). Гены флуоресцентных белков можно экспрессировать практически в любой биологической системе исследования, не нарушая ее целостности, и в этом неоспоримое преимущество GFP. Именно GFP-подобные белки активно используют в качестве флуоресцентного модуля для биосенсоров. В этом случае на уровне гена создается конструкция, состоящая из выбранного сенсорного белкового домена и флуоресцентного белка. Функционирование сенсорного домена отражается на спектральных характеристиках флуоресцентного, что позволяет переводить флуоресцентный сигнал в динамику конкретного параметра.

Поскольку флуоресцентные GFP-подобные белки являются основой функционирования рассматриваемых нами флуоресцентных генетически кодируемых биосенсоров, разработке и применению которых посвящена данная работа, рассмотрим основные свойства таких белков.

1.2.2. Флуоресцентные белки и биосенсоры на их основе

Явление флуоресценции известно с давних пор. Сам термин «флуоресценция» был введен еще в 1852 году исследователем George Stokes, который описал явление излучения света в видимой области спектра минералом флюоритом при его облучении в ультрафиолетовой области. На сегодняшний день известно множество флуоресцирующих соединений самой разнообразной природы: от полупроводниковых кристаллов до сложных органических молекул. Многие флуоресцирующие соединения имеют биологическую природу, среди них кумарины, алкалоиды, полиены, некоторые флавоноиды и ряд других [430]. В 1962 году Osamu Shimomura и его коллеги открыли миру зеленый флуоресцентный белок GFP, выделенный из медузы *Aequorea victoria* [431]. Было установлено, что GFP вместе с Ca^{2+} -зависимым белком экворинном формирует биолюминисцентную систему медузы. В ходе реакции декарбоксилирования целентеразина экворин испускает свет в синей области видимого света [432,433]. Однако *A. victoria* флуоресцирует не в синей, а в зеленой области спектра (~ 510 нм). Обнаруженный в этой системе дополнительный белок оказался тем самым компонентом, способным переизлучать синий свет в зеленый [434]. По-прежнему ведется дискуссия о биологической роли такой системы, но при этом научный мир получил уникальный генетически кодируемый флуоресцирующий инструмент. В 1992 году командой Douglas Prasher был получен ген GFP [435]. Флуоресцентные свойства белка заложены в его структуре и не требуют каких-либо дополнительных кофакторов или условий. Поэтому экспрессия гена GFP в различных клетках и тканях экспериментальных объектов наделяет их флуоресцентными свойствами [436], с этого открытия интерес к GFP-подобным белкам значительно возрос в контексте возможности их применения в различных исследовательских подходах. GFP в руках исследователей позволяет изучать активности интересующих промоторов, визуализировать внутриклеточные структуры, наблюдать за локализацией и пространственно-временной динамикой интересующих белков и т.д.

GFP представляет собой небольшой белок (~ 27 кДа) с характерной структурой β -бочонка, образованной 11-ю β -листами. Через внутреннюю часть бочонка проходит α -спираль, в центре которой автокаталитически формируется хромофор [437] (**рис. 20**). Такая структура отличается высокой стабильностью, поэтому GFP устойчив к нагреванию, изменению pH и воздействию агрессивных агентов [438].

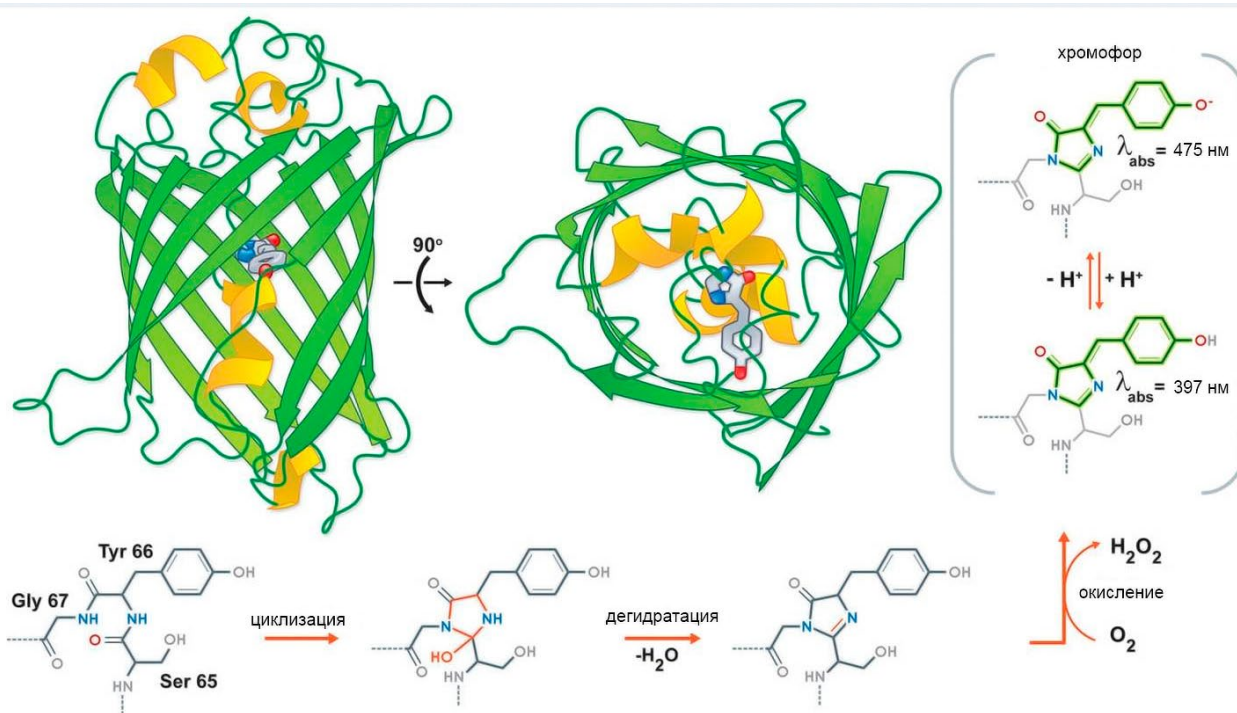


Рисунок 20. Структура GFP (вид сбоку и сверху, PDB ID. 1EMA). Адаптировано из [439].

Хромофор GFP представлен аминокислотной последовательностью Ser65-Tyr66-Gly67, его созревание протекает в несколько этапов. На первом этапе происходит обратимая реакция формирования имидазолинона между сближенными в пространстве Ser65 и Gly67 [440]. Для созревания хромофора необходимо O_2 , в настоящий момент считается, что реакция окисления формирующегося хромофора является лимитирующей в данном процессе и протекает по радикальному механизму [441,442]. В результате окисления и дегидратации в структуре образуются двойные связи, участвующие в формировании сопряженной системы π -орбиталей. Обсуждается вопрос об очередности реакций дегидратации и окисления в процессе созревания хромофора (рис. 21). По одному предполагаемому механизму промежуточный продукт стабилизируется дегидратацией. Более новые полученные данные свидетельствуют в пользу того, что за быстрой стадией циклизации происходит окисление интермедиата с выделением H_2O_2 , а уже затем стадия дегидратации завершает формирование зрелого хромофора [443].

Для хромофора важно его окружение. Структура β -бочонка изолирует его от внутриклеточной среды, в том числе от тушителей флуоресценции, например, O_2 [444]. Кроме того, фиксация хромофора белковым окружением предотвращает безызлучательные пути релаксации энергии [445]. Наличие гидроксильной группы Тир в составе хромофора GFP определяет его протонированное и депротонированное состояния, которые

демонстрируют поглощение света с разной длиной. Для протонированной формы максимум поглощения составляет 395 нм, для депротонированной – 475 нм [446]. Важно, что облучение обеих форм хромофора вызывает одинаковую эмиссию флуоресценции с максимумом в области 500 нм, для депротонированного состояния характерно лишь небольшое (в диапазоне нескольких нм) смещение в коротковолновую область [447].

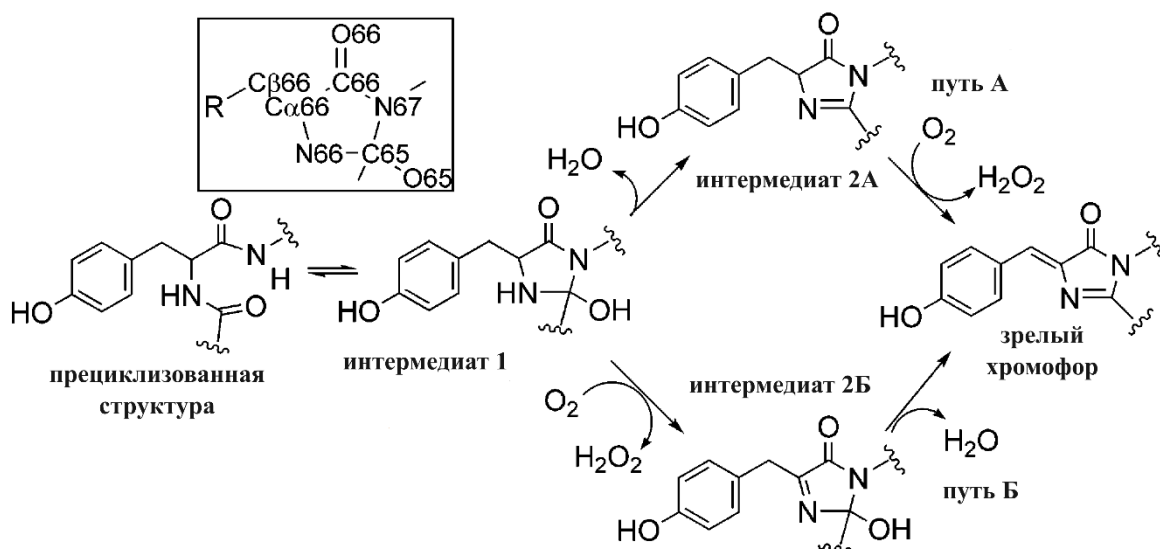


Рисунок 21. Схема возможных реакций формирования хромофора GFP. *Адаптировано из [443].*

Возбуждение GFP светом с длиной волны 395 нм дает также слабый пик эмиссии с максимумом 450 нм, однако это состояние нестабильно, эмиссия в пикосекундном диапазоне смещается до обозначенного максимума 500 нм. Этот процесс замедляется при низких температурах или в случае использования изотопа водорода дейтерия. Причина в том, что возбужденное состояние хромофора характеризуется переносом H⁺ (ESPT, excited state proton transfer). Был установлен механизм этого процесса. При поглощении света рK_a гидроксильной группы хромофора существенно снижается, что и приводит к потере H⁺, который по системе водородных связей перемещается на Glu222. Именно депротонированная форма хромофора флуоресцирует, затем H⁺ совершает обратный путь. Таким образом, независимо от того, какая из форм хромофора возбуждается, флуоресцирует именно анионная [447–449]. Упомянутое выше небольшое различие в несколько нм в максимуме эмиссии флуоресценции при возбуждении отдельных форм хромофора объясняется тем, что для этих состояний хромофора характерны отличия в микроокружении [450]. В протонированном состоянии между 146 и 148 остатками образована водородная связь, Glu222 пребывает ионизированным. При переходе в

депротонированную форму происходят структурные изменения, в результате которых His148 и Thr203 стабилизируют алкоголят-анион водородными связями, Glu222 принимает протонированную форму. В случае возбуждения и последующем участии в ESPT протонированной формы хромофорное окружение не успевает перестроиться и принять конфигурацию, характерную для фенолят-аниона, в результате существует промежуточное состояние [446], и это влияет на распределение электронной плотности, что приводит к небольшому сдвигу пика эмиссии.

Позже были обнаружены GFP-подобные белки в других организмах, причем не только в кишечнополостных (по-другому их еще называют стрекающими), но также в ракообразных (CpYFP, Ex. 508 нм/Em. 518 нм) [451] и даже представителе хордовых – ланцетнике (bfloGFPa1, Ex. 500 нм/Em. 512 нм) [452]. Примечательно, что модифицированные из ланцетника белки в настоящий момент являются одними из самых ярких, среди них тетрамерный LanYFP (Ex. 513 нм/Em. 524 нм) и полученный из него мономерный вариант mNeonGreen (Ex. 506 нм/Em. 517 нм) [453]. На настоящий момент лидерство по яркости среди GFP-подобных белков несет AausFP1, как и первоначальный вариант, полученный из медузы (*Aequorea australis*). Работа, посвященная этому белку, была опубликована в 2020 году. Интересно, что этот белок содержится в тканях медузы в очень малом количестве, поэтому был обнаружен в результате анализа транскриптома с целью поиска новых гомологов [454]. Обнаруженный AausFP1 (Ex. 504 нм/Em. 510 нм) обладает яркостью, превышающей mNeonGreen в 1,8 раз, а наиболее популярный до этого EGFP в 5 раз. Из недостатков AausFP1 формирует димеры и склонен к агрегации в некоторых системах. В 2022 году вышла работа, в которой описывается еще один новый белок StayGold (Ex. 496 нм/Em. 505 нм), выделенный из медузы *Cytaeis uchidae* – это яркий белок, сравнимый с mNeonGreen, но он также формирует димеры [455]. Поэтому самым ярким мономерным FP, что важно для решения некоторых экспериментальных задач, пока по-прежнему остается mNeonGreen. И по сей день ведутся работы над поиском и оптимизацией недавно обнаруженных белков, поэтому, вне всякого сомнения, мировая коллекция FP будет пополняться новыми вариантами.

Свойства FP стали предметом исследований сотней лабораторий по всему миру. Оказалось, что характеристики этих белков существенно отличаются в зависимости от аминокислотных остатков в хромофоре и его окружении. В результате появилась целая коллекция модифицированных FP с различными свойствами. Например, важным оказался аминокислотный остаток в положении 66, это положение в структуре GFP занимает Туг. Замена Туг на любой другой ароматический остаток приводит к изменению спектральных свойств. Так, если в положении 66 будет находиться Phe, то спектр сдвинется в

коротковолновую область (Ex. 360 нм/Em. 442 нм) [437]. Позже за счет дополнительных мутаций этот вариант белка ультрамаринового цвета, получившего название Sirius, был улучшен [456]. Появление в этой же позиции His, характерное, например, для белка EBFP [457], также смещает спектр в коротковолновую область, но с чуть меньшим эффектом (Ex. 380 нм/Em. 448 нм). Для белков с Trp66 характерна циановая область спектра, к которым относится, например, популярный белок Cerulean (Ex. 433 нм/Em. 475 нм) [458]. Коллекция в этой области цветовой палитры в настоящий момент насчитывает несколько вариантов с разными свойствами: CyPet [459], mCerulean3 [460], mTurquoise2 [461], Aquamarine [462]. Внесение точечных замен в хромофорное окружение GFP позволило сдвинуть спектральные характеристики в длинноволновую область. Ключевая мутация Thr203Tyr (данная позиция расположена в ближайшем окружении хромофора) привела к получению желтой версии белка EYFP (Ex. 513 нм/Em. 527 нм) [444,463]. В дальнейшем были получены оптимизированные версии желтых белков Citrine [464] и его улучшенная мономерная версия Citrine2 [465], а также Venus [466], отличающийся по сравнению с первой версией повышенной стабильностью флуоресцентного сигнала в условиях колебаний pH и концентрации ионов галогенов.

Новый виток развития в области исследований FP произошел благодаря команде под руководством С.А. Лукьянова, они обнаружили красные белки в кораллах [467]. Первый такой белок DsRed (Ex. 558 нм/Em. 583 нм) был получен из кораллов рода *Discosoma* [467]. DsRed отличается от GFP гомолога повышенной яркостью и устойчивостью к изменениям pH, однако формирует строгие тетрамеры [468] в отличие от слабого димера GFP. Кроме того, DsRed отличается более медленным созреванием. Оказалось, что у этого белка в ходе созревания хромофора присутствует дополнительная стадия дегидрирования [469]. Тетрамерная структура DsRed накладывает некоторые ограничения на его применения в живых системах, например, мечения им определенных белков и клеточных структур. Нарушение в области, ответственной за олигомеризацию DsRed, приводило к потере его флуоресцентных свойств. В результате кропотливой работы, в ходе которой было подобрано и внесено более 30 мутаций в структуру белка, была получена мономерная версия mRFP1, однако отличающаяся слабой флуоресценцией [470]. И все же, несмотря на все трудности, именно RFP представляют большой интерес для исследователей в качестве инструмента. Их уникальность не просто в том, что они являются еще одной флуоресцентной меткой, спектрально отличающейся от голубых и зеленых белков, что позволяет их комбинировать одновременно в исследуемой системе. Дело в том, что биологические ткани плохо пропускают свет с длиной волны короче 600 нм из-за поглощения различными молекулами, например, гемоглобином. Поэтому при

использовании GFP в глубоких слоях тканей живых объектов наблюдается высокий уровень автофлуоресценции, что затрудняет или в некоторых случаях делает наблюдения вовсе невозможными. Таким образом, RFP гораздо лучше других гомологов подходят для *in vivo* исследований. Полученный мономер mRFP1 в дальнейшем подвергли модификациям, что в результате привело к созданию целого семейства белков на его основе [471]. Среди них яркий, хоть и смещенный в коротковолновую область mOrange2 (Ex. 549 нм/Em. 565 нм) [472], а также истинно красные mApple (Ex. 568 нм/Em. 592 нм) [472], mStrawberry (Ex. 574 нм/Em. 596 нм) [471], mCherry2 (Ex. 589 нм/Em. 610 нм) [473], а также дальнекрасные mGrape3 (Ex. 608 нм/Em. 646 нм) [474], mPlum (Ex. 590 нм/Em. 649 нм) [475]. Среди производных DsRed стоит отметить tdTomato (Ex. 554 нм/Em. 581 нм) [471] и версию RRvT [476] – самые яркие представители FP в этой области спектра.

Еще одна группа красных флуоресцентных белков получилась в результате модификации белка, полученного из морского анемона *Entactmaea quadricolor*. Первыми были получены белки eqFP578 (Ex. 552 нм/Em. 578 нм), на основе которого появился TagRFP [477], а также eqFP611 (Ex. 559 нм/Em. 611 нм) [478], производным которого является mRuby3 (Ex. 558 нм/Em. 592 нм) [479]. Полученные варианты красных белков из *E. quadricolor* позволили получить более яркие дальнекрасные варианты по сравнению с производными DsRed, среди которых следует отметить mKate2 (Ex. 588 нм/Em. 633 нм) [480], mNeptune2 (Ex. 599 нм/Em. 651 нм) [481]. По яркости mNeptune2 примерно в 5 раз превосходит mPlum. С потерей яркости удалось сдвинуть спектральные характеристики mNeptune в еще более длинноволновой диапазон с получением версии mNeptune684 (Ex. 604 нм/Em. 684 нм) [482].

Не только спектральные, но и различные другие уникальные особенности представителей FP могут оказаться полезными в реализации определенных задач. Например, белок Kaede изначально созревает зеленым белком с типичным строением хромофора, однако после облучения коротковолновым светом в ультрафиолетовом диапазоне происходит разрыв в цепи и последующее образование новой двойной связи с формированием хромофора уже с красной эмиссией (Ex. 508 нм/Em. 518 нм, после облучения УФ Ex. 572 нм/Em. 580 нм) [483]. Такой белок можно использовать в качестве фотоактивируемой метки. Некоторые белки, напротив, отличаются высокой фотостабильностью, например, красный белок mStable (Ex. 597 нм/Em. 633 нм), что хорошо подходит для конфокальной микроскопии со сверхвысоким разрешением [484].

В 2008 году Osamu Shimomura, Martin Chalfie и Roger Tsien были удостоены Нобелевской премии за открытие и изучение свойств GFP. Популярность FP объясняется их генетическим кодом. Ген такого белка может быть доставлен практически в любые типы

клеток различных организмов, включая растения, позвоночных и беспозвоночных животных. Продукт экспрессии обладает свойствами к флуоресценции без каких-либо дополнительных физических или химических факторов. Это делает технологию чрезвычайно простой в своей реализации, все что требуется – доставить ген белка в нужную систему. Кроме того, FP также на уровне гена можно «сшить» с любым другим белком интереса и, таким образом, следить за его распределением. Добавление специальной полипептидной метки, также на уровне гена, позволяет локализовать FP в интересующем внутриклеточном компартменте.

Итак, FP придают оптические свойства выбранной модели исследования будь то клетка или ее конкретная органелла или ткани живого организма. На основе FP были разработаны сотни молекулярных инструментов для прижизненной визуализации внутриклеточных процессов. Рассматривать все имеющееся их многообразие нецелесообразно в рамках представляемой работы. Мы сосредоточимся на группе флуоресцентных редокс-биосенсоров, поскольку представляемая работа вносит вклад именно в область разработок и применений данной категории молекулярных инструментов. Однако прежде, чем перейти к рассмотрению редокс-биосенсоров, все же необходимо описать некоторые общие принципы в основе функционирования биосенсоров на базе GFP-подобных белков.

1.2.2.1 Флуоресцентные белки – биосенсоры активности промоторов

FP уже самого по себе можно рассматривать в качестве биосенсора, например, активности интересующего промотора. Если поместить ген FP под контроль конкретного промотора, то его активация, вызванная изменением определенных внутриклеточных параметров, приведет к наработке белка и, следовательно, появлению и дальнейшему увеличению интенсивности флуоресценции (**рис. 22**). M.Chalfie, один лауреатов Нобелевской премии за открытие FP, поместил ген GFP под промотор, который регулирует синтез тубулина в нейронах *C.elegans* [436]. Некоторые промоторы активны постоянно, другие строго регулируются и могут активироваться/подавляться при конкретных внутриклеточных условиях. Подход, основанный на активации промотора, используют в том числе для исследования редокс-процессов.

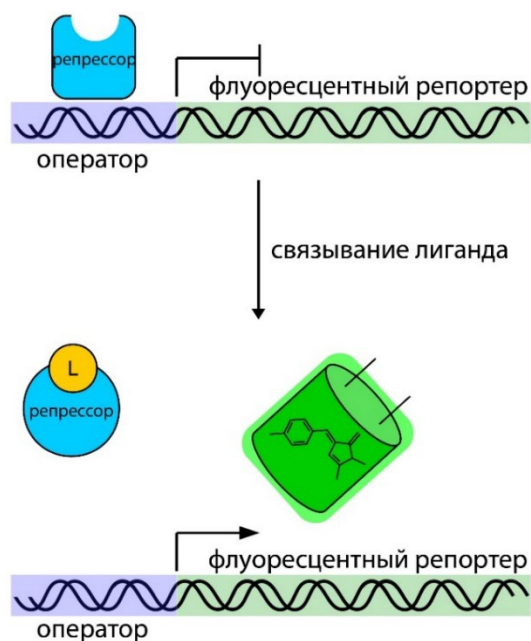


Рисунок 22. Схема возможного применения FR в качестве биосенсора на активность исследуемого промотора. На примере репрессора, который при связывании лиганда диссоциирует от промоторной области ДНК, что в дальнейшем запускает транскрипцию гена FR.

Хорошим примером является предложенная система pSenSox, позволяющая оценить редокс-статус NADP в клетках *E.coli* [485]. Принцип работы этой системы основан на том, что транскрипционный фактор SoxR из *E.coli* окисляется $O_2^{\cdot-}$ благодаря наличию в структуре [2Fe-2S] кластера, это приводит к экспрессии гена *soxs* [486–488]. Продукт экспрессии этого гена, белок SoxS, активирует экспрессию нескольких генов регулона SoxRS [489]. Восстановление SoxR осуществляется NADPH-зависимыми системами, таким образом, редокс-состояние пула NADP напрямую влияет на регулон SoxRS [490,491]. Если в такой системе по каким-то причинам снижается NADPH, то SoxR будет дольше пребывать в окисленной форме, что обеспечивает экспрессию гена *soxs*. В описываемой системе авторы поместили ген FR под контроль промотора *soxs*. Это позволяет по флуоресцентному сигналу определять, какие из клеток *E.coli* имеют сниженный уровень NADPH при заданных условиях [485]. Аналогичный подход был реализован для разработки системы, позволяющей оценить в клетках *S.cerevisiae* редокс-статус NAD. Для этого также использовали ген FR, который поместили под контроль промотора глицерол-3-фосфат дегидрогеназы [492]. По такому же принципу созданы системы, позволяющие оценить в клетке малонил-КоА [493], некоторые аминокислоты [494,495], фенольные соединения [496] и другие. Однако такие сенсорные системы не универсальны, их можно использовать лишь в конкретных клетках, чаще именно в конкретных микроорганизмах, имеющих необходимых белковый набор, который обеспечивает функционирование таких систем. Поэтому такие системы чаще всего используют для различных скринингов с использованием бактериальных клеток [497].

Кроме того, динамика флуоресцентного сигнала такой системы не отражает внутриклеточные события в реальном времени.

1.2.2.2 Флуоресцентные белки и их модифицированные версии, чувствительные к определенным параметрам

Спектральные свойства некоторых FP, несмотря на их стабильную структуру, все же чувствительны к изменению определенных внутриклеточных параметров. Например, мы обсуждали ранее, что остаток Туг в составе хромофора GFP из *A.victoria* пребывает в протонированном и депротонированном состояниях, которые различаются спектрально: протонированная форма поглощает при 398 нм, депротонированная – при 475 нм. Равновесие между заряженной и не заряженной формами хромофора чувствительно к изменению значений pH окружающей среды [498]. Чувствительность к изменениям pH свойственна многим хромофорам GFP-подобных белков [499,500]. Такие FP по своей сути уже являются флуоресцентными pH-биосенсорами [501]. Среди зеленых pH-биосенсоров встречаются как интенсимометрические (с одним пиком в спектре возбуждения), например, pHluorin (pK_a 7,1) [502] и mWasabi (pK_a 6,5) [503], так и более удобные для применения ратиометрические версии (с двумя пиками в спектре возбуждения), например, ratiometric pHluorin (pK_a 6,9) [504], его улучшенная версия ratiometric pHluorin2 (pK_a 7,1) [505], а также представители deGFP с разными значениями pK_a в диапазоне 6,8 – 8,0, что удобно при выборе подходящего инструмента при заданных условиях pH [499]. Среди желтых FP, которые можно использовать в качестве pH-биосенсоров, следует отметить интенсимометрические EYFP (pK_a 7,1) [506] и Citrine (pK_a 5,7) [464], а также ратиометрические версии EⁿGFP (pK_a 6,4– 7,5) [507,508]. Среди красных белков наиболее pH-чувствительными являются pHoran4 (pK_a 7,5) и pHuji (pK_a 7,7) [509]. Ратиометрический красный pH-биосенсор pHRed (pK_a 7,8) представлен версией белка mKeima, для которого характерен самый большой Стоксовский сдвиг (около 180 нм) [510].

Некоторые FP чувствительны к изменению ионов галогенов, поэтому версии с таким свойством также можно применять в качестве биосенсора. Например, YFP подвергается тушению флуоресценции при увеличении Cl⁻, поскольку его отрицательный заряд дестабилизирует фенолят-анион хромофора и смещает равновесие в нейтральное состояние [511]. Таким образом, увеличение в системе Cl⁻ приводит к снижению интенсивности флуоресценции. Важную роль в механизме взаимодействия белка с Cl⁻ приписывают остатку Туг203 [512]. К настоящему времени получены мутантные версии YFP с разной чувствительностью к анионам галогенов. Так, например, получены версии более чувствительные к Cl⁻ и мутант, который более чувствителен к I⁻ [513]. Позже

появился биосенсор Cl-YFP, который чувствителен к Cl^- ($K_d \sim 14$ мМ) при этом с низким значением pK_a (pK_a 5,9) [514]. Другой подход реализован в биосенсоре ClorHensor, который позволяет одновременно мониторить динамику Cl^- и pH. Инструмент был создан на основе E²GFP и «сшитого» с ним красного белка DsRed, спектральные свойства которого не чувствительны к колебаниям Cl^- и H^+ , поэтому он используется в качестве стабильного флуоресцентного сигнала в этой системе [515].

FP могут выступать в роли биосенсоров не только химических, но и физических параметров. Так, внесение в последовательность YFP трех остатков Gly между Asn144 и Tyr145 непосредственно перед 7 β -листом привело к созданию сенсора на гидростатическое давление [516]. Внесение дополнительных аминокислот вблизи хромофора создает небольшое пространство, которое доступно для молекул воды. При увеличении гидростатического давления увеличивается интенсивность флуоресценции белка. Авторы объясняют механизм тем, что в норме молекулы воды находятся внутри образованной полости вблизи хромофора, оказывая эффект тушения, однако при увеличении давления эта полость освобождается, что увеличивает интенсивность флуоресценции данной пробы [516].

Многочисленные примеры доказывают, что модификации флуоресцентных белков приводят к получению версий с самыми разнообразными свойствами. Впервые команда под руководством Winther предприняла удачную попытку создать версию FP, который мог бы участвовать во внутриклеточном тиол-дисульфидном обмене. Эта интересная идея была реализована введением двух мутаций Asn149Cys и Ser202Cys, расположенных на соседствующих β -листах. Таким образом, между Cys149 и Cys202 возможно образование S-S связи при определенных редокс-условиях. При этом восстановленное и окисленное состояния такого белка, названного gxYFP, отличаются спектрально. Это связано с тем, что образование S-S связи в структуре gxYFP вызывает изменения в окружении его хромофора [517]. На сегодняшний день редокс-активные FP составляют обширное и популярное семейство биосенсоров. Мы поговорим о них в следующем разделе, посвященном рассмотрению редокс-биосенсоров.

На **рисунке 23** представлены схемы обсуждаемых примеров.

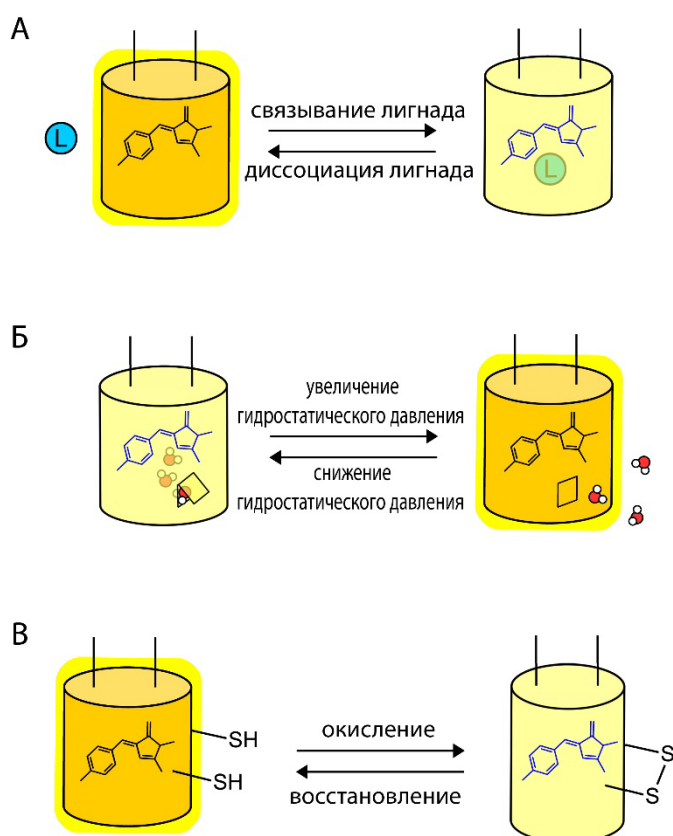


Рисунок 23.

Схемы функционирования FP и их модифицированных версий в качестве биосенсоров на определенные внутриклеточные параметры.

(А) Прямое взаимодействие белков с определенными лигандами, большинство примеров для ионов.

(Б) Модифицированный FP в качестве биосенсора на гидростатическое давление.

(В) FP, чувствительный к редокс-изменениям.

1.2.2.3 Биосенсоры, состоящие из сенсорного домена и флуоресцентного белка

Более классическая организация структуры биосенсора представлена отдельным сенсорным доменом, роль которого специализирована на взаимодействии с изучаемым параметром, и FP, визуализирующим данное взаимодействие.

Транслокационные биосенсоры можно классифицировать как наиболее простые в данной категории. При определенных внутриклеточных состояниях некоторые белки изменяют свою локализацию в клетке. Визуализировать этот процесс можно мечением такого белка флуоресцентном доменом (**рис. 24А**). Примером являются биосенсоры на фосфоинозитиды, в этом случае к FP присоединяют на уровне гена домен, который связывает фосфоинозитиды. В результате регистрируют перераспределение флуоресценции между цитозолем и клеточными мембранами [518]. Другой пример представляет биосенсор, построенный на основе фосфатидилсерин-связывающего домена белка лактадгерина [519]. На принципе подбора лиганд-связывающего домена и присоединения к нему FP построены биосенсоры для регистрации концентрации сАМР [520] и активации β 2-адренорецепторов [521]. Такие биосенсоры достаточно просты в разработке, но интерпретация результатов, полученных с их помощью, иногда становится сложной задачей. Например, внутриклеточная локализация таких проб может зависеть не только от конкретного исследуемого параметра, но и от некоторых других факторов.

Сенсорный домен в составе биосенсора может напрямую воздействовать на FP при определенных обстоятельствах. Например, в биосенсорах группы geNOps для регистрации NO в качестве сенсорного домена был выбран транскрипционный фактор *E.coli* NorR, содержащий Fe^{2+} в центре не гемовой природы. Связывание NO этим доменом в непосредственной близости от хромофора влияет на его флуоресцентные свойства, поскольку происходит перераспределение электронной плотности для определенных аминокислотных остатков, формирующих хромофор (**рис. 24Б**) [522].

Другой пример основан на FP, в структуру которого внесены поверхностные редокс-активными Cys, что, как мы обсудили ранее, вовлекает такой модифицированный FP во внутриклеточные реакции тиол-дисульфидного обмена. Если к такому модифицированному белку через полипептидный линкер присоединить определенный белок, участвующий в конкретном редокс-преобразовании, то можно добиться визуализации динамики конкретной реакции. Например, соединение с Grx на несколько порядков увеличивает скорость тиол-дисульфидного обмена такого FP с пулом глутатиона (**рис. 24В**) [523]. Редокс-активные Cys FP будут вступать во взаимодействия с другими системами, если в этой конструкции Grx заменить на другой белок, по такому принципу были созданы биосенсоры на H_2O_2 с использованием пероксидазы Orp [524], микотиол с использованием микоредоксина [525], редокс-статус Trx [526].

Большую группу образуют биосенсоры, функционирование которых основано на конформационных перестройках. В этом случае сенсорный домен взаимодействует с определенным параметром, например, подвергается специфичному окислению (**рис. 24Г**) или связывает конкретный лиганд (**рис. 24Д**). В результате взаимодействия с целевым параметром сенсорная часть претерпевает конформационные перестройки, которые передаются на флуоресцентный домен. Изменение структуры флуоресцентного белка даже на уровне микроокружения его хромофора сказывается на спектральных характеристиках. Таким образом, по изменению флуоресцентного сигнала можно судить о состоянии сенсорной части и, следовательно, о состоянии соответствующего внутриклеточного параметра. Однако нативная структура FP очень стабильна и демонстрирует высокую устойчивость в условиях химических и физических воздействий. Для увеличения лабильности структуры FP применяют подход круговой пермутации. Процесс круговой пермутации белка подразумевает слияние его природных N- и C- концев через пептидный линкер, при этом новые концы образуются в другом участке последовательности. В некоторых случаях такая перестановка в последовательности может быть достигнута посредством серии посттрансляционных модификаций, примером является пермутант панкреатического ингибитора трипсина [527]. Гораздо проще этот механизм реализовать на

уровне гена, для этого достаточно поменять местами половины гена рассматриваемого белка. Изначально, этот подход применили для доказательства того, что для правильного сворачивания структуры белка важен состав полипептидной цепи, а не расположение ее N- и C- концов [528–530]. Оказалось, что и в FP перестановка N- и C- концов не приводит к потере их оптических свойств [531,532].

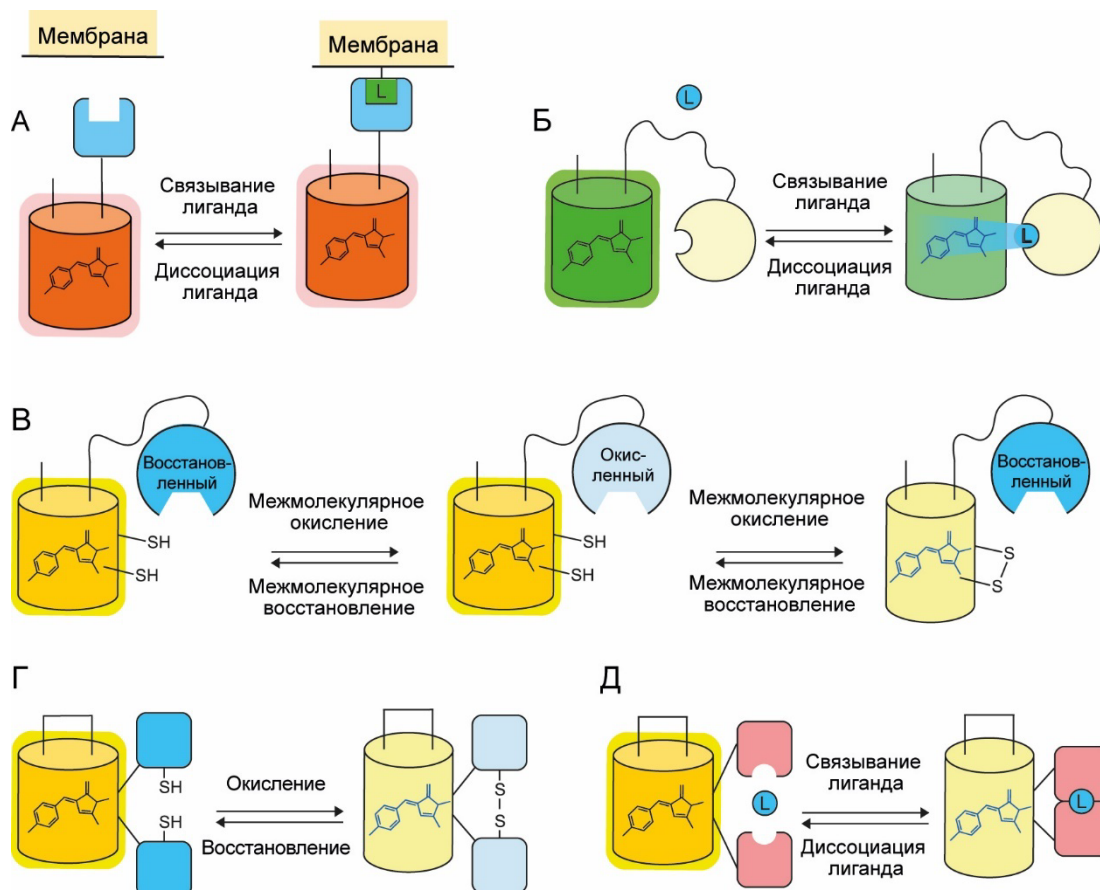


Рисунок 24. Схемы генетически кодируемых биосенсоров на основе сенсорного домена и одного флуоресцентного белка. (А) Транслокационные биосенсоры, которые в зависимости от целевого лиганда меняют свою локализацию в клетке. (Б) Биосенсоры, основанные на принципе прямого взаимодействия хромофора с сенсорным доменом, связавшим лиганд. (В) Редокс-чувствительные флуоресцентные белки, связанные с сенсорными доменами, что определяет их специфичность к конкретным редокс-преобразованиям в клетке. (Г) Биосенсоры на основе кругового пермутанта флуоресцентного белка, интегрированного в структуру сенсорного редокс-домена. При окислении сенсорного домена в ответ на специфичный стимул происходят конформационные перестройки, передающиеся на флуоресцентный белок с изменением его спектральных характеристик. (Д) Биосенсоры на основе кругового пермутанта флуоресцентного белка, интегрированного в структуру лиганд-связывающего домена. При связывании конкретного лиганда сенсорный домен претерпевает конформационные перестройки, передающиеся на флуоресцентный белок с изменением его спектральных характеристик.

Технология получения круговых пермутантов FP (cpFP) позволила получить версии с более подвижными структурами и лабильными спектральными характеристиками. В структуре cpFP новые N- и C-концы образуются на поверхности β -бочонка в непосредственной близости от хромофора, а прежние концы соединяются полипептидным линкером. В результате, если такой белок соединить с интересующим сенсорным доменом, то вызванные конформационные перестройки будут гораздо эффективнее передаваться на окружение хромофора, что приводит к более выраженным изменениям спектральных свойств (рис 25).

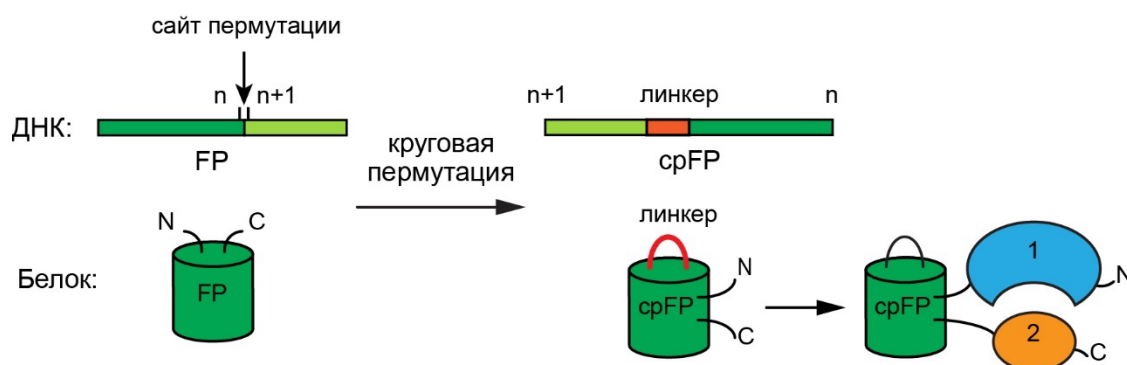


Рисунок 25. Круговая пермутация флуоресцентных белков и биосенсоры на их основе. На уровне ДНК переставляются половины белка, в результате исходные N- и C- концы соединяются пептидным линкером, а новые образуются поблизости от хромофора. Такой белок через пептидные линкеры может быть интегрирован между взаимодействующими доменами 1 и 2, выполняющими сенсорную функцию. Это могут быть части одного домена, разные домены или субъединицы одного белка, 1 и 2 по своей природе также могут быть разными взаимодействующими белками.

Впервые идея использования cpFP в качестве основы для биосенсоров была реализована для Pericams [533] и G-CaMP [534] для регистрации динамики Ca^{2+} . В данном случае в качестве сенсорной части выступают взаимодействующие друг с другом кальмодулин и фрагмент киназы легких цепей миозина.

1.2.2.4 Биосенсоры на основе двух флуоресцентных белков

Обширный класс биосенсоров построен на FRET (Forster Resonance Energy Transfer) взаимодействиях FP. FRET представляет собой процесс безызлучательной передачи энергии между двумя соседними хромофорами, которые составляют FRET пару. Для осуществления FRET спектр эмиссии хромофора-донора должен перекрываться со спектром возбуждения флуоресценции хромофора-акцептора. Другое необходимое условие для FRET заключается в пространственном расположении хромофоров, они должны находиться в непосредственной близости с подходящей пространственной ориентацией магнитных моментов. Таким образом, эффективностью FRET можно управлять, сближая

или отдаляя расстояние между подобранными хромофорами в паре. Этот принцип был реализован при разработке многих биосенсоров. Как правило, сенсорный домен в таких биосенсорах фланкирован FRET парой – двумя FP. При взаимодействии сенсорной части с исследуемым параметром, например, при связывании определенного лиганда, происходят конформационные изменения, которые изменяют пространственное расположение двух FP, которые сближаются или отдаляются друг от друга, что влияет на эффективность FRET (**рис. 26А**). На этом принципе созданы биосенсоры для регистрации, например, Ca^{2+} [535], глюкозы [536], лактата [537], пирувата [538] и множества других параметров. Система хорошо подходит для анализа активности интересующих протеаз. Для этого последовательность, содержащую протеолитический сайт, необходимо разместить между функционирующей FRET парой. Если при определенных внутриклеточных состояниях активность интересующей протеазы возрастает, то разрыв пептидной связи в таком белке приведет к потере переноса энергии (**рис. 26Б**). Очевидно, что такие биосенсоры на протеазную активность по своей природе необратимы.

Однако не всегда в биосенсорах на основе двух FP целью является реализация механизма FRET взаимодействия. В некоторых случаях дополнительный FP необходим, чтобы обеспечить ратиометрический характер сигнала (**рис. 26В**). Напомним, что для некоторых FP в спектрах возбуждения и эмиссии флуоресценции характерно по одному пику. В этом случае сигнал является интенсимоетрическим. Если в структуре биосенсора находится два FP, то характер сигнала будет ратиометрическим: для каждого белка своя длина возбуждения и свой максимум эмиссии. Но ратиометрическими могут быть биосенсоры и на основе одного FP, в спектре возбуждения флуоресценции которых два пика. На **рисунке 27** схематично изображена разница между интенсимоетрическими и ратиометрическими биосенсорами на основе FP. Биосенсоры с ратиометрическим сигналом удобнее в применении. Разная интенсивность флуоресценции интенсимоетрического биосенсора при сравнении образцов может быть связана не только с изменениями целевого параметра, но и с разным уровнем экспрессии гена биосенсора, изменении формы объектов, их толщины или подвижности. Ратиометрический тип сигнала позволяет исследователю избежать подобных артефактов. Например, при увеличении концентрации ратиометрического биосенсора в системе, например, по мере наработки белка, интенсивность флуоресценции будет одинаково нарастать в обоих флуоресцентных каналах, таким образом, соотношение (*ratio*) интенсивностей в этих каналах изменяться не будет. О том, как работают ратиометрические биосенсоры, мы будем обсуждать далее на конкретных примерах редокс-биосенсоров.

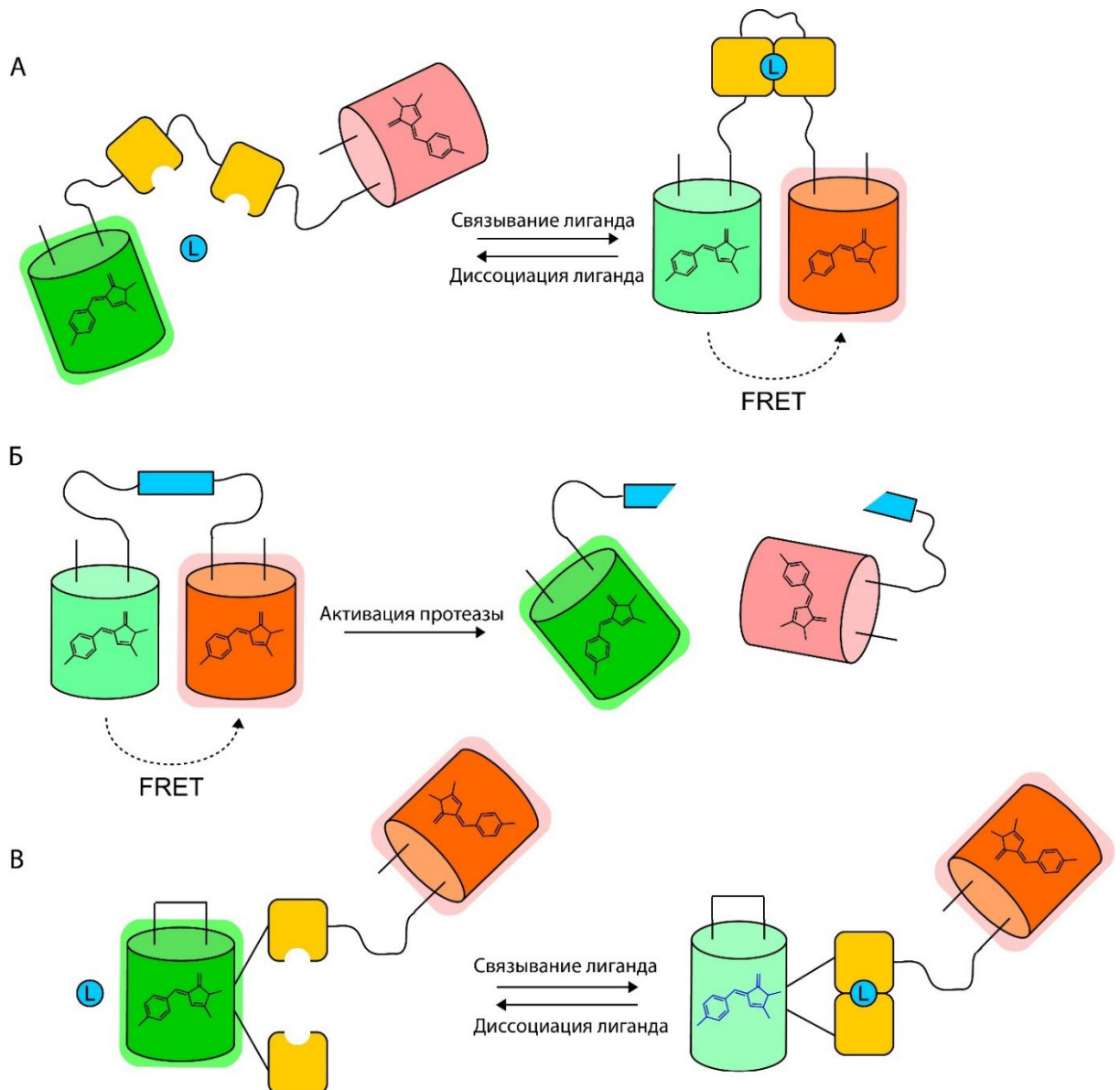


Рисунок 26. Схемы генетически кодируемых биосенсоров на основе сенсорного домена и двух флуоресцентных белков. (А) Биосенсоры на основе FRET взаимодействий. При связывании сенсорным доменом определенного лиганда происходят конформационные изменения, которые влияют на расположение друг относительно друга участников FRET пары. (Б) Биосенсоры на основе FRET взаимодействий для оценки активности протеаз. (В) Биосенсоры на основе двух флуоресцентных белков, где один выполняет функцию контроля и обеспечивает ратиометрическое поведение сигнала.

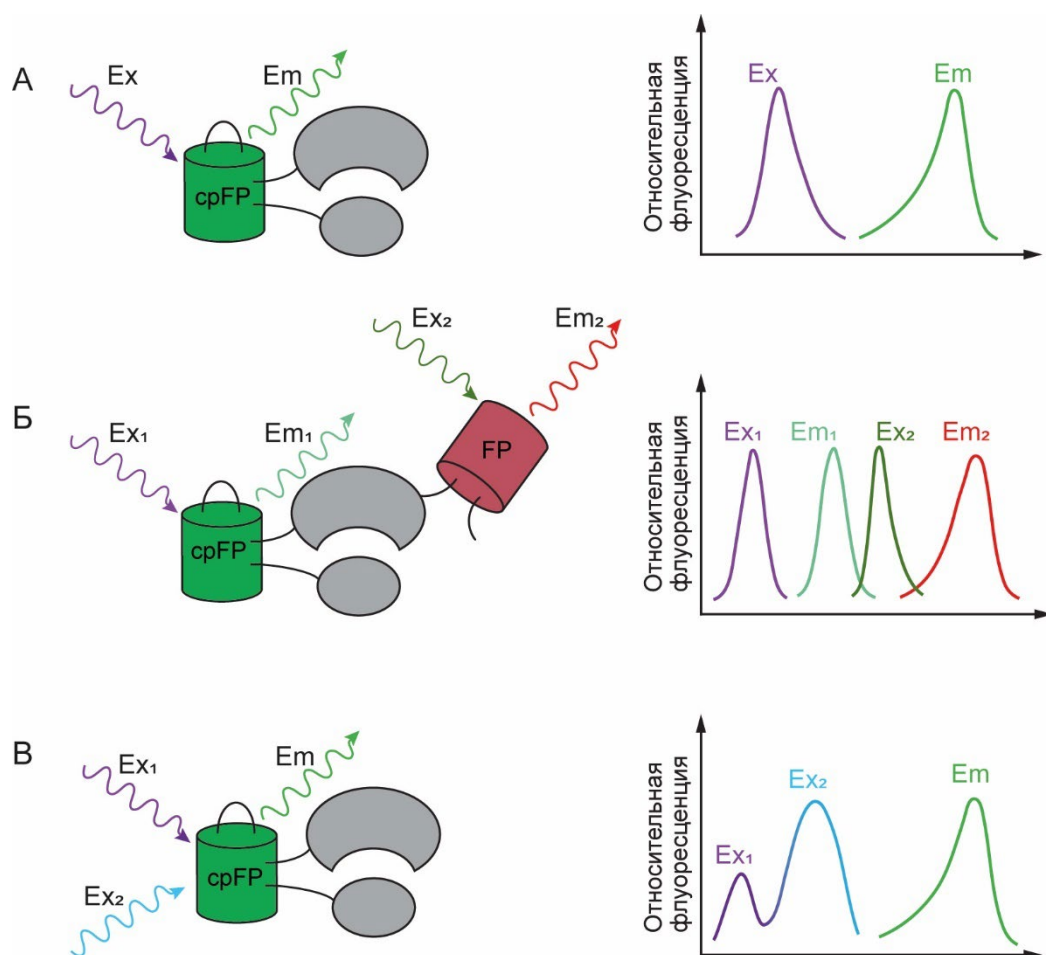


Рисунок 27. Схематичное изображение основных типов сигналов биосенсоров на основе флуоресцентных белков. (А) Интенсиметрический тип. (Б) Рациометрический тип на основе двух флуоресцентных белков. (В) Рациометрический тип на основе одного флуоресцентного белка.

При работе с биосенсорами на основе двух FP необходимо учитывать, что некоторые их свойства могут быть разными: разная чувствительность к изменению pH и различных ионов, разное время созревания хромофора и т.д. Все эти факторы могут вносить существенный вклад в поведение сигнала. С этой точки зрения биосенсоры на основе одного FP гораздо предпочтительнее, к тому же для них характерен гораздо меньший молекулярный вес, что играет немаловажное значение, например, при создании локализованных версий или при упаковке гена биосенсора в вирусные плазмиды с ограниченной емкостью. Биосенсоры на основе cpFP также демонстрируют более выраженные изменения сигнала по сравнению с биосенсорами на основе FRET. К недостаткам биосенсоров на основе cpFP следует отнести чрезвычайно высокую трудоемкость в разработке таких инструментов. Встраивание cpFP в структуру сенсорного домена зачастую ломает свойства как самого cpYFP, так и сенсорного.

Мы рассмотрели основные типы биосенсоров на основе FP и переходим к анализу доступной на сегодняшний день мировой коллекции редокс-биосенсоров, после чего

перейдем непосредственно ко вкладу, который внесла в данную область настоящая диссертационная работа.

1.2.3. Редокс-биосенсоры на основе флуоресцентных белков

1.2.3.1 Биосенсоры для регистрации O_2

Цикл созревания хромофора GFP-подобных белков зависит от O_2 . Поэтому в некотором смысле GFP является сенсором O_2 . FP, для которых зависимость от наличия O_2 наиболее выражена, послужили основой для разработок соответствующего инструмента. Например, в биосенсоре nlsTimer используется особенность белка DsRed образовывать зеленый и красный типы хромофора. Процесс формирования красного наиболее чувствителен к O_2 , поскольку требуется на одну молекулу больше, чем для созревания зеленого. Поэтому в условиях недостатка O_2 наблюдается лишь зеленая флуоресценция, но по мере оксигенации системы созревают красные белки. Биосенсор был успешно применен *in vivo* в тканях *D.melanogaster* в ходе эмбрионального развития [539]. Другой пример, в условиях низкого содержания O_2 возбуждение GFP стандартным синим светом вызывает его конверсию в красную форму, механизм этого процесса на сегодняшний день точно не установлен [540]. Однако в некоторых работах данное свойство GFP успешно применили для обнаружения условий гипоксии в клетках и тканях животных [541,542].

Ряд систем для обнаружения гипоксии в живых системах основан на визуализации с помощью FP активности некоторых промоторов. Важнейшую роль в молекулярном ответе клетки на гипоксию играет транскрипционный фактор HIF (Hypoxia Inducible Factor). За открытие механизма с участием HIF, благодаря которому клетки чувствуют и адаптируются к изменяющимся уровням O_2 , в 2019 году была присуждена Нобелевская премия W.Kaelin, P.Ratcliffe и G.Semenza. При гипоксии HIF транспортируется в ядро клетки и с дополнительными белками образует комплекс на специальной последовательности ДНК HRE (Hypoxia Response Elements), активируя ряд генов. Если клетка находится в условиях нормального содержания O_2 , то HIF идет по пути деградации [543,544]. Гены FP могут быть помещены в эту же область под контроль HRE, таким образом, наличие флуоресценции свидетельствует об активации HIF. Однако на деле такие системы имеют ряд недостатков, например, всегда существует вероятность «протечки» промотора даже при нормальном уровне O_2 , также важно помнить об участии O_2 в созревании хромофоров FP. В настоящий момент пришли к выводу, что гораздо удобнее использовать одновременно несколько меток. По такому принципу была реализована система Hypoxia Timer [545], в которой на постоянной основе экспрессируется ген красного tdTomato, а зеленый EGFP и люцифераза

находятся под контролем HRE. При этом люцифераза содержит также домен кислородозависимой деградации и поэтому в условиях высокого содержания O_2 не стабильна и деградирует. В результате при нормальных условиях сигнал наблюдается только от красного белка, в условиях гипоксии детектируются сигналы от всех трех перечисленных репортеров, однако реоксигенация сопровождается потерей сигнала от люциферазы [545]. Другая сенсорная система dUnOHR [546] представлена химерным белком, состоящим из mOrange и зеленого билирубин-связывающего белка UnaG, созревание которого не зависит от O_2 . Ген такого сенсора ставят под контроль HRE. В результате в нормальных условиях система не флуоресцирует, при гипоксии наблюдается только зеленая флуоресценция от UnaG, поскольку для созревания mOrange требуется O_2 . Реоксигенация отмечается флуоресценцией от обоих белков.

1.2.3.2 *cpYFP* – сенсор для регистрации $O_2^{\cdot-}$?

cpYFP, полученный по технологии круговой пермутации YFP, рассматривался в качестве природного биосенсора на $O_2^{\cdot-}$. В опубликованной работе, посвященной этому эффекту, исследователи с помощью сигнала *cpYFP* выявили в митохондриальном матриксе кардиомиоцитов и некоторых других типах клеток спонтанные всплески генерации $O_2^{\cdot-}$, которые назвали «супероксидными вспышками» («superoxide flashes») [547]. При использовании EYFP в качестве контроля подобных событий зарегистрировано не было. Авторы сделали вывод о том, что *cpYFP* отражает динамику именно $O_2^{\cdot-}$, поскольку добавление в систему миметика SOD или $O_2^{\cdot-}$ -поглощающих соединений значительно снижало частоту и амплитуду наблюдаемых вспышек. *In vitro* *cpYFP* также демонстрировал изменение сигнала в условиях протекания ксантин/ксантинооксидазной реакции, в ходе которой образуется $O_2^{\cdot-}$, аналогично наличие в этой системе SOD предотвращало эффект. Выраженные вспышки сигнала *cpYFP* наблюдали *in vivo* в мышцах *C.elegans*, что было опубликовано в престижном журнале «Nature» [548]. Примечательно, что у мутантных животных с дефектной дыхательной цепью такие вспышки демонстрировали низкую активность. Также было обнаружено, что частота колебаний «супероксидных вспышек» коррелировала с продолжительностью жизни организма [548]. Подобные изменения сигнала *cpYFP* наблюдали и в митохондриях клеток растения *A.thaliana* [549]. Инкубация изолированных растительных митохондрий с антимицином и миксотиазолом (ингибиторами комплекса III) приводила к снижению сигнала *cpYFP*. При этом известно, что антимицин увеличивает продукцию $O_2^{\cdot-}$ и, следовательно, должен наоборот увеличивать сигнал *cpYFP*, в то время как миксотиазол не влияет на продукцию $O_2^{\cdot-}$ и, следовательно, не должен влиять на флуоресценцию белка *cpYFP*. Другое соединение

менадион, известное своим эффектом стимулировать образование $O_2^{\cdot-}$, также не влияло на динамику сигнала *cpYFP* в данной системе. Все перечисленные эксперименты были проведены авторами при надлежащих контролях и отсутствии SOD активности. Выяснилось, что сигнал *cpYFP* в большей степени зависит от колебаний pH в системе. При этом нигерицин-опосредованное подавление pH изменений приводило к исчезновению митохондриальных вспышек, детектируемых с помощью *cpYFP* [549]. Многие исследователи склоняются именно к pH-опосредованному механизму, объясняющему природу вспышек сигнала *cpYFP*. Вдобавок к этим данным, аналогичные изменения флуоресцентного сигнала в разных работах наблюдали для pH-биосенсора *SypHer* [550–552].

В исходной статье про «супероксидные вспышки» в качестве контроля для *cpYFP* авторы использовали *EYFP*. Однако, как мы поднимали вопрос ранее, *cpFP* более лабильны по своей структуре в сравнении с нативными белками, поскольку образование N- и C-концов на поверхности β -бочонка делает хромофор более доступным для окружающей среды. Меняется и чувствительность хромофора к изменениям pH. Значение pK_a *EYFP* составляет 7,1 [506], а для полученного на его основе *cpYFP* значение этого параметра смещается до 8,6 [549]. *cpYFP* демонстрирует также более выраженные изменения сигнала на единицу изменения pH по сравнению с белком нативной структуры. Для разрешения спора независимые коллективы провели вновь серию тестов для *cpYFP* [553]. В этих экспериментах было доказано, что очищенный белковый препарат *cpYFP* не чувствителен к $O_2^{\cdot-}$. Для этого в условиях *in vitro* применяли реакцию ксантин/ксантинооксидазы, анализируя продукцию $O_2^{\cdot-}$ по восстановлению цитохрома *c* в системе. Также было установлено, почему ответ *cpYFP* в этой системе был интерпретирован в качестве ответа на образование $O_2^{\cdot-}$. Дело в том, что добавление ксантина, растворенного в KOH, вызывает незначительное подщелачивание пробы, при этом достаточное для изменения сигнала *cpYFP*. Использование более pH-стабильного контроля *EYFP* в этой системе привело к ошибке в интерпретации результата.

Мы привели данный пример, поскольку вопрос чувствительности *cpYFP* поднимался и горячо обсуждался в самых авторитетных научных журналах [553,554]. Это яркий пример того, как свойства модифицированных FP могут отличаться от исходных версий. Поэтому применение любой подобной технологии, особенно в моделях *in vivo*, требует проведения тщательного изучения свойств инструмента и подбора надежного контроля.

1.2.3.3 Биосенсоры для регистрации H_2O_2

В 2006 году Белоусовым В.В. был разработан биосенсор НуPer для регистрации динамики H_2O_2 в живых системах [555]. Впоследствии биосенсоры семейства НуPer стали одними из самых популярных редокс-инструментов в мире, позволив выявить множество новых закономерностей в регуляции физиологических и патологических процессов с участием H_2O_2 . Основой для НуPer послужил регуляторный домен транскрипционного фактора из *E.coli* ОхуR, который высокочувствителен к H_2O_2 . В ответ на увеличение H_2O_2 в бактериальной клетке ОхуR активирует экспрессию ряда генов, в основном кодирующие белки антиоксидантной защиты. Т.е. ОхуR выполняет в клетках бактерий сенсорную функцию, запуская механизмы защиты от окислительного повреждения. ОхуR состоит из N-концевого ДНК-связывающего домена и C-концевого сенсорного, который селективно и обратимо взаимодействует с H_2O_2 [556,557]. Взаимодействие с H_2O_2 вызывает формирование S-S связи между Cys199 и Cys208 в регуляторном домене ОхуR, что приводит к структурным изменениям всего белка, влияя на его ДНК-связывающие свойства. Окисление происходит по Cys199, который расположен в гидрофобном окружении и имеет низкое значение pK_a . Образующаяся сульфеновая кислота взаимодействует с близко расположенным Cys208. Реакция обратима, и белок при участии ферментов антиоксидантных систем может быть вновь восстановлен [46,557,558]. В составе биосенсора НуPer регуляторный домен ОхуR выполняет ту же функцию. Для визуализации реакции взаимодействия ОхуR с H_2O_2 в его структуру на уровне гена между аминокислотными остатками в положении 205 и 206 через короткие пептидные линкеры SAG/GT был интегрирован *срYFP*. Область в структуре ОхуR была выбрана не случайно, она претерпевает наибольшие структурные перестройки при окислении/восстановлении. Таким образом, окисление ОхуR в составе биосенсора НуPer вызывает конформационные изменения, передающиеся на *срYFP*. Для НуPer характерны два пика в спектре возбуждения флуоресценции с максимумами около 420 нм и 500 нм. В спектре эмиссии выражен один пик с максимумом 516 нм. При окислении биосенсора интенсивность в области 420 нм снижается пропорционально увеличению в области 500 нм (**рис 28А**). Таким образом, НуPer демонстрирует ратиометрический тип сигнала. Сигнал рассчитывают как соотношение интенсивностей флуоресценции, которую возбуждают отдельными длинами волн, соответствующих максимумами в спектре возбуждения (F_{500}/F_{420}). Увеличение концентрации H_2O_2 в системе приводит к росту сигнала F_{500}/F_{420} [555]. Минимальная концентрация H_2O_2 , при которой восстановленный белковый препарат НуPer (25 нМ) демонстрирует выраженное изменение сигнала, составляет 25 нМ (F_{500}/F_{420} изменяется в $1,5 \pm 0,12$ раз). При 250 нМ H_2O_2 наблюдается полное окисление биосенсора и максимальное

изменение сигнала в 3 раза. Схожая чувствительность HyPer наблюдается и в цитозоле клеток млекопитающих. Минимальная концентрация H_2O_2 , которая вызывает детектируемое изменение HyPer, составляет около 5 мкМ [555]. Согласно экспериментальным данным, градиент H_2O_2 через плазматическую мембрану может достигать 650-кратного значения [559]. Показано, что HyPer не демонстрирует изменение сигнала в присутствии $O_2^{\cdot-}$, $ONOO^-$, $\cdot NO$. Таким образом, по чувствительности, селективности и обратимости HyPer схож с исходным белком OxyR [555]. В дальнейшем при участии автора представленной диссертации были получены модифицированные версии HyPer: HyPer-2 [560], HyPer-3 [561], HyPer7 [562], HyPer-Red [563].

HyPer-2 был получен из HyPer внесением лишь одной мутации Ala406Val в OxyR часть [560]. От исходной версии HyPer-2 отличается бóльшим диапазоном ответа, при максимальном окислении соотношение F_{500}/F_{420} изменяется в 7 раз, что примерно в 2 раза превосходит HyPer. Получение биосенсора с высокой амплитудой ответа позволяет регистрировать даже небольшие эндогенные концентрации H_2O_2 в системе. Например, с помощью HyPer-2 удалось визуализировать продукцию H_2O_2 в культивируемых фибробластах NIH 3T3 при индукции ростовым фактором PDGF. Недостатком HyPer-2 можно назвать его более низкую скорость реакции с H_2O_2 по сравнению с HyPer. Кроме того, внесенная мутация сделала HyPer-2 димером [560]. Следующая версия, названная HyPer-3, была получена из HyPer также внесением единичной замены His34Tyr в OxyR часть [561]. HyPer-3 сочетает в себе лучшие свойства обоих предыдущих версий, мономерный HyPer-3 демонстрирует схожую с HyPer скорость реакции с H_2O_2 , но при этом демонстрирует сравнимый с HyPer-2 динамический диапазон ответа [561]. Все указанные версии HyPer, созданные на основе *srYFP*, чувствительны к колебаниям pH в физиологическом диапазоне изменений (pK_a 8,6 для формы, возбуждаемой при 500 нм). В спектре возбуждения флуоресценции закисление среды приводит к увеличению пика при 420 нм и уменьшению при 500 нм, что совпадает с целевым ответом биосенсора при восстановлении. Обратный эффект наблюдается при защелачивании среды. Поэтому при работе с HyPer, HyPer-2 и HyPer-3 необходимо использовать pH-контроль. Использование в качестве контроля FP с отличающейся pH-чувствительностью нередко приводит к неверной интерпретации результатов. Выше мы рассмотрели пример *srYFP*, для которого неудачно был выбран контроль *EYFP*, что вызвало горячие споры о природе всплеск сигнала в матриксе митохондрий. Для биосенсоров HyPer был разработан специальный контроль. Для того, чтобы подтвердить механизм работы HyPer в его сенсорную OxyR часть была внесена мутация по ключевому редокс-активному остатку Cys199, ответственному за взаимодействие с H_2O_2 . В результате версия HyPer с мутацией Cys199Ser

спектрально соответствует восстановленному состоянию биосенсора и при этом полностью утратила способность реагировать с H_2O_2 [555]. Нечувствительная к H_2O_2 версия HyPer-Cys199Ser при этом полностью сохраняет другие свойства белка, в том числе демонстрирует идентичную pH-чувствительность. В дальнейшем версия HyPer-Cys199Ser получила название SupHer, который теперь используется не только в качестве самого подходящего контроля для HyPer, но и в целом является хорошим биосенсором для регистрации динамики pH [564]. Позднее появились улучшенные версии SupHer2 [565] и SupHer3s [566], отличающиеся от исходного варианта повышенной яркостью. В 2020 году была разработана версия биосенсора нового поколения – HyPer7 [562], в которой OxyR часть была взята из бактерии *Neisseria meningitidis*, а флуоресцентный модуль остался прежним cpYFP. HyPer7 отличается от предыдущих версий HyPer(1,2,3) прежде всего чувствительностью к H_2O_2 (увеличена ~ в 30 раз) и яркостью (превышает предыдущие версии ~ в 15-17 раз). Важнее преимущество еще и в том, что ратиометрический сигнал HyPer7 не меняется в физиологическом диапазоне колебаний pH [562]. Все эти свойства нового инструмента вывели исследования H_2O_2 на новый уровень, в том числе благодаря возможности применять инструмент в моделях *in vivo*. В разделе «Результаты и обсуждение» мы будем говорить о регистрации H_2O_2 в тканях мозга лабораторных грызунов при развитии ишемических состояний в режиме реального времени. Из-за развития мощного ацидоза в ишемизированной ткани такие исследования стали возможны только благодаря появлению инструмента HyPer7.

Актуальным направлением остается разработка инструментов с различающимися спектральными характеристиками, что позволяет их комбинировать одновременно в пределах одной системы исследования. Такой мультипараметрический подход исследования позволяет, например, регистрировать динамику интересующего параметра одновременно в разных компартментах клетки или сравнивать сигнал в разных типах клеток в тканях организмов *in vivo*. Это также позволяет комбинировать разные типы биосенсоров для регистрации сразу нескольких параметров. Суммируя, мультипараметрический подход регистрации спектрально различающихся биосенсоров позволяет за одну серию экспериментов получать больше информации о внутриклеточных событиях. С этой целью был разработан биосенсор на H_2O_2 HyPer-Red с красной эмиссией флуоресценции [563]. При создании этой версии применяли аналогичную стратегию, только вместо cpYFP в структуру OxyR интегрировали cpRFP mApple, который ранее успешно использовали при создании биосенсора R-GECO1 для регистрации Ca^{2+} [567]. HyPer-Red демонстрирует интенсифицированный характер сигнала (Ex. 575 нм/ Em. 605 нм) (Рис 28Б). Чувствительность к H_2O_2 у красной версии оказалась схожей с HyPer(1,2,3). При

окислении интенсивность флуоресценции возрастает максимум в 2 раза. HyPer-Red тоже чувствителен к изменениям pH в системе, что требует обязательного pH-контроля. Основываясь на предыдущий опыт, для HyPer-Red была создана версия с ключевой мутацией Cys199Ser [563].

Биосенсоры семейства HyPer успешно применяют в различных типах клеток и их компартментах за исключением люмена эндоплазматического ретикулума, в условиях которого версии HyPer практически полностью окислены и в большей степени отражают общие окисляющие условия этой среды, а не динамику H_2O_2 [568,569]. Специально для таких условий была разработана версия TriPer [570], которая отличается от HyPer дополнительным редокс-активным Cys, введенным в положение 187 и расположенным возле Cys208. Таким образом, в условиях эндоплазматического ретикулума возможно образование S-S связи между Cys199 и Cys208, которая при этом находится в равновесии с S-S между Cys187 и Cys208. Т.е. данный подход даже в окисляющих условиях позволяет сохранить часть Cys199 в восстановленной форме, что обеспечивает чувствительность к H_2O_2 [570].

Еще один биосенсор для регистрации H_2O_2 был создан на основе OxyR и яркого FР mNeonGreen. Полученный биосенсор NeonOxIrr [571] демонстрирует интенсификационный ответ (Ex. 508 нм/Em. 520 нм) с максимальной амплитудой ответа ~ в 2-3 раза, сигнал не подвержен изменениям pH в диапазоне от 7,0 до 8,5. Главная особенность NeonOxIrr заключается в его медленном восстановлении, что позволяет его использовать в качестве «сенсора памяти» [571]. Такое свойство может быть полезно в реализации задач, которые требуют, например, определения сигнала в популяции клеток, испытавших некоторое время назад (десять минут) окислительный стресс. При использовании биосенсоров семейства HyPer при переходе в окисленную форму антиоксидантные системы клеток немедленно начинают их восстановление с возвращением сигнала к исходным значениям. По сравнению с HyPer-3 в условиях эукариотических клеток NeonOxIrr восстанавливается в 7,6 раз медленнее. Такое свойство «редокс-памяти» может быть полезно при анализе некоторых образцов, например, срезов тканей, подготовка которых занимает продолжительное время, и поэтому в этих условиях при использовании классических биосенсоров HyPer их сигнал уже может измениться непосредственно к моменту анализа.

Другой тип биосенсоров для визуализации динамики H_2O_2 построен на редокс-чувствительных GFP, в структуру которых, как мы обсудили ранее, интегрирована пара редокс-активных Cys. Наиболее популярная версия такого инструмента состоит из roGFP2 (redox-sensitive GFP2), к которому через пептидный линкер добавлена пероксидаза

дрожжей Orp1 [524]. Orp1 очень чувствительна к H_2O_2 , при окислении этого белка формируется внутримолекулярная S-S связь, которая в клетках дрожжей восстанавливается Trx. Однако окисленная Orp1 может вступать в реакции тиол-дисульфидного обмена с окружающими белками. В дрожжах одним из таких партнеров является транскрипционный фактор Yap1, активность которого зависит от редокс-состояния [572]. Эта идея окисления Orp1 и последующего взаимодействия с другим белком и лежит в основе создания биосенсора roGFP2-Orp1. Пероксидаза Orp1 быстро окисляется в присутствии H_2O_2 и затем окисляет близкорасположенный roGFP2, изменяя его спектральные характеристики [524]. Свойства roGFP2-Orp1 определяются его флуоресцентной частью roGFP2, при окислении сигнал изменяется ратиометрически (Ex.1 400 нм, Ex.2 490 нм/Em. 515 нм) (**рис. 28В**), максимальный динамический диапазон ответа составляет 4,8 раз. Биосенсоры roGFP2-Orp1 и HyPer были сравнены напрямую в цитозоле клеток млекопитающих. Биосенсоры демонстрируют схожие свойства, однако для HyPer характерна более быстрая реакция окисления. Из преимуществ roGFP2-Orp1 по сравнению с версиями HyPer(1,2,3) стоит отметить стабильность сигнала в условиях изменения pH [524]. Позднее на основе roGFP2 был разработан еще один тип биосенсора, который отличается высокой чувствительностью к H_2O_2 и рекомендован к использованию в системах с низкими концентрациями. В качестве сенсорного домена был выбран Tsa2 из семейства 2-Cys Prx дрожжевого происхождения (*S. cerevisiae*) [573]. В первой части этой главы мы обсуждали, что Prx являются наиболее эффективными тиоловыми пероксидазами, демонстрируя наибольшие скорости реакции взаимодействия с H_2O_2 [161]. Поэтому полученные версии roGFP2-Tsa2 Δ CR и roGFP2-Tsa2 Δ CR Δ CR с наномолярной чувствительностью позволяют регистрировать изменения H_2O_2 даже на уровне его базовых для клетки очень низких значений. Однако применение этого инструмента имеет ряд существенных ограничений. В частности, биосенсор имеет тенденцию к образованию олигомеров с нативными Tsa1 [573]. Еще один существенный недостаток в том, что roGFP2-Tsa2 Δ CR не работает в клетках млекопитающих. В этом плане HyPer7 гораздо более универсален и позволяет работать в различных моделях. Прямое сравнение roGFP2-Tsa2 Δ CR и HyPer7 в клетках *S. cerevisiae* показало, что сенсор на основе Tsa более чувствителен к H_2O_2 по сравнению с OxyR-содержащим сенсором [574,575]. Примечательно, что эти два принципиально различающихся биосенсора взаимодействуют даже с разными антиоксидантными системами, по крайней мере в дрожжевых клетках. Окисленный HyPer7 взаимодействует с Trx [575], в то время как roGFP2-Tsa2 Δ CR восстанавливается преимущественно глутатион-зависимой системой [574]. Однако есть работы, в которых показано, что белки семейства HyPer в клетках млекопитающих все же восстанавливаются глутатион-зависимым путем [576].

3-й тип класса биосенсоров на H_2O_2 основан на FRET взаимодействиях. На основе FRET пары Cerulean/Venus и редокс-системы Orp1-Yap1 из *S. cerevisiae* были получены биосенсоры OxyFRET и PerFRET (рис. 28Г) [577]. OxyFRET состоит из двух Cys-богатых доменов Yap1, расположенных между FRET парой. В биосенсоре PerFRET реализован аналогичный дизайн, но в качестве сенсорной части взяты домены из Yap1 и Orp1. При окислении оба инструмента демонстрируют обратимые изменения сигнала, причем в противоположные стороны. Мутантные версии с отсутствием редокс-активных Cys не чувствительны к H_2O_2 . Главный недостаток этих биосенсоров заключается в небольшом динамическом диапазоне ответа, что свойственно большинству биосенсоров на основе FRET. Кроме того, не до конца установлен их механизм функционирования, поскольку не были проведены тесты на очищенных препаратах белков [577]. Другой FRET биосенсор был создан на основе человеческого Prx2, который фланкировали FRET парой Clover/mRuby2. Согласно данным авторов, биосенсор достигает насыщения в клетке при концентрациях H_2O_2 от 15 нМ [576].

На рисунке 28 представлены схемы функционирования основных типов биосенсоров на H_2O_2 .

1.2.3.4 Биосенсоры для регистрации органических гидропероксидов ROOH

Для регистрации ROOH создано не такое многообразие биосенсоров. Наиболее селективным является OHSer [578], который взаимодействует с ROOH, но при этом не реагирует на другие АФК, в том числе на H_2O_2 . Биосенсор построен на основе бактериального регулятора OhrR, который запускает механизмы защиты клетки от окислительных повреждений [579]. При окислении в белке происходит образование S-S между двумя его субъединицами, что сопровождается значительными конформационными перестройками [580]. Флуоресцентный белок cpVenus был интегрирован в конформационно подвижную область OhrR. Биосенсор демонстрирует интенсификационный ответ (Ex. 519 нм/Em. 526 нм), который при окислении увеличивается ~ в 2 раза [578]. Также некоторые биосенсоры на H_2O_2 могут быть чувствительны к ROOH. Например, HyPer7 демонстрирует ответ при наличии высоких концентраций ROOH в системе [562].

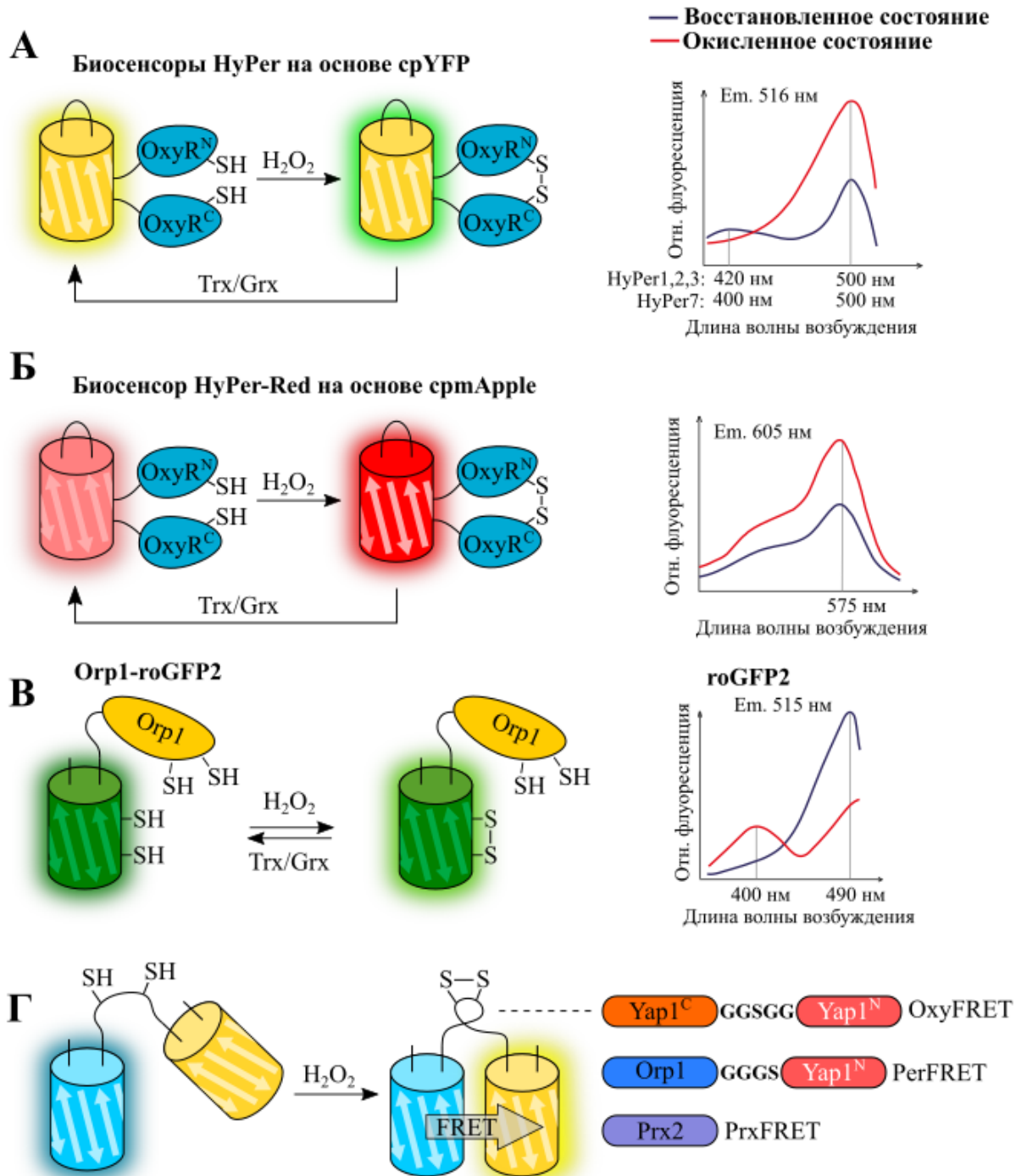


Рисунок 28. Схемы функционирования основных типов биосенсоров для регистрации динамики концентрации H_2O_2 со спектрами возбуждения флуоресценции (А) Биосенсоры HyPer на основе cpYFP. (Б) HyPer-Red на основе smApple. (В) Биосенсор Orp1-roGFP2. (Г) Конструкции на основе FRET взаимодействий.

1.2.3.5 Биосенсоры для регистрации $\cdot\text{NO}$

FRET-МТ, созданный на основе человеческого белка тионеин, можно считать исторически первым редокс-биосенсором с применением FP [581]. Более того, можно считать, что это первый биосенсор, который построен на идее конформационных перестроек белка, визуализируемых с помощью FP. Первенство биосенсора, как белкового инструмента с сенсорным доменом и FP, закреплено за Ca^{2+} -биосенсором Cameleon, принцип функционирования которого основан на взаимодействии разных белков – кальмодулина с кальмодулинсвязывающим пептидом M13 [535]. Тионеины представляют собой Cys-богатые белки, которые участвуют в гомеостазе Zn и Cu, а также в удалении токсичных металлов (например, Hg, Cd, Pb и т. д.) и АФК [582,583]. Тионеин с помощью остатков Cys координирует катионы с образованием формы металлотионеин. Однако было обнаружено, что белок имеет редокс-активные Cys, которые подвержены нитрозилированию через взаимодействие с $\cdot\text{NO}$, в результате чего происходит высвобождение лиганда [584,585]. Для создания биосенсора металлотионеин фланкировали ECFP и EYFP (**рис. 29А**). Оказалось действительно, подобная конструкция в условиях *in vitro* демонстрирует изменения в эффективности FRET при появлении в системе хелатирующих металл агентов или $\cdot\text{NO}$. Поэтому FRET-МТ использовали в качестве биосенсора для выявления активности NO-синтаз [581]. Однако FRET-МТ не стал популярным инструментом, главным образом, по причине того, что его свойства остаются малоисследованными, в том числе чувствительность и селективность, кинетические параметры. Кроме того, работа такого биосенсора зависит от наличия в среде свободных катионов металлов.

Позднее попытка создать биосенсор для регистрации $\cdot\text{NO}$ была реализована в биосенсорах семейства geNOps [522], представленное широкой цветовой палитрой на основе разных FP (ECFP, EGFP, GEM, cpVenus, mKOk). В качестве сенсорного домена в этих биосенсорах используется транскрипционный фактор NorR из *E.coli* [586]. В предыдущем разделе мы рассматривали geNOps в качестве одного из примеров дизайна биосенсоров. Механизм функционирования данных биосенсоров основан на том, что железосодержащий центр NorR связывает и удерживает $\cdot\text{NO}$ в непосредственной близости от хромофора, что влияет на его электронное распределение и изменяет флуоресцентные свойства (**рис. 29Б**). При взаимодействии с $\cdot\text{NO}$ все представители семейства geNOps демонстрируют снижение интенсивности флуоресценции на 7–18%. При этом изменение сигнала обратимо. Важно, что представленные инструменты демонстрируют селективность и устойчивы к воздействию таких окислителей, как ONOO^- , H_2O_2 . Высокую стабильность сигнала в физиологическом диапазоне изменений pH демонстрирует лишь оранжевая

версия на основе mKOk, однако для других были созданы контрольные версии с мутациями, нарушающими связывание NO [522]. Все версии geNOps являются интенсификационными, позднее была получена радиометрическая версия, которая представлена соединением голубого биосенсора C-geNOp с tagRFP через жесткий α -спиральный линкер [587]. Недостатком можно считать установленную самими авторами зависимость биосенсора от количества Fe^{2+} в системе. Окисление Fe^{2+} до Fe^{3+} при обработке H_2O_2 , что может, например, соответствовать условиям окислительного стресса, или просто недостаточное количество Fe^{2+} в системе значительно снижают эффективность функционирования данного инструмента [522]. Возможно, именно данные недостатки не позволяют применять geNOps в сложных модельных объектах, на настоящий момент таких публикаций не найдено.

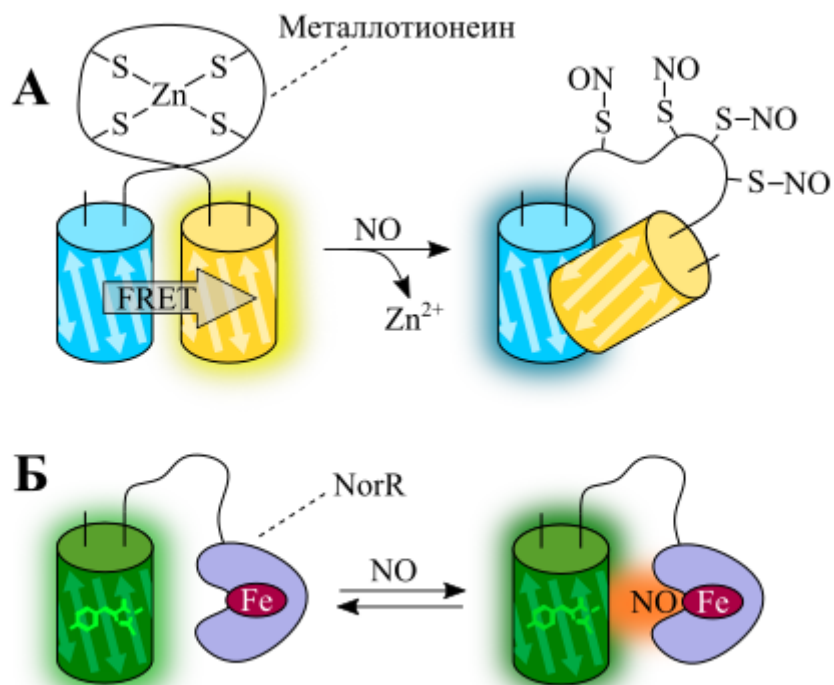


Рисунок 29. Биосенсоры для регистрации NO . (А) FRET-MT. (Б) Общая схема работы биосенсоров типа geNOps.

Предпринимались попытки создать более простые биосенсоры на NO с использованием природных свойств FP. Гомологи GFP содержат два консервативных остатка Cys, которые были предложены для рассмотрения в качестве потенциально возможных мишеней для редокс-модификаций [588]. Действительно, было обнаружено, что увеличение концентрации NO в системе приводит к снижению интенсивности флуоресценции, а также времени жизни флуоресценции для белка mTagBFP2. Этот эффект обратим, если к белку добавить Na-дितिонит. Мутантная версия с отсутствием Cys не

демонстрировала изменений ответа в аналогичных условиях. Белок был обработан S-нитрозоглутатионом, после чего масс-спектрометрический анализ действительно выявил нитрозилирование тиоловых групп. Измеренное авторами значение K_d для этого инструмента составляет ~ 70 мкМ [589]. Однако настолько низкая чувствительность к $\cdot\text{NO}$ не позволяет использовать такой белок для регистрации указанного аналита в какой-либо биологической системе. Важно отметить, что подобное влияние $\cdot\text{NO}$ на спектральные характеристики FP представлены лишь в этой единственной на сегодняшний день работе. Авторы сообщают, что это свойство характерно для большинства FP, содержащих в своей структуре Cys. Однако большинство редокс-биосенсоров на основе FP были исследованы на предмет селективности, в том числе проверялись реакции и на взаимодействие с $\cdot\text{NO}$ в условиях избыточных концентраций. Многие широко востребованные редокс-биосенсоры не демонстрируют реакции даже при высоких концентрациях $\cdot\text{NO}$.

Таким образом, для такого важнейшего редокс-параметра, как $\cdot\text{NO}$, по-прежнему не существует надежного инструментария, позволяющего регистрировать его динамику в сложных биологических объектах.

1.2.3.6 Биосенсоры для регистрации ONOO^-

ONOO^- является мощным окисляющим агентом, в настоящий момент не известны сенсорные домены белков, которые бы селективно взаимодействовали с ONOO^- . Поэтому создание генетически кодируемого инструмента на базе FP сейчас возможно лишь путем его модификации. В одном из вариантов такого подхода в структуру cysGFP вместо хромофор-формирующего остатка Tug был интегрирован p-боронофенилаланин – аминокислота неприродного происхождения. Полученный индикатор pnGFP [590] оказался высоко специфичен к ONOO^- . Исходно pnGFP демонстрирует очень слабую флуоресценцию, которая значительно усиливается после взаимодействия с аналитом (Ex. 484 нм/Em. 508 нм). Главный недостаток этого биосенсора обусловлен трудностью его синтеза с искусственной модификацией в биологических системах, особенно в эукариотах. Однако авторам работы удалось протестировать pnGFP в культуре человеческих клеток в условиях донора ONOO^- в клеточной среде [590]. В дальнейшем pnGFP подвергли оптимизации, в результате был создан pnGFP-Ultra с улучшенной чувствительностью к ONOO^- в нМ диапазоне и демонстрирующем \sim в 6 раз улучшенную амплитуду ответа по сравнению с исходным pnGFP [591]. Это было достигнуто путем комплексного подбора мутаций в структуре FP в области близкого окружения хромофора, а также областях, которые влияют на доступ окружающей среды к хромофору. Чувствительность pnGFP-Ultra лежит в диапазоне физиологически возможных концентраций ONOO^- , что было

подтверждено на моделях активированных макрофагов и микроглии [591]. При создании версии на основе красного белка неприродный аминокислотный остаток был введен не в хромофор белка, а в его окружение. Так, на основе srApple был создан pnRFP, для которого реакция взаимодействия с ONOO^- наоборот характеризуется потерей флуоресценции [592]. И все же несмотря на полезность представленных генетически кодируемых инструментов их широкое применения для исследования ONOO^- затруднительно из-за существенных ограничений. Первое заключается в их применении в моделях *in vivo*, поскольку необходимо доставить не только ген биосенсора, но и весь необходимый аппарат для синтеза белка с неприродной аминокислотой в структуре. Во-вторых, сигналы представленных биосенсоров необратимы, что не позволяет исследовать динамику ONOO^- в режиме реального времени.

1.2.3.7 Биосенсоры для регистрации гипогалогенных кислот

Для биологически значимых гипогалогенных кислот, прежде всего HOCl и HOBr , наблюдалась примерно такая же ситуация, как и для ONOO^- – отсутствие в природе известных белковых доменов, которые специфично бы взаимодействовали с данными реакционноспособными соединениями. И поэтому до недавнего времени специфичных генетически кодируемых биосенсоров к подобным анализам не существовало. Однако в бактериальных клетках обнаружили ряд транскрипционных факторов, которые служат именно сенсорами гипогалогенного стресса, среди таких белков, например, YjiE [593], NurR [594], RclR [595], NemR [596]. На основе одного из таких белков, а именно NemR, наша команда разработала первый в своем роде генетически кодируемый биосенсор Nurocrates для визуализации (псевдо)гипогалогенных кислот и их производных, что и является одним из результатов представленной диссертации.

1.2.3.8 Биосенсоры для регистрации метионинсульфоксида

Окисление Met до образования метионинсульфоксида является важной редокс-модификацией, возникающей как при физиологических, так и при патологических процессах. Два радиометрических биосенсора MetSOx и MetROx были получены для регистрации S и R диастереомеров метионинсульфоксида [597]. В основе принципа работы этих биосенсоров лежит реакция специфичного взаимодействия редуктазы Msr с метионинсульфоксидом. К дрожжевым MsrA и MsrB были присоединены восстанавливающие их Trx1 и Trx3 с заменой ключевых Cys на Ser. Между соответствующими Msr и Trx располагается srYFP. Таким образом, Msr взаимодействует с метионинсульфоксидом и окисляется, далее взаимодействует с Trx с образованием S-S

связи, которая из-за отсутствия 2-го Cys в Trx так и оказывается стабилизированной. Примечательно, что MsrA и MsrB являются селективными по отношению к конкретным стереомерам. Описанные реакции сопровождаются спектральными изменениями srYFP. Восстановленный MetSOx демонстрирует два пика в спектре возбуждения флуоресценции с максимумами при 425 нм и 505 нм, для эмиссии характерен один пик с максимумом при 516 нм. При окислении возрастает интенсивность в области 505 нм, при этом пик при 425 нм не изменяется. Немного отличные свойства демонстрирует MetROx (Ex.₁ 410 нм, Ex.₂ 500 нм/Em. 516 нм), у которого наблюдается увеличение интенсивности в области пика 410 нм с одновременным уменьшением в области 500 нм. Амплитуда ответа для обоих биосенсоров составляет ~ 6 раз. При проведении тестов *in vitro* было обнаружено, что NaOCl изменяет сигнал MetSOx, но не влияет на MetROx. На оба биосенсора незначительный эффект оказывает H₂O₂. Как и многим биосенсорам на основе srYFP, MetSOx и MetROx присуща чувствительность к изменениям pH. MetSOx не был охарактеризован в эукариотической системе, поскольку демонстрировал низкий флуоресцентный сигнал. MetROx при этом был успешно протестирован в клетках млекопитающих, в том числе на уровне разных компартментов [597]. Важный недостаток MetROx заключается в его низкой чувствительности, что не позволяет регистрировать метионинсульфоксид в диапазоне актуальных для клетки концентраций. Для устранения этой проблемы был получен новый биосенсор TYfR (**рис. 30А**) [598], в котором дрожжевую MsrB заменили на метионин-R-сульфоксидредуктазу из *E.coli*. Полученная версия демонстрирует к тому же меньшую реакционную способность по отношению к H₂O₂ и NaOCl. Несмотря на сниженную по сравнению с MetROx амплитуду ответа, авторы продемонстрировали возможность применения данного биосенсора в различных биологических условиях: в клетках, а также сыворотке животных и людей при разных воспалительных процессах [598].

Сенсор GEPMO [599] устроен на другом принципе, подход основан на модификации FP, что схоже с созданием редокс-активных белков, например, roGFP. Для этого в структуру sEGFP ввели остаток Met в позицию 147 в непосредственной близости от хромофора (**рис. 30Б**). Окисление Met в данном белке хлорамином действительно приводило к изменению спектральных свойств. В ходе дальнейшей оптимизации Thr65 из хромофорной триады был заменен на Ser. Примечательно, что изначально белок демонстрировал двухфазную кинетику окисления. Примерно в первые 30 секунд происходило основное изменение сигнала, после чего наблюдалось медленное и плавное снижение. Этот эффект полностью исчез при удалении в структуре белка всех имеющихся Met кроме ключевого введенного, что свидетельствует о протекании побочных реакций с их участием. Максимальная

амплитуда ответа GEPMO составляет около 2 раз, при этом его сигнал pH-стабилен в физиологическом диапазоне. Образование метионинсульфоксида в положении 147 было подтверждено масс-спектрометрическим анализом. Ни MsrA, ни MsrB не способны восстанавливать этот остаток, что делает ответ биосенсора необратимым в условиях клетки. Авторами были также предложены две контрольные версии с заменой Met147 на Ser и Gln. Данный инструмент был успешно протестирован в культуре эукариотических клеток. Поскольку активные формы галогенов модифицируют Met, то GEPMO демонстрирует ответ при взаимодействии с HOCl, константа скорости реакции составляет $10^5 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$. GEPMO не реагирует на АФА, в том числе при наличии в системе доноров ONOO⁻ [599].

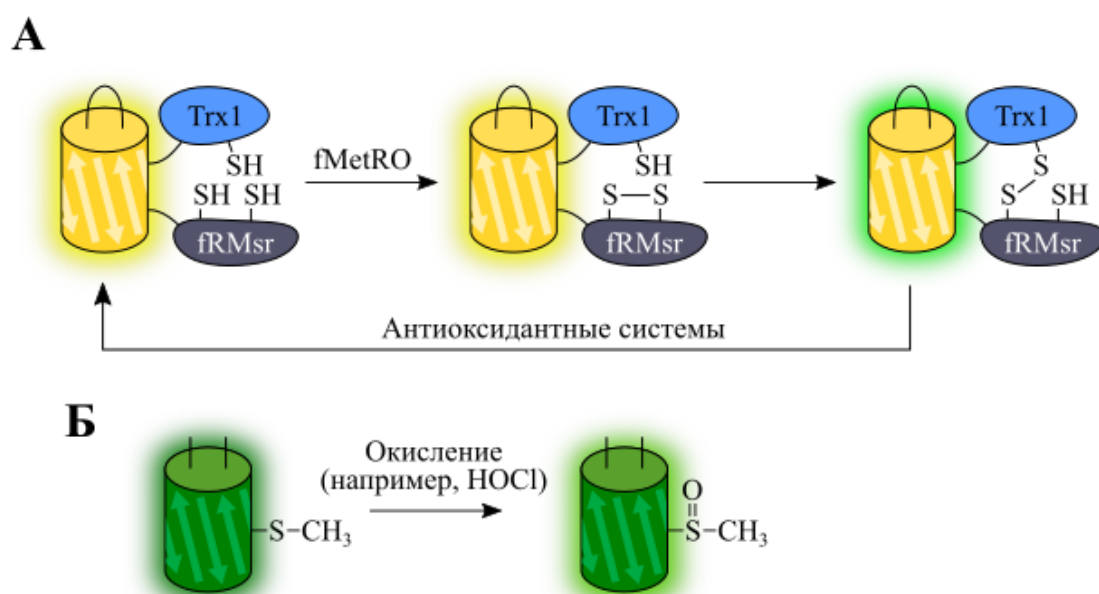


Рисунок 30. Биосенсоры для регистрации метионинсульфоксида. (А) Биосенсор TyfR для регистрации свободного метионин-*R*-сульфоксида. (Б) Биосенсор GEPMO для регистрации окисления метионина в белках.

1.2.3.9 Биосенсоры для регистрации H₂S

При создании биосенсора для регистрации H₂S применили аналогичную стратегию, что и для инструмента на ONOO⁻, а именно в структуру хромофора cpGFP ввели модифицированную аминокислоту *p*-азидофенилаланин. Сульфид взаимодействует с азидной группой полученного белка cpGFP-*p*AzF, что приводит к усилению флуоресцентного сигнала. Однако помимо чувствительности к H₂S биосенсор демонстрирует изменение сигнала в присутствии дитиотреитола, при этом цистеин и глутатион не влияют [600]. Новый вариант этого биосенсора hsGFP демонстрирует увеличенный диапазон ответа и высокую специфичность к H₂S, в том числе отсутствует реакция на дитиотреитол, а также улучшено созревание хромофора [601]. Присоединение

дополнительного EBFP2 позволило придать подобным биосенсорам ратиометрический характер сигнала [602]. Однако использование неприродных модифицированных аминокислотных остатков в структуре таких биосенсоров является главным ограничением их широкого применения в различных биологических моделях. К тому же изменение их сигнала носит необратимый характер, что делает невозможным исследование динамики аналита в режиме реального времени.

1.2.3.10 Биосенсоры для регистрации редокс-статуса низкомолекулярных тиол-содержащих соединений

Идея создания FP, вовлеченного в процессы клеточного тиол-дисульфидного обмена, была успешно реализована в разработке самого обширного семейства в коллекции редокс-биосенсоров. В основе всех представителей данного семейства лежит общий принцип – внесение близкорасположенных остатков Cys на поверхности β -бочонка FP, формирующих при определенных условиях S-S связь. В большинстве типов клеток главным редокс-буфером является глутатион (GSH), именно он играет ключевую роль в поддержании тиол-дисульфидного обмена. Соответственно, редокс-статус FP с активными остатками Cys подобно множеству других внутриклеточных белков определяется редокс-статусом окружающей среды, во многом зависящим от соотношения GSSG/2GSH. При общем окислении среды восстановленная форма белка переходит в окисленную, однако благодаря работе антиоксидантных систем этот процесс полностью обратим. Формирование S-S связи в структуре FP влияет на его спектральные характеристики. Редокс-чувствительный FP можно использовать для регистрации динамики внутриклеточного редокс-состояния клетки.

Первый редокс-чувствительный FP был создан на основе YFP, в структуре которого на Cys были заменены аминокислотные остатки в положениях 149 и 202, расположенные на соседствующих β -листах [517]. Белок, который был назван rYFP, демонстрирует изменение сигнала в 2,2 раза при окислении, сигнал интенсифицированный (Ex. 512 нм/Em. 523 нм) (**рис. 31А**). Стандартный редокс-потенциал (E°) rYFP составляет -261 мВ, для большинства редокс-активных внутриклеточных Cys диапазон составляет -120 – -270 мВ [517]. rYFP, как и исходный YFP, чувствителен к изменению внутриклеточного pH [500] и анионов галогенов [603].

Аналогичная стратегия была применена к зеленому белку GFP, в результате было получено несколько версий roGFP [604,605]. Редокс-активные Cys были также внесены на соседние β -листы по позициям 147 и 204. Внесение мутации Cys48Ser привело к получению версии roGFP1, а дополнительная Ser65Thr – к появлению roGFP2. В отличие от rYFP обе

версии roGFP1 и roGFP2 имеют два пика в спектре возбуждения флуоресценции и потому демонстрируют ратиометрический тип сигнала (roGFP1: $E_{x,1}$ 400 нм, $E_{x,2}$ 475 нм / E_m 515 нм; roGFP2: $E_{x,1}$ 400 нм, $E_{x,2}$ 490 нм / E_m 515 нм). При формировании S-S связи между редокс-активными Cys для обоих белков характерно увеличение интенсивности для протонированной формы хромофора (E_x 400 нм) и уменьшение интенсивности анионной формы хромофора (E_x 475 нм для roGFP1 и E_x 490 нм для roGFP2). Формы спектров у данных белков различаются. У roGFP1 слабый сигнал анионной формы при окислении становится еще слабее, а изначально яркий сигнал протонированной формы становится ярче. У roGFP2 форма спектра устроена так, что при окислении слабый сигнал становится ярче, а изначально яркий слабее, что делает данную версию более удобной в применении (рис. 31Б) [604,605]. Примечательно, что изменения pH в физиологическом диапазоне не влияют на ратиометрический сигнал roGFP: снижение pH приводит к одинаковому снижению интенсивности флуоресценции обеих форм хромофора, поэтому их соотношение не меняется [523,606]. *In vitro* при максимально подходящих параметрах возбуждения флуоресценции roGFP1 и roGFP2 демонстрируют схожую амплитуду ответа, которая составляет ~ в 6 раз [604]. На практике при использовании флуоресцентной микроскопии наиболее распространены лазеры 405 нм и 488 нм, поэтому для этих параметров roGFP2 является более подходящим инструментом. Значения E° roGFP1,2 лежат в более отрицательной области по сравнению с rYFP и составляют -291 мВ для roGFP1 и -280 мВ для roGFP2, что позволяет их применять в большинстве внутриклеточных компартментах (цитоплазма, ядро, матрикс митохондрий, строма хлоропластов). Однако в более окисляющих условиях, например, в люмене эндоплазматического ретикулума все указанные биосенсоры пребывают в полностью окисленном состоянии [604,607]. Велись работы по оптимизации свойств roGFP для создания версий с более высоким потенциалом. Ряд мутаций привел к созданию roGFP1iL (E° -229 мВ) [608], roGFP1iE (E° -236 мВ) [608], roGFP2iL (E° -238 мВ) [609]. Однако, учитывая, что E_{GSN} в люмене эндоплазматического ретикулума составляет ~ -208 мВ [610], ни одна из перечисленных проб по-прежнему не соответствует оптимальным значениям потенциала.

Предпринимались попытки создания редокс-чувствительных биосенсоров на основе других зеленых белков с более совершенными для пользователя характеристиками. В частности, на основе Clover был получен roClover1, который, к сожалению, в результате внесения мутаций стал pH-чувствительным и значительно менее ярким [611].

Биосенсоры с разными спектральными характеристиками позволяют исследователю их комбинировать в пределах одной системы. Поэтому технологию создания редокс-

чувствительных биосенсоров стали активно применять ко всей цветовой палитре FP. Сразу несколько версий было получено с голубой эмиссией флуоресценции на основе белков Sirius, BFP и CFP [612]. Для создания рабочих версий биосенсоров на основе указанных белков потребовалось внесение не только мутаций, заменяющих аминокислотные остатки в положениях 147 и 204 на пару редокс-активных Cys, но и внесение в их структуры дополнительной аминокислоты и некоторых мутаций в хромофорное окружение. Полученные версии были названы Oba-Q, они демонстрируют один пик в спектре возбуждения флуоресценции и один пик в спектре эмиссии: Oba-Qs на основе Sirius (Ex. 370 нм / Em. 425 нм), Oba-Qc на основе CFP (Ex. 430 нм / Em. 480 нм), Oba-Qb основе BFP (Ex. 380 нм / Em. 440 нм) [612]. При окислении Oba-Q демонстрируют выраженное снижение флуоресцентного сигнала (**рис. 31В**). Редокс-потенциал составляет -232 мВ для Oba-Qs, -249 мВ для Oba-Qc и -263 мВ для Oba-Qb [612], что по этому параметру располагает Oba-Q между классическими зелеными версиями roGFP1,2 и roGFPiX. Позднее коллекция Oba-Q была пополнена еще двумя версиями Oba-Qc2 и Oba-Qc3 (Ex. 430 нм / Em. 480 нм), созданными на основе белка mTurquoise [613]. На основе mTurquoise и Venus этими же авторами были разработаны пробы Re-Qc (Ex. 430 нм / Em. 480 нм), Re-Qy1 (Ex. 515 нм / Em. 525 нм) и Re-Qy2 (Ex. 512 нм / Em. 525 нм), которые при окислении в отличие от Oba-Q проб, наоборот, демонстрируют увеличение интенсивности флуоресценции. Эти версии демонстрируют высокую амплитуду ответа, при максимальном окислении сигнал для Re-Qy2 изменяется в 10,3 раза, чуть меньший ответ в 8,1 раз демонстрирует Re-Qy1, наименьшую амплитуду ответа демонстрирует Re-Qc в 1,9 раз [613]. Среди проб Oba-Q наибольший ответ демонстрирует Oba-Qs – в 6,3 раза [612]. Среди новых проб по редокс-потенциалу наиболее близок к roGFP1,2 оказалась версия Re-Qc со значением -286 мВ, для остальных версий эта величина составляет около -260 мВ [613]. Недостатком версий на основе Venus является чувствительность к изменениям pH в физиологическом диапазоне.

Предпринимались попытки создания редокс-активных FP в красной области спектра. С одной стороны, это полностью дополнило бы цветовую палитру таких инструментов, а с другой, красные белки предпочтительнее для применения в биологических объектах, поскольку видимый свет в более коротковолновых областях плохо проходит через ткани и поглощается такими веществами, как меланин, гемоглобин [614]. Кроме того, коротковолновой свет более токсичен для живых объектов, что необходимо учитывать при длительных экспериментах [615]. Первая попытка создания красного редокс-белка была представлена на научной конференции в 2011 году командой Remington, в качестве основы был выбран белок mKeima (Ex. 440 нм / Em. 620 нм). Полученный сенсор (roRFP) демонстрировал ратиометрический тип сигнала и значение

редокс-потенциала -330 мВ, однако данный инструмент так и не был опубликован, судя по всему, по причине небольшой амплитуды ответа и выраженной фотоконверсии. Общая тенденция в работе с RFP такова, что они гораздо хуже поддаются различным модификациям структуры по сравнению с GFP. Еще один коллектив авторов, возможно, как раз по этой причине, выбрал стратегию создания редокс-чувствительного красного белка не путем интеграции остатков Cys в структуру его бочонка, а добавив пару Cys на N- и C- концы кругового пермутанта *srnApple* (рис. 31Г) [616]. Полученный *rxRFP* с редокс-потенциалом -281 мВ демонстрирует интенсифицированный тип сигнала (Ex. 576 нм / Em. 600 нм), который при окислении максимально изменяется в 4 раза. Главным недостатком этого инструмента является именно лабильность его спектральных свойств, обусловленная структурой пермутанта. В частности, как и большинство круговых пермутантов, *rxRFP* чувствителен к изменениям pH (pKa 8,7). Помимо взаимодействия с GSSG *rxRFP* демонстрирует ответ в присутствии $O_2^{\cdot -}$ и $ONOO^-$ [616]. Последующее внесение точечных мутаций вблизи C-концевого редокс-активного Cys привело к версиям, отличающимся по значениям редокс-потенциала: *rxRFP1.1* (-324 мВ), *rxRFP1.2* (-272 мВ), *rxRFP1.3* (-251 мВ), *rxRFP1.4* (-244 мВ). С помощью перечисленных биосенсоров авторы оценили значение редокс-потенциала среды основных внутриклеточных компартментов на примере клеточной линии НЕК: -365 мВ для митохондриального матрикса, -326 мВ – ядра, -277 мВ – цитозоля, -209 мВ – люмена эндоплазматического ретикула. По остальным свойствам данные версии схожи с исходным *rxRFP* [617].

Таким образом, на момент начала работ над настоящей диссертацией не существовало редокс-активных RFP, устроенных по классической схеме *rxYFP* или *roGFP1,2*, где функциональная пара Cys внесена непосредственно в структуру бочонка на соседние β-тяжи. Поэтому одна из задач представленной диссертации заключается в получении такого биосенсора.

Из редокс-чувствительных белков следует также отметить FROG/B, который демонстрирует зелено/голубой переход при изменении редокс-статуса среды [618]. Инструмент создан на основе GFP, в структуру которого помимо пары редокс-активных Cys были внесены дополнительные мутации, часть из которых стабилизирует белок, а часть способствует перестройки механизма внутримолекулярного переноса протона. В результате белок демонстрирует один пик в спектре возбуждения флуоресценции (400 нм) и два пика в спектре эмиссии (450 нм, 500 нм). Таким образом, FROG/B демонстрирует ратиометрический тип сигнала при использовании одной длины возбуждения. При окислении сигнал изменяется примерно в 3 раза, редокс-потенциал пробы составляет -293 мВ [618].

В ряде работ было показано, что в клетках активные Cys rxFYFP и roGFP1,2 уравниваются с редокс-пулом глутатиона (2GSH/GSSG) посредством Grx [607,619,620]. В эукариотических системах rxFYFP и roGFP1,2 конкурируют со множеством других белков за взаимодействие с антиоксидантной системы, поэтому зачастую реакции rxFYFP и roGFP1,2 протекают медленно, что не позволяет использовать данный тип биосенсоров для визуализации быстрых биохимических событий, как, например, резкое изменение редокс-статуса глутатиона при окислительном стрессе [621]. Первые попытки улучшить кинетические характеристики roGFP, повысив реакционную способность, были направлены на снижение рКа одного из ключевых редокс-активных остатков Cys путем внесения в его непосредственной близости положительно заряженных остатков. Таким образом были получены roGFP1-R12 [621] и rxFYFP3R [622]. Этот подход действительно позволил увеличить реакционную способность полученных версий, однако эффекта оказалось по-прежнему недостаточно для регистрации быстрых процессов. Поскольку Grx является лимитирующим фактором тиол-дисульфидного обмена между редокс-белком и пулом глутатиона, другая идея по оптимизации данных молекулярных инструментов основывалась на увеличении локальной концентрации Grx вблизи FP. Впервые подход был реализован для rxFYFP путем присоединения к нему дрожжевого Grx1p через полипептидный линкер, что значительно улучшило кинетические характеристики инструмента [623]. По аналогии к roGFP2 был добавлен человеческий Grx1 [523]. Таким образом, функционирование rxFYFP-Grx1p и Grx1-roGFP2 не зависит от эндогенного содержания Grx в системе, которое может отличаться в разных типах клетках и компартментах. Данный подход универсален и может применяться для создания инструментов, позволяющих визуализировать динамику других низкомолекулярных тиол-содержащих соединений, выполняющих антиоксидантную функцию. Например, некоторые организмы, в особенности микроорганизмы, вместо GSH используют другие соединения с аналогичными функциями, среди таких примеров микотиол (MSH), бациллитиол (BSH), трипанотион (T(SH)₂). По аналогии с Grx1-roGFP2 были созданы инструменты, в которых к FP были добавлены ферменты, уравнивающие его редокс-активные Cys с соответствующим пулом тиолов (**рис. 31Д**). Так, на основе микоредоксина из *M.tuberculosis* был создан Mrx1-roGFP2 для определения редокс-статуса 2MSH/MSSM [525], на основе бациллоредоксина из *S. aureus* – Brx-roGFP2 для 2BSH/BSSB пула [624], на основе трипаредоксина из *T.brucei* – Trx-roGFP2 для T(SH)₂/TS₂ пула [625].

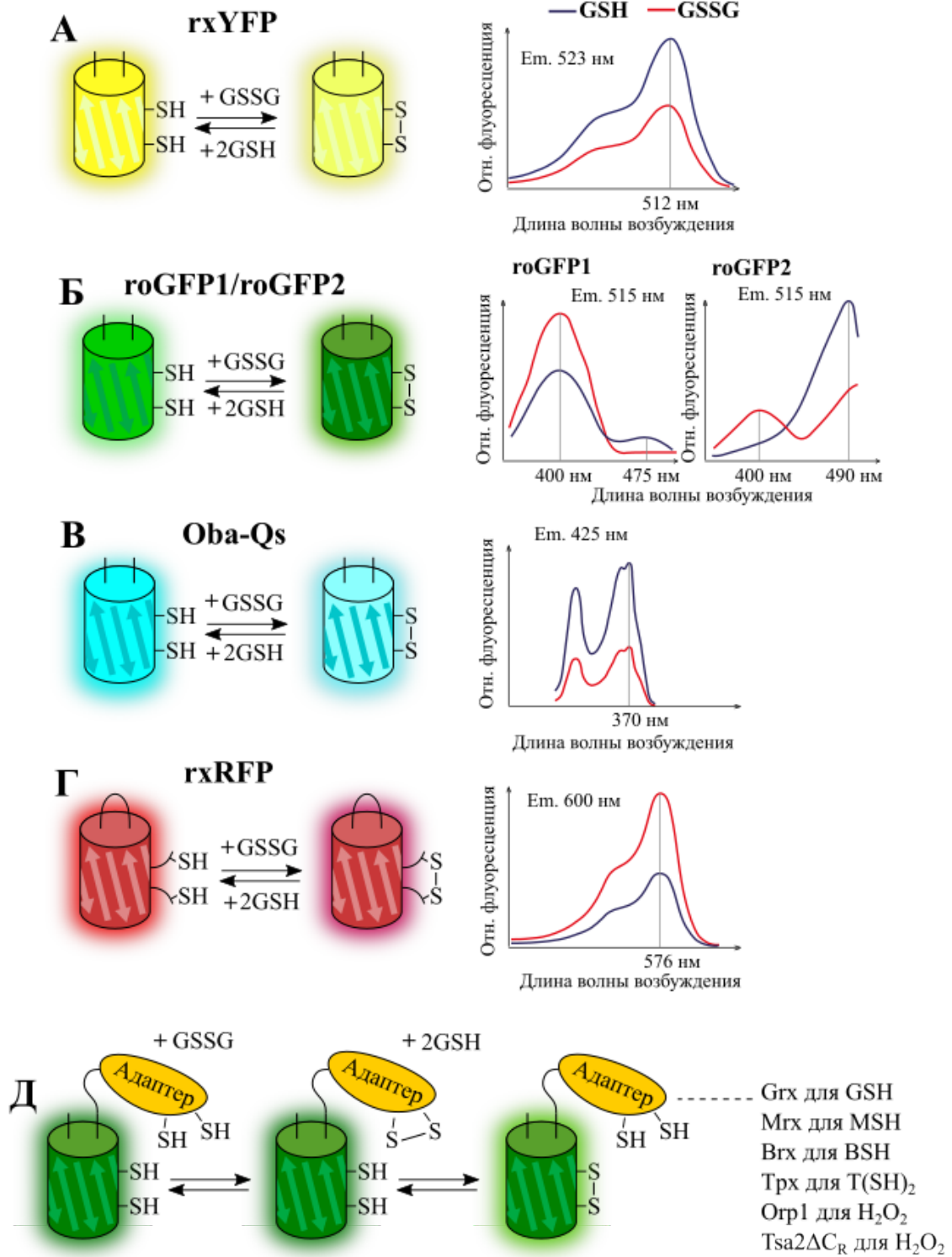


Рисунок 31. Примеры редокс-чувствительных белков. (А) *rxYFP* со спектром возбуждения флуоресценции. (Б) *roGFP1* и *roGFP2* со спектрами возбуждения флуоресценции. (В) *Oba-Qs* со спектром возбуждения флуоресценции. (Г) *rxRFP* на основе пермутанта *RFP*. (Д) Редокс-чувствительные белки с различными адаптерами для определения редокс-параметров.

Несколько биосенсоров, участвующих в тиол-дисульфидном обмене, созданы на основе FRET взаимодействий. Принцип основывается на идее размещения остатков Cys в

адаптере между FRET парой. Cys вступают в реакции внутриклеточного тиол-дисульфидного обмена, влияя на эффективность FRET. При формировании S-S связи в адаптере меняется расстояние между FRET парой. В одном из таких биосенсоров ECFP-RL7-EYFP реакционные Cys размещены в коротком линкере, связывающем соответствующие FP [626]. В другом варианте, названном Redoxfluor, в качестве адаптера, который фланкирует FRET пара CFP и YFP, использован фрагмент дрожжевого фактора транскрипции Yap1, который богат Cys [627]. Однако не было точно установлено, какая из внутриклеточных редокс-систем взаимодействует с данными типами индикаторов, поэтому они позиционируются в качестве биосенсоров на общее редокс-состояние среды. Еще один биосенсор на основе FRET пары CFP/YFP, FLIP-G, получен на основе GSH-связывающего белка YliB из *E.coli*. В зависимости от состояния YliB белка меняется эффективность FRET. При этом белок не связывает окисленную форму GSSG, поэтому сигнал FLIP-G отражает не редокс-статус пула глутатиона, а исключительно динамику концентрации восстановленной формы GSH. Из недостатков следует отметить, что свойства данного инструмента плохо охарактеризованы *in vitro*, также FLIP-G не был протестирован в клетках млекопитающих [628].

1.2.3.11 Биосенсоры для регистрации полисульфидов

Первый генетически кодируемый биосенсор на полисульфиды был разработан относительно недавно в 2019 году. Он основан на идеи дизайна roGFP, однако поскольку образование S-S связи нежелательно в таком инструменте, редокс-активные Cys должны находиться в непосредственной близости от хромофора, но при этом на расстоянии друг от друга больше $2,05 \text{ \AA}$, что предотвращало бы формирование дисульфида [629] (рис. 32).

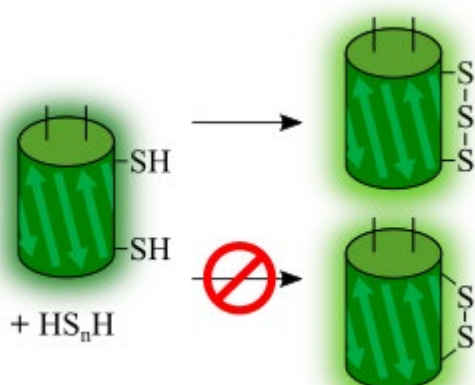


Рисунок 32. Генетически кодируемый биосенсор для регистрации полисульфидов на основе редокс-чувствительного флуоресцентного белка с увеличенным расстоянием между редокс-активными Cys.

В результате были получены версии psGFP1.1 (Cys147, Cys202, между тиоловыми группами которых $6,6 \text{ \AA}$) и psGFP1.4 (Cys147, Cys149, между которыми $8,9 \text{ \AA}$). Обе версии демонстрируют изменение флуоресцентного сигнала при взаимодействии с H_2S_2 , но не

H_2O_2 [629]. GSSG, $Na_2S_2O_3$, Me-SSS-Me также не вызывают изменений сигнала. Было показано, что сигнал psGFP1.1 устойчив к изменениям pH в диапазоне 7,0-9,0, значение редокс-потенциала составляет -320 мВ. psGFP1.1 был успешно протестирован в бактериях *E.coli*, а также в разных компартментах клеток *S.cerevisiae* [629]. Позднее аналогичный подход был реализован на белке mCherry, что привело к созданию биосенсора psRFP [630]. Тиоловые группы редокс-активных Cys150 и Cys151 расположены на расстоянии 8.8 Å, взаимодействие с HS_nH приводит к формированию между ними связей $-S_3-$ или $-S_5-$, что отражается на изменении спектральных характеристик. psRFP чувствителен к изменениям pH, значение редокс-потенциала составляет -363 мВ. psRFP был также успешно протестирован в бактериях *E.coli* и клетках дрожжей *S.cerevisiae* [630].

Из недостатков psGFP и psRFP следует отметить их низкие кинетические характеристики. В условиях *in vitro* показано, что окисление протекает в течение нескольких минут. Кроме того, данный тип инструментов не был детально протестирован против обширной панели редокс-активных соединений, которые образуются в живых системах. psRFP демонстрирует чрезвычайно низкую яркость. Модификация белка mCherry привела ~ к 400-кратному ухудшению этого параметра. Например, флуоресцентный сигнал оказался недостаточным для применения psRFP даже в культуре клеток на примере линии НСТ116. Наконец, авторы отмечают для препарата psRFP наличие дополнительных пиков в спектре возбуждения и эмиссии флуоресценции, смещенных в коротковолновую область (406 нм/ 466 нм) [630]. Авторы интерпретировали данное свойство биосенсора преимуществом, позволяющим извлекать радиометрический тип сигнала. Однако природа данного явления не была исследована. Возможно, наличие дополнительного пика в спектре красного белка связана с наличием незрелого хромофора, что трудно учитывать при использовании инструмента в разных условиях.

1.2.3.12 Биосенсоры для регистрации редокс-статуса Trx

Логичной и очевидной кажется идея создания инструмента для определения редокс-статуса Trx на основе редокс-чувствительных FP. Однако попытки связать человеческий Trx1 с roGFP2 по аналогии с конструкцией Grx1-roGFP2 не увенчались успехом из-за стерических проблем [523,619]. Белок gxRFP [616], у которого редокс-активные Cys расположены не на поверхности β-бочонка, а на N- и C-концах пермутанта, имеет другую архитектуру, поэтому этот белок был выбран в качестве основы для нового биосенсора [526]. Для предотвращения неспецифических реакций и взаимодействия с глутатион-зависимой системой авторы использовали Trx1 с отсутствием 3-х регуляторных Cys. В структуре gxRFP два нефункциональных Cys также были заменены. В результате внесения

дополнительных мутаций в ходе оптимизации был получен биосенсор TrxRFP (рис. 33А), который демонстрирует интенсифицируемый обратимый ответ (максимальная амплитуда ответа в 5,7 раз). В условиях *in vitro* TrxRFP окисляется системой тиоредоксин пероксидаза/H₂O₂, при этом отсутствует ответ в системе GSSG/Grx1. Обратное восстановление TrxRFP наблюдается в системе TrxR1/NADPH [526]. Путем внесения дополнительных мутаций биосенсор был усовершенствован до версии TrxRFP2, которая отличается лучшими кинетическими параметрами и в 2 раза большей амплитудой ответа [631]. В этой же работе авторы создали версию MtrxRFP2 на основе человеческого митохондриального Trx2, оптимального для взаимодействия с митохондриальной TrxR [631]. Остаются вопросы к оценке селективности данных биосенсоров, поскольку они не были протестированы на предмет взаимодействия даже с ключевыми редокс-активными компонентами клетки.

Иной принцип был реализован в биосенсорах типа CROST [632]. В основу взят белок CP12, который в фотосинтезирующих организмах является мишенью для Trx [633,634]. N-концевой домен CP12 был размещен между FRET парой CFP/YFP (рис. 33Б). Этот тип сенсоров был протестирован в клетках *A. thaliana* [632]. Из недостатков важно отметить, что селективность CROST версий, как и в случае TrxRFP1/2, исследована недостаточно подробно.

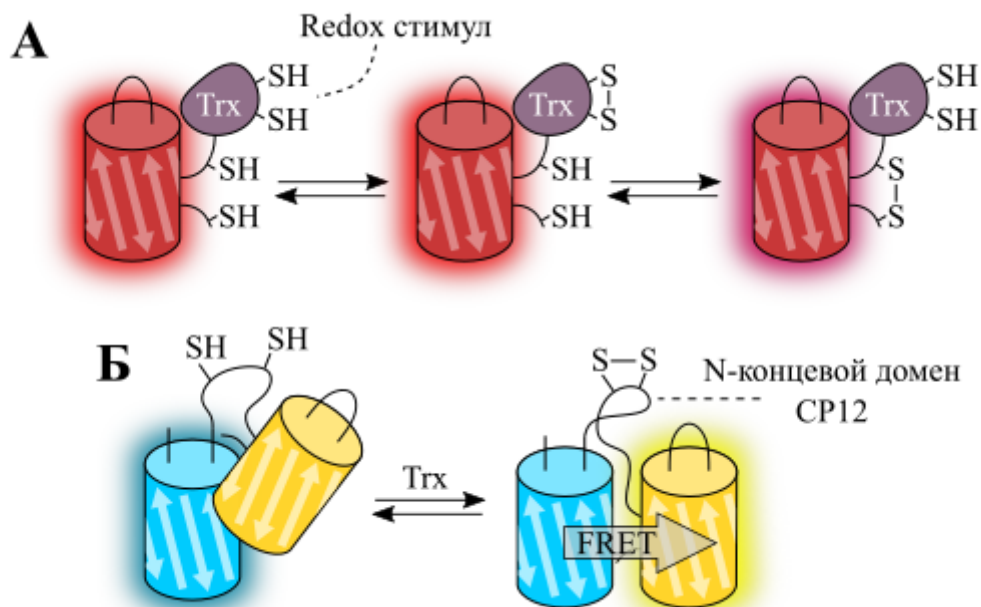


Рисунок 33. Генетически кодируемые флуоресцентные биосенсоры для определения редокс-статуса пула Trx. (А) Биосенсор TrxRFP на основе редокс-чувствительного белка trxRFP, соединенного с Trx1. (Б) Схема функционирования биосенсора CROST.

1.2.3.13 Биосенсоры для регистрации $NAD(H)$

Для регистрации редокс-статуса пула NAD был создан целый класс биосенсоров. Основой для большинства биосенсоров послужили сенсорные белки Rex, относящиеся к семейству репрессоров транскрипции. В различных бактериях белки Rex выполняют роль сенсора аэробных/анаэробных условий, но взаимодействуют они не напрямую с O_2 , а опосредовано через $NAD^+/NADH$ соотношение. При высоком содержании O_2 в среде внутриклеточный пул NAD преимущественно пребывает в окисленном состоянии, и в этом случае димер Rex связывает одну молекулу NAD^+ и выступает в роли репрессора, связывая ДНК. При анаэробных условиях редокс-состояние пула NAD смещается в сторону восстановленной формы $NADH$, к которому представители семейства Rex имеют гораздо большее сродство. В результате две молекулы $NADH$ замещают NAD^+ , что приводит к глобальным конформационным перестройкам Rex димера и нарушению его комплекса с ДНК (**рис. 34А**) [635]. Идея визуализировать реакцию взаимодействия Rex белка с пулом NAD с помощью FP одновременно и независимо была реализована научными коллективами в разных концах мира, в том числе в нашей лаборатории (созданный инструмент вошел в кандидатскую диссертацию автора настоящей работы). Биосенсоры на основе сенсорных белков семейства Rex представлены на **рисунке 34Б**.

Одним из первых опубликованных биосенсоров является Peredox [636]. Между двумя полноразмерными субъединицами Rex из *T.aquaticus* был интегрирован круговой пермутант cpT-Sapphire. При связывании $NADH$ Peredox демонстрирует интенсиметрический характер изменения сигнала \sim в 2,5 раза (Ex. 400 нм / Em. 510 нм). С целью получить ратиометрический тип сигнала авторы Peredox добавили к нему красный белок mCherry через длинный полипептидный линкер. Примечательно, что сам по себе NAD^+ не влияет на изменение спектральных свойств Peredox, однако NAD^+ и $NADH$ конкурируют за сайт связывания в Rex белке. Peredox имеет гораздо большее сродство к $NADH$ (\sim 5 нМ), но в клетках концентрация NAD^+ значительно выше, при этом сигнал Peredox зависит от общего пула NAD (NAD^+ и $NADH$). Это важно учитывать, поскольку помимо разницы в соотношении $NAD^+/NADH$ различные системы демонстрируют отличия и в общей концентрации NAD . Высокое сродство Peredox к $NADH$ накладывает ограничение в его применении в условиях повышенного содержания $NADH$, например, в митохондриальном матриксе, где Peredox находится полностью в $NADH$ -связанном состоянии. Peredox характеризуется высокой степенью специфичности и не демонстрирует изменения сигнала в ответ на $NADP^+$, $NADPH$, АТФ, АДФ, АДФ-рибозу, никотинамид, β -никотинамидмононуклеотид, АМФ и аденозин,

кроме того, для используемого в биосенсоре FР характерно низкое значение рКа (~ 5,0), поэтому сигнал стабилен при изменениях рН [636].

В этом же выпуске журнала *Cell Metabolism*, где был опубликован *Peredox*, коллектив других авторов опубликовал еще один биосенсор под названием *Frex* [637]. *Frex* устроен по тому же принципу: между двумя субъединицами белка *Rex* из *B.subtilis* интегрирован *srYFP*, причем одна субъединица является полноразмерной, а другая представлена только NADH-связывающим доменом. Биосенсор демонстрирует типичные для *srYFP* спектральные характеристики (Ex. 420 нм и Ex. 500 нм / Em. 518 нм). Методом сайт-направленного мутагенеза вблизи лиганд-связывающего сайта удалось получить несколько версий белка с разными свойствами. *Frex* демонстрирует ратиометрическое изменение сигнала ~ в 9 раз при K_D к NADH 3,7 мкМ. Более чувствительная к NADH версия *FrexH* (K_D 40 нМ) демонстрирует меньшую амплитуду ответа, изменение составляет ~ в 3 раза. Также была получена версия *S3L194K* с очень низким значением K_D для NADH (~ 50 мкМ), амплитуда ответа ~ в 4 раза. Таким образом, семейство биосенсоров *Frex* представлено несколькими версиями, что обеспечивает выбор инструмента при конкретных условиях. NAD^+ , $NADP^+$, $NADPH$, ATP , ADP не влияют на спектральные характеристики *Frex*, однако при работе с этими биосенсорами необходимо учитывать их чувствительность к изменениям рН. *Frex* биосенсоры позиционируют в качестве инструментов для регистрации свободного NADH, а не соотношения $NAD^+/NADH$ [637,638]. Однако концентрация обеих форм все же влияет на сигнал представителей *Frex*, что необходимо учитывать в конкретной системе исследования. Например, в условиях сравнения концентраций NAD^+ от 100 мкМ, что характерно для цитозоля клеток млекопитающих, до 1 мМ, характерного для бактерий, максимальная амплитуда ответа и K_D будут не одинаковы в указанных системах [639].

Позже был получен еще один биосенсор *RexYFP* [640]. От дизайна *Peredox* и *Frex* данный биосенсор отличается тем, что флуоресцентное ядро, в качестве которого был выбран *srYFP*, интегрирован не между двумя субъединицами *Rex* белка, а между нуклеотид- и ДНК-связывающими доменами одной субъединицы. Таким образом, изменение флуоресцентного сигнала *RexYFP* обусловлено конформационными перестройками в пределах одной субъединицы *Rex*. *RexYFP* меньше по размеру в сравнении с *Peredox* и *Frex*, что может быть актуально при создании сложных генетических конструкций или доставке гена. Связывание NADH приводит к 2-кратному изменению интенсимоетрического сигнала *RexYFP* (Ex. 490 нм / Em. 516 нм). Значение K_D *RexYFP* для NADH составляет 180 нМ, что располагает этот биосенсор по данному

параметру между K_D Peredox и Frex. Как оказалось, данное значение K_D оптимально для биосенсора как при использовании в цитозоле, так и в матриксе митохондрий клеток млекопитающих. Недостатком RexYFP является его чувствительность к изменениям pH, поэтому в каждой серии экспериментов с применением данного инструмента требуется постановка соответствующего pH контроля. Кроме того, хоть и с меньшим значением K_D (6,2 мкМ), но NADPH также вызывает изменение сигнала RexYFP. NADPH содержится в клетках в гораздо меньших концентрациях по сравнению с NADH. Однако возможные эффекты NADPH на динамику сигнала RexYFP не могут быть полностью исключены в некоторых системах [640].

На сегодняшний день самым совершенным инструментом в семействе признан биосенсор SoNar [641]. Как и RexYFP, этот биосенсор построен на базе одной субъединицы Rex, причем ДНК-связывающий домен был удален, поэтому SoNar обладает наименьшими размерами в данном классе биосенсоров. Для SoNar был также применен *crYFP*, поэтому белок демонстрирует типичные спектральные характеристики (λ_{ex} 420 нм и λ_{ex} 500 нм / λ_{em} 518 нм). Сигнал изменяется радиометрически, причем как при связывании NADH, так и NAD^+ . При связывании NADH в спектре возбуждения флуоресценции происходит увеличение интенсивности в области пика 420 нм при пропорциональном уменьшении в области 500 нм. NAD^+ приводит к увеличению интенсивности пика при 500 нм. Максимальное изменение сигнала составляет ~ 15 раз в условиях *in vitro*, что является рекордом в семействе биосенсоров на NAD(H). Значение K_D для NADH составляет ~ 200 нМ, для NAD^+ ~ 5 мкМ. Таким образом, SoNar является истинным биосенсором для регистрации динамики соотношения $NAD^+/NADH$. SoNar не чувствителен к изменениям $NADP^+$, NADPH, ATP, ADP. Авторы также позиционируют SoNar устойчивым к изменениям pH. В частности, в оригинальной статье показано, что сигнал протонированной формы хромофора (λ_{ex} 420 нм) стабилен при изменении pH, однако в небольшом диапазоне изменений 7,0-7,8 [641]. С практической точки зрения использование интенсимоетрического сигнала неудобно. Возможно применение pH контролей, в качестве такового авторы предлагают использовать *crYFP*. Однако важно иметь в виду, что свойства *crYFP* и SoNar, а также любого другого биосенсора и отдельно взятого FP могут существенно различаться.

Дополнил данную коллекцию инструментов биосенсор FiNad [642] для регистрации динамики NAD^+ . Биосенсор построен на том же принципе, что и SoNar, на базе нуклеотид-связывающего домена Rex из *T.aquaticus* и интегрированного в его структуру *crYFP*. Интенсимоетрический сигнал FiNad (λ_{ex} 500 нм / λ_{em} 518 нм) изменяется как в ответ на NAD^+ (K_D 14 мкМ), так и NADH (K_D 1,5 мкМ). Другие

нуклеотиды не вызывают изменения сигнала, однако установили, что АТФ и АДФ конкурируют с NAD(H) за сайт связывания и поэтому при физиологических концентрациях АТФ/АДФ K_D сенсора к NAD⁺ сдвигается до значения 1,3 мМ, к NADH увеличивается до 100 мкМ. Учитывая значения K_D , а также тот факт, что АТФ/АДФ не влияют на сигнал биосенсора и к тому же в основном поддерживаются в клетке на определенном уровне, позволяют рассматривать FiNad в качестве селективного биосенсора к NAD⁺. FiNad чувствителен к изменению рН, поэтому влияние данного параметра также необходимо учитывать в конкретной исследуемой системе. Для получения ратиометрического типа сигнала к FiNad через пептидный линкер добавили красный белок mCherry. FiNad был успешно протестирован в различных моделях и разных типах клеток [642]. Следует отметить, что в матриксе митохондрий уровень NADH значительно выше по сравнению с цитозолем или ядром, NADH может увеличиваться и при некоторых метаболических нарушениях, поэтому в таких системах невысокую чувствительность FiNad к NADH все же необходимо учитывать.

Не все биосенсоры данной категории были получены на основе одного из гомологов Rex. Основой для биосенсора LigA-crVenus послужил нуклеотид связывающий домен бактериальной ДНК лигазы, в структуру которой был интегрирован crVenus (Ex. 500 нм / Em. 520 нм) (рис. 34В) [643]. Флуоресцентный сигнал детектируется также при возбуждении светом 405 нм, при связывании лиганда спектр белка не меняется в этой области, поэтому авторы предлагают рассчитывать сигнал как ратиометрический (F_{488}/F_{405}). Биосенсор демонстрирует обратимый ответ по отношению к NAD⁺ (K_D 65 мкМ), ферментативная активность белка при этом была устранена внесением точечных мутаций. Биосенсор демонстрирует небольшие изменения сигнала при колебаниях рН в диапазоне 6,5 – 8,0, поэтому в качестве рН контроля предложено использовать crVenus [643]. Несмотря на то, что в оригинальной работе данный биосенсор был протестирован к довольно широкому спектру соединений, родственных NAD⁺, однако последующие исследования выявили его чувствительность к никотинамидмононуклеотиду и никотинамидрибозиду [642].

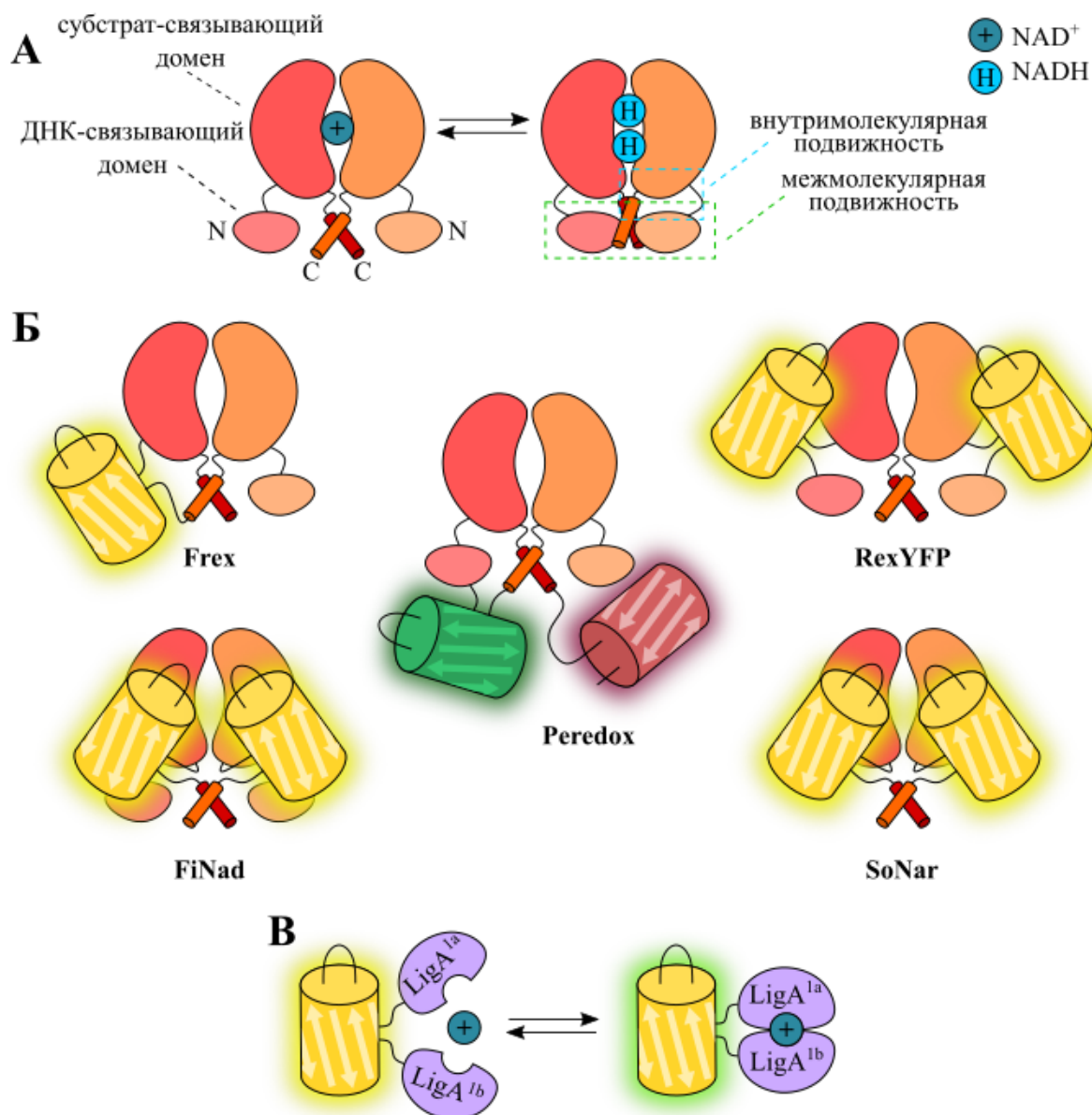


Рисунок 34. Генетически кодируемые флуоресцентные биосенсоры для регистрации $\text{NAD}(\text{H})$. (А) Схема функционирования транскрипционного фактора Rex. (Б) Семейство биосенсоров на основе белка Rex. (В) Биосенсор *LigA-cpVenus* на основе инактивированной бактериальной ДНК-лигазы.

1.2.3.14 Биосенсоры для регистрации $\text{NADP}(\text{H})$

Первые биосенсоры для регистрации динамики $\text{NADP}(\text{H})$ были основаны на FRET взаимодействии. В одной из таких реализаций FRET пара CFP/YFP была соединена через кетопантоат редуктазу (рис. 35А), этот фермент претерпевает значительные конформационные перестройки при связывании лиганда, влияя, таким образом, на эффективность FRET [644]. Данная версия взаимодействует с NADP^+ и NADPH , однако демонстрирует небольшую амплитуду ответа, но главным недостатком является K_D инструмента ~ 4 мМ, что находится вне диапазона физиологических концентраций. Дальнейшая оптимизация, затрагивающая линкерную часть и аминокислотные остатки,

непосредственно участвующие в связывании NADP^+ , привела к созданию версии с увеличенной амплитудой ответа и лучшей селективностью, хотя значение K_D по-прежнему было далеко от идеальных для применения инструмента в живых клетках (~ 2 мМ) [644].

Принцип работы биосенсора Apollo- NADP^+ основан на свойстве глюкозо-6-фосфат дегидрогеназы (G6PD) формировать гомодимеры при взаимодействии с NADP^+ , в отсутствие лиганда фермент представлен неактивным мономером [645]. Для данного инструмента характерен нетипичный сигнал регистрации – детектируется не интенсивность флуоресценции, а ее анизотропия. Это явление, которое описывает отличия в интенсивности испускаемого хромофором света вдоль осей поляризации. Таким образом, в основе функционирования Apollo- NADP^+ явление homoFRET, которое представляет FRET взаимодействие между одинаковыми FP. При эффективном FRET в такой системе анизотропия флуоресценции уменьшается. Т.е., мономерную форму Apollo- NADP^+ и димерную NADP^+ -связанную невозможно различить по флуоресценции, но можно различить по ее анизотропии (**рис. 35Б**). Это было показано на белковом препарате выделенного биосенсора, где наблюдается линейная зависимость анизотропии от состава фракции мономер/димер. В одном из вариантов биосенсора к глюкозо-6-фосфат дегидрогеназе был добавлен FP Venus, в другом – Cerulean [645]. Также была получена версия на основе mTurquoise2 [646]. NADP^+ индуцирует димеризацию глюкозо-6-фосфат дегидрогеназы, что сокращает расстояние между homoFRET парой и уменьшает анизотропию флуоресценции для всех представленных версий. Для устранения ферментативной активности в последовательность глюкозо-6-фосфат дегидрогеназы было внесено несколько точечных мутаций. Версия на основе Venus демонстрирует быстрый, специфичный, обратимый сигнал в ответ на изменение NADP^+ , который при этом стабилен при pH изменениях в диапазоне 7,25–8,0. Чувствительность Apollo- NADP^+ к лиганду сопоставима с исходной для глюкозо-6-фосфат дегидрогеназы ($K_D \sim 0,1\text{--}20$ мкМ) [645]. Требование специального в лаборатории оборудования является главным ограничением широкого применения этого инструмента. Кроме того, трудности при измерениях с помощью Apollo- NADP^+ могут возникнуть в моделях *in vivo* из-за эффектов, связанных с рассеянием света в тканях.

Поскольку укладка Россмана в структуре белков может связывать разные нуклеотиды, возникла оригинальная идея сменить специфичность у одного из существующих биосенсоров с NAD(H) на NADP(H) [647]. В качестве основы был выбран биосенсор SoNar [641], в лиганд-связывающую область которого внесли ряд модификаций. Идея основывалась на создании положительного заряда и уменьшении жесткости структуры вблизи предполагаемой 2'-фосфатной группы NADPH [647]. В результате

мутагенеза было получено несколько версий белка с разной аффинностью к NADPH (со значениями $K_D \sim 2,0$ мкМ, $\sim 6,0$ мкМ, ~ 25 мкМ и ~ 120 мкМ), при этом модифицированный SoNar полностью утратил способность взаимодействовать с NAD^+ и NADH. Новый тип биосенсоров получил название iNar (**рис. 35В**). Версии iNar унаследовали многие свойства исходного SoNar, например, демонстрируют выраженное радиометрическое изменение сигнала при связывании лиганда. Для iNar1 характерна максимальная амплитуда ответа \sim в 9 раз. Как и для SoNar, авторы iNar описывают устойчивость сигнала протонированной формы хромофора к изменениям pH в узком диапазоне 7,0-8,2, что, следовательно, при таком использовании теряет радиометрический тип сигнала. Поэтому было предложено использовать дополнительный pH-стабильный RFP, закодированный с биосенсором в одну последовательность гена. Для семейства iNar была также разработана контрольная версия iNarс, которая характеризуется мутациями в домене Rex по ключевым позициям, полностью устраняющим связывание NADPH. Таким образом, iNarс не демонстрирует изменений сигнала на целевой аналит, но при этом конструкция обладает аналогичными характеристиками по остальным свойствам [647].

В другом типе биосенсоров для визуализации динамики NADP(H) был реализован принцип взаимодействия roGFP2 с пулом $NADP^+/NADPH$. Посредником в переносе электронов в такой системе была выбрана NADPH-зависимая TrxR C из риса, которая кроме канонического домена TrxR имеет на С-конце встроенный домен Trx. Такой белок соединили с roGFP2 с помощью длинного линкера, конструкция получила название NERNST [648]. В предложенной системе электроны передаются от пула NADPH на FAD и две пары Cys, принадлежащих TrxR, с последующей передачей восстановительных эквивалентов от TrxR на дисульфид roGFP2, вызывая изменение спектральных характеристик (**рис. 35Г**). Данная реакция полностью обратима. В тестах *in vitro* продемонстрировано эффективное восстановление NERNST в системе с NADPH, при этом на данную реакцию не влияют NAD(H), пул глутатиона, присутствие других Trx. Биосенсор может быть окислен H_2O_2 , однако для этого требуются очень высокие концентрации, которые маловероятны в биологических системах. NERNST был успешно протестирован в различных биологических системах, в том числе *in vivo*. Стандартный редокс-потенциал биосенсора составляет ~ -280 мВ [648]. NERNST сочетает в себе преимущества roGFP2, что позволяет, например, рассчитывать абсолютные значения E_{NADPH} , в том числе в условиях физиологических изменений pH, поскольку для roGFP2 характерен pH-стабильный радиометрический сигнал. Однако нельзя исключать, что в некоторых условиях редокс-активные Cys roGFP2 в составе биосенсора NERNST могут по-прежнему взаимодействовать с пулом глутатиона благодаря эндогенным Grx, хотя данная реакция

1.2.3.15 Мировая коллекция редокс-биосенсоров. Заключение

Без преувеличения биосенсоры на основе FP открывают новую эпоху в области редокс-биологии. На сегодняшний день получена обширная коллекция, которая состоит из нескольких десятков подобных инструментов, большинство из них представляют безальтернативный подход визуализации динамики многих редокс-параметров. В представленной **Таблице 3** мы классифицировали все доступные на настоящий момент редокс-биосенсоры с их свойствами.

Безусловно, в арсенале биохимиков давно имеются доступные подходы для определения редокс-статуса пулов глутатиона, NAD(H), NADP(H), а также представлен перечень методов по выявлению редокс-модификаций различных молекул и маркеров окислительного стресса [649]. Редокс-биосенсоры на основе FP оказались незаменимы в исследовании низкомолекулярных высокореактивных соединений, для которых характерны крайне малые времена жизни с момента их образования в клетке. Ранее используемые методы в основном были косвенными, позволяющими выявить лишь последствия предполагаемого процесса, а не его протекание в динамике. Кроме того, всегда возникал вопрос специфичности. Например, -SH группа Cys является мишенью многих внутриклеточных окислителей, преобразуясь в модификацию -SOH. Однако это происходит как при взаимодействии с H₂O₂, так и при взаимодействии с HOCl, т.е. совершенно разные редокс-процессы приводят к одному и тому же результату, при этом константы скорости этих реакций различаются на 7 порядков [160,246]. Таким образом, по конечному продукту реакции крайне сложно определить химическую природу процесса. Это яркий и далеко не единственный пример в редокс-биологии. Сегодня известно, что в клетках существует множество источников продукции АФК, которые распределены по разным компартментам и имеют сложную регуляцию. Сами представители АФК взаимодействуют со множеством внутриклеточных мишеней различной природы, и, как правило, с разными константами скоростей. Поэтому всегда был интерес к созданию прямых методов детекции редокс-компонентов по отдельности. Для регистрации, например, тех же АФК было получено большое количество синтетических красителей, которые меняют свои оптические свойства при взаимодействии с окислителями [650–652]. Химические красители позволили решить лишь часть из поставленных задач, в некоторых простых системах они действительно позволяют регистрировать исследуемые редокс-события. Однако возникают сложности по загрузке таких красителей в живые клетки и особенно их локализации в определенных компартментах, многие из таких красок демонстрируют низкую специфичность, необратимость ответа или токсические эффекты.

Таблица 3. Современная коллекция генетически кодируемых редокс-биосенсоров на основе FP.

Для создания полного перечня всех существующих на данный момент редокс-биосенсоров в таблицу включены также инструменты, созданные при участии автора диссертации (биосенсоры отмечены значком ►).

Обозначения в таблице: EC_{50} – полумаксимальная эффективная концентрация; k – константа скорости; K_D – константа диссоциации; K_M – константа Михаэлиса; LOD – предел детекции; $t_{0,5}$ восстановления/окисления – полупериод восстановления/окисления; * – значения рассматриваемых параметров представлены на основе родственных белков-биосенсоров.

Название	λ_{ex} , нм	λ_{em} , нм	Амплитуда ответа	pH чувствит.	Известная кросс-реактивность	Кинетические термодинамические параметры	Особенности, которые важно учитывать при использовании	ссылки
<i>Глутатион (GSH)</i>								
rxYFP	513	527	~2,2-раз	+		$E^{\circ'} = -261$ мВ $k(\text{GSSG}) = 72 \text{ M}^{-1} \text{ мин}^{-1}$	Чувствителен к анионам галогенов	[517, 622]
roGFP1	400/475	510	~6-раз	–		$E^{\circ'} = -291$ мВ $k(\text{H}_2\text{O}_2) = 0,42 \text{ мин}^{-1}$ $k(\text{DTT}) = 0,11 \text{ мин}^{-1}$	Соотношение может меняться в результате фотоактивации.	[604, 611, 621]
roGFP2	400/490	510	~6-11-раз	–	НОСl, полисульфиды, H_2O_2 (высокие концентрации)	$E^{\circ'} = -280$ мВ	По сравнению с roGFP1 лучше подходит для наиболее распространенных в лабораториях параметров оптических систем.	[604, 609, 624, 653, 654]
roGFP1-R12	395/475	510	~5,6-раз	–		$E^{\circ'} = -265$ мВ $k(\text{H}_2\text{O}_2) = 2,05 \text{ мин}^{-1}$ $k(\text{DTT}) = 0,66 \text{ мин}^{-1}$	Улучшенные кинетические параметры по сравнению с roGFP1.	[621]
rxYFP3R	512	523	~2,2-раз	+		$k(\text{GSSG}) = 934 \text{ M}^{-1} \text{ мин}^{-1}$	Улучшенные кинетические параметры по сравнению с rxYFP.	[622]
Grx1-roGFP2	400/490	510	~5-6-раз	–	НОСl, полисульфиды, N-хлоротаурин	$E^{\circ'} = -280$ мВ	Окисление GSSG происходит как минимум в 100000 раз быстрее по сравнению с roGFP2. Может сочетаться с мутациями суперфолда.	[523, 625, 653-655]
roClover1	~409/505	~454/510	~6,8-раз	+			Не определены селективность и $E^{\circ'}$, низкая яркость. Устойчив к фотоактивации.	[611]
roGFP1-iL	395/465	505	~7,2-раз	–		$E^{\circ'} = -229$ мВ $k(\text{цистин}) = 0,22 \text{ мин}^{-1}$ $k(\text{DTT}) = 0,77 \text{ мин}^{-1}$	Лучше подходит для компарментов с окисляющими условиями.	[608]

roGFP1-iE	395/465	505	~4,5-раз	–		$E^{\circ'} = -236$ мВ $k(\text{цистин}) = 0,14 \text{ мин}^{-1}$ $k(\text{ДТТ}) = 0,33 \text{ мин}^{-1}$	Лучше подходит для компартментов с окисляющими условиями.	[608]
roGFP2-iL	395/488	510*	~3,1-раз	–		$E^{\circ'} = -238$ мВ	Лучше подходит для компартментов с окисляющими условиями. Более быстрое восстановление по сравнению с roGFP2.	[609]
Oba-Qs	360	425	~2-раз	+		$E^{\circ'} = -232$ мВ		[612]
Oba-Qb	375	440	нет измер.	нет измер.		$E^{\circ'} = -263$ мВ		[612]
Oba-Qc	425	490	~2-раз	–		$E^{\circ'} = -249$ мВ	Может быть связан с Grx1. Может быть связан с mCherry Δ C7 для ратиометрического типа сигнала.	[612]
Oba-Qc2	430	480	2,4-раз	–		$E^{\circ'} = -267$ мВ		[613]
Oba-Qc3	430	480	2,4-раз	–		$E^{\circ'} = -259$ мВ		[613]
Re-Qc	430	480	1,9-раз	–		$E^{\circ'} = -286$ мВ		[613]
Re-Qy1	515	525	8,1-раз	+		$E^{\circ'} = -263$ мВ	Может быть связан с TagBFP Δ C12 для ратиометрического типа сигнала.	[613]
Re-Qy2	512	525	10,3-раз	+		$E^{\circ'} = -251$ мВ		[613]
► Grx1-roCherry	589	610	~2-раз	+/-	N-хлоротаурин, •NO	$E^{\circ'} = -311$ мВ		[655]
rxmRuby2	560	600	~1,3-раз	+/-	H ₂ O ₂ , ONOO ⁻	$E^{\circ'} = -265$ мВ	Чувствительность ниже, чем у rxYFP.	[656]
FROG/B	389-399	450/500	~3-раз	+	(окисленная форма)	$E^{\circ'} = -293$ мВ	Удобен для визуализации движущихся клеток.	[618]
RxRFP	576	600	4-раз	+	ONOO ⁻ , O ₂ ^{•-}	$E^{\circ'} = -281$ мВ		[616]
RxRFP1.1	576	600	4,5-раз	+		$E^{\circ'} = -324$ мВ		[617]
RxRFP1.2	576	600	3,8-раз	+		$E^{\circ'} = -272$ мВ		[617]
RxRFP1.3	576	600	3,6-раз	+		$E^{\circ'} = -251$ мВ		[617]
RxRFP1.4	576	600	4,1-раз	+		$E^{\circ'} = -244$ мВ		[617]
FLIP-G	450*/510*	485/535	~1,2-раз	–		K _D = 282 μ M	Связывает только GSH.	[628]

Микотиол (MSH)

Mrx1-roGFP2	390/490	510	~8-раз	–		$E^{\circ'} = -280$ мВ		[525]
<i>Бациллитоил (BSH)</i>								
Brx-roGFP2	405/488	510*	~4-раз	–	HOCl, H ₂ O ₂ (высокие концентрации)			[624]
<i>Трипанотион (T(SH)₂)</i>								
Trx-roGFP2	400/485	520	нет измер.	–*	GSSG	нет измер.		[625]
<i>Тиоредоксин (Trx)</i>								
TrxRFP1	576	600	4-раз	+*		K _M с TrxR1 = 2,63 μM t _{0.5} восстановления = 8,8 с t _{0.5} окисления = 6,8 с		[526, 631]
TrxRFP2	576*	600*	4,5-раз	+*		t _{0.5} восстановления = 5,1 с t _{0.5} окисления = 3,9 с	Более быстрое восстановление и окисление, чем у TrxRFP1. Наблюдается увеличенная амплитуда в клеточной культуре.	[631]
MtrxRFP2	575	600	3,5-раз	+*			Лучше подходит для митохондриального матрикса.	[631]
CROST1	435*/515*	480/530	~2,7-раз	+	(окисленная форма)	$E^{\circ'} = -266$ мВ при pH 7,5	Работает ~ в 10 раз быстрее, чем CROST2. Преимущественно взаимодействует с Trx f типа.	[632]
CROST2	435*/515*	480/530	~2,7-раз	+	(окисленная форма)	$E^{\circ'} = -296$ мВ при pH 7,5	Преимущественно взаимодействует с Trx f и m типов.	[632]
<i>Полисульфиды</i>								
psGFP1.1	400/475-490	нет измер.	~1,15-раз	–		$E^{\circ'} = -318$ мВ	Низкие кинетические параметры, но реагирует с HSSH быстрее, чем с GSSH.	[629]
psRFP	(406)/587	(466)/610	~5-раз	+	(окисленная форма)	$E^{\circ'} = -363$ мВ	Очень низкая яркость. Низкие кинетические параметры, но реагирует с HSSH быстрее, чем с GSSH.	[630]
<i>Пероксид водорода (H₂O₂)</i>								
HuPer	420/500	516	~3-раз	+		k(H ₂ O ₂) = ~5,0x10 ⁵ M ⁻¹ c ⁻¹	LOD 5-10 μM H ₂ O ₂ в клетках.	[555, 561]
►HuPer2	420/500	516	~7-раз	+		k(H ₂ O ₂) = ~1,2x10 ⁵ M ⁻¹ c ⁻¹	LOD 5-10 μM H ₂ O ₂ в клетках.	[560, 561]
►HuPer3	420/500	516	~7-раз	+		k(H ₂ O ₂) = ~2,5x10 ⁵ M ⁻¹ c ⁻¹	LOD 5-10 μM H ₂ O ₂ в клетках.	[561]

►HyPer7	400/499	516	~10-раз	–	Кумилгидропероксид, гидропероксид бензоила, трет-бутилгидропероксид	Начальная скорость реакции с H ₂ O ₂ в 86 раз выше, чем для HyPer3.	В 15 раз ярче HyPer3. Чувствителен к H ₂ O ₂ в низких нМ концентрациях. Восстанавливается Тгх.	[562]
►HyPerRed	575	605	~1,8-раз	+		$k(\text{H}_2\text{O}_2) = \sim 3 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$	LOD 10 μM H ₂ O ₂ в клетках.	[563]
TriPer	405/488	515*	~1,75-раз	+*			Лучше подходит для компартментов с окисляющими условиями.	[570]
NeonOxIrr	508	520	~3-раз	–		Период полувосстановления в бактериях составляет 280 мин.	В 6-10 ярче HyPer3. В 6 раз быстрее созревание при 37°C. Медленное восстановление может быть использовано в качестве эффекта «памяти» редокс-состояния.	[571]
roGFP2-Orp1	400/490	510	~5-6-раз	–	НОСІ, ONOO ⁻ , полисульфиды		LOD сравним с HyPer в клетках. Кинетика взаимодействия с H ₂ O ₂ медленнее по сравнению с HyPer.	[524, 654]
roGFP2-Tsa2ΔC _R	400/490	515	~6-раз	–	трет-бутилгидропероксид, НОСІ		Чувствителен к H ₂ O ₂ в низких нМ концентрациях. Восстанавливается Ггх. Нефункционален в клетках млекопитающих.	[573, 574]
OxyFRET	433*/515*	475*/530*	~1,1-раз	–			Отвечает на 5-100 μM H ₂ O ₂ в клетках. Схожая кинетика с HyPer.	[577]
PerFRET	433*/515*	475*/530*	~1,2-раз	–			Отвечает на 5-100 μM H ₂ O ₂ в клетках. Схожая кинетика с HyPer.	[577]
PrxFRET	505*/559*	515*/600*	~1,1-раз	–	трет-бутилгидропероксид		Отвечает на 3 фмоль на клетку. Гораздо чувствительнее HyPer.	[576]
TScGP	515/500	520	~1,7-раз	+	трет-бутилгидропероксид		Чувствительность в 10 раз выше, чем у HyPer. Время полуокисления в два раза меньше по сравнению с HyPer. Не тестировали в эукариотических клетках.	[657]

<i>Сероводород (H₂S)</i>									
cpGFP- <i>pAzF</i>	481	509	~1,5-раз	нет измер.	DTT			Неприродная аминокислота в хромофоре. Необратимый ответ. Относительно медленная кинетика.	[600, 601]
hsGFP	452	500	~23-раз	нет измер.				Неприродная аминокислота в хромофоре. Необратимый ответ. Относительно медленная кинетика. Гораздо ярче, чем cpGFP- <i>pAzF</i> .	[601]
hsFRET	383*/452*	450/500	~3-раз	нет измер.	Слабый ответ на O ₂ ⁻ , HO [•]			Неприродная аминокислота в хромофоре. Необратимый ответ. Относительно медленная кинетика.	[602]
<i>Пероксинитрит (ONOO⁻)</i>									
pnGFP	484	508	~25-раз	нет измер.	Очень низкий ответ на H ₂ O ₂ .			Неприродная аминокислота в хромофоре. Необратимый ответ.	[590]
pnGFP-Ultra	484*	508*	~110-раз	нет измер.		EC ₅₀ = 19,5 μM		Неприродная аминокислота в хромофоре. Необратимый ответ.	[591]
sfGFP(66Thy)	485	510	~7-раз	нет измер.				Неприродная аминокислота в хромофоре. Необратимый ответ. Низкая интенсивность флуоресценции. Сравнимые с pnGFP кинетические параметры. Не тестировали в клетках.	[658]
pnRFP	572	594	~10-раз	нет измер.				Неприродная аминокислота в хромофоре. Необратимый ответ.	[592]
<i>Оксид азота (NO)</i>									
FRET-MT	434*/513*	480/535	нет измер.	нет измер.				Свойства не изучены на выделенном препарате белка. Его реакция может быть необратимой. Может влиять на клеточный метаболизм посредством высвобождения металлов.	[581]

geNOps series	Разные цвета	Разные цвета	1,07-1,18-раз	+ (версии на основе мКО _к более стабильны)		EC ₅₀ = 50-100 нМ в клетках	Требуется присутствие в среде Fe. Предварительная обработка H ₂ O ₂ снижает чувствительность. Циановая версия может быть связана с tagRFP для радиометрического типа сигнала.	[522, 587]
Myoglobin-mCherry-EYFP	513*/587*	527*/610*	~1,2-раз	нет измер.	Чувствует все стимулы, которые переводят гем в состояние <i>met</i> .		Может использоваться для одновременного измерения концентрации O ₂ и образования <i>met</i> -гема.	[659, 660]
<i>(Псевдо)гипогалогенные кислоты (HOCl, HOBr, HOClN)</i>								
► Hypocrates	424/500	515-522	~2-раза	+	ONOO ⁻	k(NaOBr) = ~4,5 × 10 ⁶ М ⁻¹ с ⁻¹ k(NaOCl) = ~1,4 × 10 ⁶ М ⁻¹ с ⁻¹ k(N-хлоротаурин) = ~6.1 × 10 ⁴ М ⁻¹ с ⁻¹	При высоких концентрациях HOBr и HOCl ответ частично необратим.	[661]
<i>Метионин сульфоксид (MetO)</i>								
MetSOx	425/505	510-516	~6-раз	+	H ₂ O ₂ , NaOCl	E ^o ' = -276 мВ EC ₅₀ (fMetSO) = 1 μM EC ₅₀ (pMetSO) = 1 μM	Слабый сигнал в клетках млекопитающих.	[597]
MetROx	425/505	510-516	~6-раз	+	H ₂ O ₂ , NaOCl	E ^o ' = -293 мВ EC ₅₀ (fMetRO) = 450 μM EC ₅₀ (pMetRO) = 0,5 μM	Низкая чувствительность к fMetRO. Контрольная версия демонстрирует существенные различия в спектре.	[597]
TYfR	430/500	535	нет измер.	+			Высокая чувствительность к fMetRO (LOD ~250-500 нМ <i>in vitro</i>).	[598]
GEPMO	390/495	516	~2-раза	-		k(H ₂ O ₂) = ~10 ⁻² -10 ⁻³ М ⁻¹ с ⁻¹ k (HOCl) = ~10 ⁵ М ⁻¹ с ⁻¹	Необратимый ответ в клетках.	[599]
<i>NADH</i>								
Frex	420/500	518	~9-раз	+		K _D = ~3,7 μM	сpYFP предложен в качестве контроля. Увеличение концентрации NAD ⁺ выше 100 μM приводит к снижению амплитуды ответа и увеличению K _D .	[637, 639]

FrexH	420/500	518	~3-раза	+		$K_D = \sim 40 \text{ нМ}$	срYFP предложен в качестве контроля. Лучше подходит для цитозоля и ядра.	[637]	
C3L194K (Frex)	420/500	518	~4-раза	+		$K_D = \sim 50 \text{ }\mu\text{М}$	срYFP предложен в качестве контроля. Лучше подходит для матрикса митохондрий.	[637]	
Peredox	400/587	510/610	~2,5-раза	-		$K_D = \sim 5 \text{ нМ}$	Зависит от общей концентрации NAD(H). Увеличение концентрации NAD^+ снижает сродство к NADH. Увеличение общей концентрации АТФ+АДФ снижает сродство к НАДН. Не подходит для митохондриального матрикса.	[636]	
► RexYFP	490	516	~2-раза	+	NADPH	$K_D(\text{NADH}) = \sim 180 \text{ нМ}$ $K_D(\text{NADPH}) = \sim 6,2 \text{ }\mu\text{М}$	SurHer предложен в качестве контроля. Более низкий молекулярный вес по сравнению с Frex(H) и Peredox.	[640]	
<i>NAD⁺</i>									
LigA-cpVenus	405/500	520	~2-раза	+	никотинамидмононуклеотид, никотинамидрибозид	$K_D = \sim 65 \text{ }\mu\text{М}$	срVenus предложен в качестве контроля.	[642, 643]	
FiNad	485	520	~7-раз	+	NADH	Без АТФ+АДФ: $K_D(\text{NAD}^+) = 14 \text{ }\mu\text{М}$ $K_D(\text{NADH}) = 1,5 \text{ }\mu\text{М}$ При физиологическом уровне АТФ+АДФ: $K_D(\text{NAD}^+) = 1,3 \text{ мМ}$ $K_D(\text{NADH}) = 100 \text{ }\mu\text{М}$	Значения K_D зависят от общей концентрации АТФ+АДФ. Может быть связан с mCherry для ратиометрического типа сигнала. срYFP-mCherry предложен в качестве контроля.	[642]	
<i>NAD⁺/NADH</i>									
SoNar	420/500	515	~15-раз	+		$K_D(\text{NAD}^+) = \sim 5,0 \text{ }\mu\text{М}$ $K_D(\text{NADH}) = \sim 0,2 \text{ }\mu\text{М}$ $K_{\text{NAD}^+/\text{NADH}} = \sim 40$	срYFP предложен в качестве контроля.	[641]	
<i>NADPH</i>									
iNap1	420/500	515	~9-раз	+		$K_D = \sim 2,0 \text{ }\mu\text{М}$	iNарс предложен в качестве контроля.	[647]	
iNap2	420/500	515	~9-раз*	+		$K_D = \sim 6,0 \text{ }\mu\text{М}$	iNарс предложен в качестве контроля.	[647]	

iNap3	420/500	515	~9-раз*	+		$K_D = \sim 25 \mu\text{M}$	iNарс предложен в качестве контроля.	[647]
iNap4	420/500	515	~9-раз*	+		$K_D = \sim 120 \mu\text{M}$	iNарс предложен в качестве контроля.	[647]
<i>NADP⁺</i>								
NADPsor	456*/513*	478/526	~40%	нет измер.		$K_D = \sim 2 \text{mM}$	<i>In vitro</i> диапазон обнаружения 1 μM – 10 мМ.	[644]
Apollo серия	Разные цвета	Разные цвета	~15-20%	+ (для некоторых версий)		$K_D = 0,1-20 \mu\text{M}$	Амплитуды ответа некоторых вариантов снижаются в кислой среде. Требуется измерение анизотропии флуоресценции.	[645]
<i>NADP⁺/NADPH</i>								
NERNST	387/488	515	> 6-раз	–	H ₂ O ₂	$E^{\circ'} = -280 \text{mV}$		[648]

Использование генетически кодируемых биосенсоров в эксперименте позволяет минимизировать влияние на исследуемую живую систему. Пробоподготовка заключается в доставке гена нужного биосенсора без нарушения целостности системы, что предотвращает, таким образом, сильное вмешательство в редокс-регуляцию. Классическим примером, демонстрирующим преимущество такого подхода, служит определение редокс-потенциала глутатиона (E_{GSH}). Генетически кодируемые биосенсоры позволили установить, что внутриклеточный пул глутатиона гораздо более восстановленный, чем принято было считать на основе данных, полученных другими методами, и соотношение $2GSH/GSSG$ находится в диапазоне между 50000:1 – 500000:1 [662]. Используя сигнальные метки в виде пептидных последовательностей, добавляемых на N- или C- конец, биосенсор легко можно локализовать в любом внутриклеточном компартменте. Существует множество таких примеров, биосенсоры локализуют в матриксе [555,663–666] и межмембранном пространстве [356,568,667,668] митохондрий, в люмене эндоплазматического ретикулума [669–672], в ядре [673,674], в пероксисомах [568,627,663,675]. Биосенсор легко можно локализовать в определенном типе клеток, контролируя экспрессию гена специфичным промотором.

Главное преимущество генетически кодируемых биосенсоров перед любым другим подходом исследования заключается в возможности регистрировать биохимические события в системах *in vivo* с использованием любых модельных организмов. Различные биосенсоры уже в рутинной практике применяют на популярных лабораторных животных, среди которых *Mus musculus*, *Xenopus laevis*, *Danio rerio*, *Drosophila melanogaster*, *Caenorhabditis elegans* и др. Модели *in vivo* позволяют выявлять механизмы редокс-регуляции глобальных биологических процессов. К настоящему моменту с помощью генетически кодируемых флуоресцентных редокс-биосенсоров получены уникальные сведения, которые позволили нам лучше понять механизмы, лежащие в основе процессов эмбриогенеза [676–678] и старения [665,679–681], воспаления [682–684] и регенерации [685,686], функционирования тканей и органов в норме и при развитии патологических состояний [687–692], также выявлены новые особенности редокс-регуляции организмов при формировании симбиотических [693,694] или паразитарных взаимодействий [695–700]. Исследования глобальных биологических процессов, задействующих разные типы клеток и тканей, не могут быть реализованы *in vitro* или с применением стандартных клеточных культур, а потому применяемые биосенсоры во многих случаях представляют собой инструментарий, попросту не имеющий альтернатив. Дальнейшее развитие этой области связано с пополнением мировой коллекции биосенсоров, поскольку многие из редокс-регуляторов и метаболитов клетки остаются по-прежнему «неуловимыми» для

исследователей. С другой стороны, новые задачи требуют оптимизации уже существующих биосенсоров, в частности, улучшения их характеристик для применения *in vivo*, такой биосенсор прежде всего должен обладать выраженной амплитудой ответа, достаточной яркостью, высокой специфичностью. Актуально создание версий биосенсоров с разными спектральными характеристиками, что позволяет применять мультипараметрический режим анализа. Настоящая работа посвящена созданию новых генетически кодируемых биосенсоров, а также разработке новых *in vivo* моделей с применением таких инструментов.

ГЛАВА 2

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе представлены разные типы генетически кодируемых биосенсоров. Поэтому в данной главе повествование для простоты изложения материала построено по следующему принципу: в разделе 2.1. будут изложены некоторые общие подходы, используемые при разработках и применении биосенсоров, а в последующих разделах будет представлена информация для конкретного инструмента и используемой биологической модели.

2.1 ОБЩИЕ МЕТОДЫ В РАБОТЕ С ГЕНЕТИЧЕСКИ КОДИРУЕМЫМИ БИОСЕНСОРАМИ

2.1.1. Манипуляции с генетическими конструкциями

2.1.1.1. Амплификация ДНК

Амплификацию ДНК фрагментов с помощью стандартных ПЦР проводили на приборе ДНК-амплификаторе C1000 Touch (BioRad). Реакционная смесь для ПЦР объемом 25-50 мкл содержала матричную последовательность (10-100 нг), праймеры (0,5-10 мкМ, Evrogen, последовательности праймеров для конкретных конструкций указаны в соответствующих разделах), эквимольную смесь дезоксинуклеотидтрифосфатов dNTP (по 200 мкМ каждого, Evrogen), полимеразу Tersus или Encyclo (Evrogen) с прилагаемым производителем буферным раствором. Режимы амплификации подбирали индивидуально для каждого конкретного случая.

Для сшивок нескольких последовательностей в единую конструкцию, в том числе при внесении в ген точечных мутаций, использовали подход ПЦР «overlap extension», в котором подразумевается использование в смеси фрагментов ДНК с комплементарными участками одновременно в качестве матрицы и праймеров [701].

Для внесения в конструкцию случайных мутаций применяли ПЦР, создавая условия для «ошибок» полимеразы. Для этого в состав реакционной смеси входили Taq полимеразы (Evrogen), праймеры (0,3 мкМ), dATP (200 мкМ), dTTP (200 мкМ), dCTP (200 мкМ), dGTP (360 мкМ), MnSO₄ (640 мкМ), матричная ДНК (20 пг). Увеличивали количество циклов программы до 27 вместо стандартных 20-22. При таких условиях ожидаемое количество мутаций составляет 4-5 на конструкцию в соответствии с протоколом РТ3393-1 (www.clontech.com).

2.1.1.2. ПЦР скрининг

Бактериальные колонии *E.coli*, содержащие ген нужной конструкции, отбирали по результатам ПЦР скрининга. Для этого использовали смесь Screen Mix (Evrogen), в пробу по методике производителя добавляли необходимые праймеры и биомассу бактериальных клеток. Полученные фрагменты анализировали с помощью ДНК-электрофореза.

2.1.1.3. Электрофорез ДНК фрагментов в агарозном геле

Полученные ДНК фрагменты анализировали методом электрофореза (1% агарозный гель, приготовленный на 1× TAE буфере с 0,5 мкг/мл бромистого этидия). Состав 50× TAE буфера: 50 мМ TRIS, 20 мМ ацетат натрия, 2 мМ ЭДТА, рН 8,0. Анализируемые образцы смешивали с красителем Gel Loading Dye, Blue (Evrogen). Электрофорез проводили в TAE буфере с добавлением бромистого этидия в той же концентрации при 100-180 мА в зависимости от задач, для препаративной очистки ДНК фрагментов из геля использовали более низкий ток. В случае препаративного электрофореза, когда ПЦР смесь разделяли на геле с целью последующего выделения фрагмента необходимой длины, из пластинки геля вырезали область с идентифицированной полосой с последующей очисткой ДНК с помощью набора Cleanup Standard (Evrogen). Для идентификации длины фрагмента использовали маркер 1 kbase ladder (SibEnzyme). Результаты анализировали с помощью прибора Alpha Imager 2000. Для выделения ДНК из геля использовали трансиллюминатор TF20M, с помощью которого визуализировали нужный фрагмент и вырезали его.

2.1.1.4. Рестрикция ДНК

Для последующего клонирования полученных фрагментов ДНК по сайтам рестрикции использовали ферменты эндонуклеазы рестрикции следующих фирм: Thermo Scientific, NEB, SibEnzyme, следуя рекомендациям производителей (используемые рестрикционные сайты указаны в разделах, посвященных конкретным конструкциям). Очистку ДНК фрагментов осуществляли с помощью набора Cleanup Standard (Evrogen).

2.1.1.5. Лигирование ДНК

Полученные фрагменты ДНК лигировали с использованием лигазы фага T4 и прилагаемого производителем буферного раствора (SibEnzyme, Promega), соотношение вектор:вставка составляла 1:3 в общем объеме смеси 10 мкл. В смесь добавляли 1 мкл фермента (20 ед/мкл).

2.1.1.6. Определение концентрации ДНК

Концентрацию ДНК в пробе определяли с помощью спектрофотометра Thermo Scientific NanoDrop 2000 при 260 нм с программным обеспечением NanoDrop 2000/2000c Software.

2.1.1.7. Трансформация бактериальных клеток

В работе использовали клетки *E. coli* штамма XL1 Blue (Invitrogen). Трансформацию проводили двумя способами. При низких концентрациях ДНК осуществляли электропорацию. Для этого полученные лигаты предварительно обессоливали, применяя метод осаждения ДНК этанолом. К размороженным на льду компетентным бактериальным клеткам добавляли образец (на фасовку компетентных клеток 40 мкл добавляли 10-150 нг ДНК), перемешивали и переносили суспензию в кювету для электропорации (BioRad). Манипуляцию проводили с помощью прибора MicroPulser (BioRad, программа Ec1). Сразу же после импульса к клеткам добавляли 1 мл среды SOB (2% триптон; 0,55% дрожжевой экстракт; 0,01 мМ Tris-HCl pH 8,0; 10 мМ NaCl; 10 мМ KCl; 20 мМ Mg²⁺) с последующей инкубацией в течение 1 часа при 37 °С и постоянном перемешивании (200 об/мин, Thermo-Shaker, Biosan). Далее клетки высевали на твердую агар среду, приготовленную на LB (1% триптон; 0,5% дрожжевой экстракт; 0,1% NaCl; 0,01 мМ Tris-HCl pH 8,0) с соответствующим антибиотиком (100 мкг/мл ампициллина или 40 мкг/мл канамицина).

При достаточном количестве ДНК материала проводили химическую трансформацию. Для этого компетентные бактериальные клетки также размораживали на льду и добавляли образец ДНК в концентрации от 200 нг. Далее клетки, находящиеся на льду, подвергали тепловому шоку в течение 45 с при 42 °С, после чего вновь помещали на лед на 2 мин. Далее высевали на твердую LB агаровую с антибиотиком (100 мкг/мл или 40 мкг/мл канамицина).

2.1.1.8. Культивирование бактериальных клеток

Выращивание бактериальных клонов на твердой агаровой среде проводили в чашках Петри. После трансформации клетки инкубировали в течение 14-16 часов при 37 °С. Бактерии также растили в жидкой LB среде с антибиотиком, пробы инкубировали 14-16 часов при 37 °С при постоянном перемешивании (200 об/мин, New Brunswick™ Excella® E25). Если бактериальные клетки готовили для получения белкового препарата какого-либо биосенсора, в некоторых случаях требовались дополнительные сутки для созревания хромофора, для этого чашки Петри или суспензии в пробирках оставляли на комнатной или даже пониженной температуре 17 °С (подробнее в разделе, посвященном получению белковых препаратов).

2.1.1.9. Выделение и анализ плазмидной ДНК

Плазмидную ДНК выделяли из суспензионной массы бактерий с помощью наборов Plasmid Miniprep (Evrogen), Plasmid Midiprep 2.0 (Evrogen) или QIAGEN-tip 100 (Qiagen), QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen) согласно рекомендациям производителей. Определение

нуклеотидной последовательности нужного гена заказывали в фирме Evrogen. Анализ данных осуществляли в программе DNASTar.

2.1.2. Скрининг бактериальных клонов по флуоресцентному сигналу

Бактериальные клоны *E.coli*, растущие на твердой агаровой среде, использовали для оценки флуоресценции тестируемых версий биосенсоров, а также для поиска перспективных клонов после раундов мутагенеза. Гены тестируемых биосенсоров доставляли в клетки бактерий. Для этого суспензию бактерий, как правило, подвергали электропорации, далее добавляли 1 мл SOB с последующей инкубацией в течение 1 ч при 37 °С и постоянном перемешивании (200 об/мин), суспензию клеток высевали на чашки Петри с агаром (100 мкг/мл Amp) по 100 мкл (10 таких чашек, на каждую по 100 мкл бактериальной суспензии в случае получения библиотеки после проведения мутагенеза). Условия подбирали таким образом, чтобы бактериальные клоны располагались на расстоянии приблизительно 1 мм друг от друга, при такой плотности их легче отбирать (общий расчет ~5–10 нг образца ДНК на чашку). Чашки инкубировали в термостате при 37°С в течение 12-16 часов.

После выроста бактериальных клонов оценивали интенсивность их флуоресценции с помощью флуоресцентного стереомикроскопа Olympus US SZX12. В случае анализа библиотек, полученных в ходе направленного или случайного мутагенезов, отбирали наиболее яркие клоны, которые высевали вновь на твердую или в жидкую среду для наработки бóльшей биомассы. Для более детального анализа снимали спектры возбуждения флуоресценции с помощью спектрофлуориметра Varian Cary Eclipse. Для этого наработанную биомассу бактерий вносили в 1 мл PBS. При анализе ответа биосенсора в бактериях добавляли в среду соответствующий аналит.

2.1.3. Получение белкового препарата биосенсора

Клетки *E.coli* штамма XL1 Blue трансформировали плазмидой pQE30 с геном нужного биосенсора, после чего высевали клетки на твердую агаровую среду, приготовленную на LB с добавлением ампициллина (100 мкг/мл). Вектор pQE30 содержал кассету 6xHis-tag, который добавляет к N-концу белка последовательность из 6 аминокислотных остатков His. Чашки Петри инкубировали 12-16 часов при 37 °С. Клетки *E.coli* с биосенсором Grx1-roCherry, Grx1-roGFP2, Hupocrates, SypHer3s инкубировали еще сутки на пониженной температуре 17 °С для созревания хромофора. Затем колонии смывали с поверхности агара охлажденным буфером PBS (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10

мМ Na₂HPO₄, 1,8 мМ KH₂PO₄, pH 7,4). В случае биосенсоров Grx1-roCherry, Grx1-roGFP2 буфер содержал 5 мМ 2-меркаптоэтанола. Далее клетки в суспензии подвергали разрушению ультразвуком с помощью прибора Sonic Vibra cell (программа: в течение 30 мин подавали 5 секундные импульсы с перерывами в 10 секунд, амплитуда 32%). Полученные лизаты центрифугировали в течение 20-25 мин при 20000×g, 4 °C (Centrifuge 5424 R, Eppendorf).

Белки очищали с помощью металл-аффинной хроматографии (Talon Metal Affinity Resin, Clontech, Takara). Колонку с 3,5-5 мл смолы (в зависимости от количества белка) предварительно уравнивали охлажденным PBS буфером (в случае с Grx1-roCherry и Grx1-roGFP2 буфер содержал 5 мМ 2-меркаптоэтанола). Образец лизата наносили на колонку, после чего промывали несколькими объемами (не менее 10) указанного буфера для освобождения от нецелевых соединений и белков. Целевой белок-биосенсор элюировали с носителя тем же буфером с добавлением 250 мМ имидазола. Для удаления из полученного препарата имидазола в дальнейшем проводили гель-фильтрацию на колонке с 10 мл Sephadex G-25 (GE Healthcare Life Sciences), уравновешенную охлажденным PBS.

Для полного восстановления биосенсоров Grx1-roCherry и Grx1-roGFP2 к полученным образцам добавляли 20 мМ DTT с последующей инкубацией в течение часа на льду. Для очистки образца белка от DTT непосредственно перед экспериментом проводили фильтрацию небольшого количества образца с использованием колонок Amicon Ultra-0.5 ml Centrifugal Filters при 14000×g, 4 °C в течение 35 мин.

Концентрацию белка в пробе определяли колориметрически с помощью бицинхоновой кислоты Bicinchoninic Acid Protein Assay Kit (Sigma) на планшетном ридере Tecan Infinite 200 PRO.

Белок NemR^{C106}, который использовали за основу для биосенсора Hupocrates, выделяли из жидкой культуры *E.coli* штамма BL21 (DE3). Клетки выращивали в среде LB с добавлением 50 мкг/мл канамицина при 37 °C. При достижении в суспензии значения A₆₀₀=0,8 индуцировали экспрессию гена добавлением в суспензию 0,5 мМ IPTG (isopropyl-β-D-thiogalactoside), после чего клетки инкубировали еще в течение 3 часов при 37 °C. Клетки осаждали при 4 °C и 5000 об/мин в течение 15 мин., после чего ресуспендировали в лизис буфере следующим составом: 50 мМ Tris/HCl pH 8,0, 0,2 М NaCl, 1 мМ DTT, 0,1 мг/мл AEBSF, 1 мкг/мл лейпептина, 50 мкг/мл ДНК-аза I, 20 мМ MgCl₂. После лизиса клеток пробы вновь центрифугировали по такому же протоколу. Супернатант инкубировали с носителем Ni²⁺-Sepharose 6 Fast Flow beads (Cytiva), который предварительно уравнивали буфером 50 мМ Tris/HCl pH 8,0, 0,2 М NaCl, 1 мМ DTT в течение 1 ч при 4 °C. Частицы носителя с NemR^{C106} переносили в колонку и проводили аффинную

хроматографию с помощью системы АКТА™ Pure (GE Healthcare, Life Sciences). Элюировали белок с носителя тем же буфером с добавлением имидазола с линейным градиентом 0-0,7 М. Чистоту белкового препарата оценивали с помощью не восстанавливающего электрофореза в полиакриламидном геле с добавлением SDS. Очистку проб осуществляли диализом в течение 12 ч при 4 °С в буфере с составом 50 мМ Tris-HCl pH 8,0, 0,2 М NaCl, 1 мМ DTT.

Для перевода белкового биосенсора из одного буфера в другой при необходимости использовали фильтрационную колонку Amicon Ultra-0.5 Centrifugal Filter Units (Millipore) или проводили гель-фильтрацию на колонке с Sephadex G-25 (GE Healthcare Life Sciences).

Все указанные в работе белки хранились в соответствующих буферных растворах при 4 °С и сохраняли свою активность на протяжении нескольких дней или даже недель. Перед каждым использованием биосенсоры тестировали на функциональность, анализируя диапазон ответа при добавлении соответствующего аналита.

2.1.4. Определение спектральных характеристик биосенсора

Измерение спектров флуоресценции очищенных белковых препаратов биосенсоров проводили в акриловых кюветках с длиной оптического пути 1 см на спектрофлуориметре Varian Cary Eclipse. Белковые препараты биосенсоров разводили в PBS в объеме 1 мл до конечной концентрации белка 40-500 нМ. Для исследования изменений спектральных характеристик биосенсора в пробу добавляли соответствующий аналит с последующей инкубацией в течение ~ 5 мин. Обратимость ответа биосенсора проверяли добавлением в ту же систему избытка восстановителя DTT (1-5 мМ) при длительной инкубации пробы до 1 часа.

Спектры возбуждения флуоресценции биосенсоров на основе белка cpYFP регистрировали при эмиссии 520 нм. Спектр возбуждения флуоресценции Grx1-roCherry регистрировали при эмиссии 610 нм. Спектр эмиссии флуоресценции Grx1-roCherry регистрировали при возбуждении 589 нм. Спектр возбуждения флуоресценции Grx1-roKate регистрировали при эмиссии 624 нм. Спектр эмиссии флуоресценции Grx1-roCherry регистрировали при возбуждении 585 нм.

Коэффициент молярной экстинкции (ϵ) рассчитывали по уравнению:

$\epsilon = A \times C^{-1} \times L^{-1}$, где A – оптическая плотность пробы в максимуме поглощения; C – концентрация белка в М; L – длина оптического пути в см.

Квантовый выход (QY) флуоресценции биосенсоров измеряли по уравнению:

$QY_{\text{биосенсора}} = QY_{\text{контр. белка}} \times (A_{\text{контр. белка}} \times Em_{\text{биосенсора}} \times A_{\text{биосенсора}}^{-1} \times Em_{\text{контр. белка}}^{-1})$, где A – оптическая плотность в максимуме поглощения, Em – интенсивность в максимуме эмиссии. Для определения QY неизвестного белка используют белок сравнения с максимально похожими спектральными характеристиками и известным QY . Для Grx1-roCherry в качестве белка сравнения мы использовали mCherry при одинаковых концентрациях (QY_{mCherry} 0,22; максимум поглощения Grx1-roCherry и mCherry – 589 нм; максимум эмиссии Grx1-roCherry и mCherry – 610 нм). Для Grx1-roKate белком сравнения был выбран mKate2 (QY 0,4; максимум поглощения Grx1-roKate и mKate2 – 590 нм; максимум эмиссии Grx1-roKate и mKate2 – 624 нм). Для Нурocrates в качестве белка сравнения использовали EYFP при одинаковых концентрациях (QY_{EYFP} 0,67 (Fpbase ID: 8DNLG); максимум поглощения Нурocrates – 425 нм и 500 нм; максимум поглощения EYFP – 519 нм; максимум эмиссии Нурocrates – 513 нм; максимум эмиссии EYFP – 533 нм).

Для определения точной концентрации зрелого хромофора YFP использовали подход щелочной денатурации. Для этого образцы Нурocrates и EYFP смешивали в PBS с 1M NaOH в соотношении к 1:1, после чего инкубировали пробы в течение 5 мин. При данных условиях YFP претерпевают денатурацию, при которой зрелой хромофор переходит в форму, поглощающую при 445 нм с известным значением $\epsilon=44000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ [702].

2.1.5. Определение зависимости сигнала биосенсора от pH

Чтобы определить, как сигнал биосенсора зависит от значения pH среды, а также для расчета значения pK_a мы готовили ряд буферных растворов с известным значением pH:

- pH 3,0 – 40 mM $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$, 60 mM HCl;
- pH 3,5 – 47 mM $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$, 53 mM HCl;
- pH 4,0 – 56 mM $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$, 44 mM HCl;
- pH 4,5 – 80 mM $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$, 28 mM HCl;
- pH 5,0 – 0,63 mM Na_2HPO_4 , 65 mM KH_2PO_4 ;
- pH 5,5 – 2,6 mM Na_2HPO_4 , 63 mM KH_2PO_4 ;
- pH 6,0 – 7 mM Na_2HPO_4 , 60 mM KH_2PO_4 ;
- pH 6,5 – 20 mM Na_2HPO_4 , 45 mM KH_2PO_4 ;
- pH 7,0 – 40 mM Na_2HPO_4 , 25 mM KH_2PO_4 ;
- pH 7,5 – 56 mM Na_2HPO_4 , 9,8 mM KH_2PO_4 ;
- pH 8,0 – 28 mM $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$, 44 mM HCl;
- pH 8,5 – 31 mM $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$, 38 mM HCl;

pH 9,0 – 43 мМ Na₂B₄O₇, 14 мМ HCl;

pH 9,5 – 39,5 мМ Na₂B₄O₇, 21 мМ NaOH.

В отдельные кюветы для спектрофлуориметрии добавляли по 1 мл из указанных растворов буферного ряда, после чего вносили аликвоту очищенного препарата биосенсора в окисленном или восстановленном состоянии. Пробы инкубировали в течение нескольких минут, после чего регистрировали спектры флуоресценции.

2.1.6. Определение чувствительности биосенсора

Аликвоту очищенного белкового препарата биосенсора (40-500 нМ) добавляли в кювету с 1 мл PBS или 100 мМ натрий фосфатного буфера (pH 7,4), после чего регистрировали спектры возбуждения флуоресценции с помощью спектрофлуориметра Varian Cary Eclipse. Далее к этой же пробе добавляли целевой аналит с увеличением концентрации, начиная с минимальной, которая вызывает изменения в спектре. В результате строили график зависимости сигнала биосенсора от концентрации аналита и описывали начальные линейные участки кривых в модели линейной регрессии.

Grx1-roCherry демонстрирует высокую чувствительность к GSSG. Чтобы определить возможность биосенсора взаимодействовать с восстановленной формой GSH, мы готовили пробу, содержащую в PBS 1 мМ GSH, 2 мМ NADPH и 0,5-1,5 U/мл глутатион редуктазы из пекарских дрожжей (Sigma). Такой состав пробы подразумевает восстановление следовых количеств GSSG, которые всегда присутствуют даже в коммерческих реагентах. К указанному составу добавляли окисленный Grx1-roCherry до конечной концентрации 40 нМ и инкубировали в течение 40 мин при комнатной температуре. На всех этапах регистрировали спектры возбуждения флуоресценции.

2.1.7. Определение селективности биосенсора

Аликвоту очищенного препарата белка Grx1-roCherry (конечная концентрация 40 нМ) добавляли к 1 мл PBS (pH 7,4). Аликвоту препарата Нурократес (2 мкМ) добавляли к 1 мл 100 мМ натрий-фосфатного буфера (pH 7,4). Регистрировали спектр возбуждения или эмиссии флуоресценции проб. Далее в пробу тестируемого биосенсора по отдельности добавляли различные биологически значимые окислители для определения их влияния на спектральные характеристики биосенсора. Спектры флуоресценции регистрировали сразу после добавок и в течение последующих нескольких минут, если наблюдали изменения сигнала до его стабилизации. В качестве контроля к пробе с биосенсором также добавляли аликвоты буфера без окислителей в тех же объемах, что и в опытных образцах. Сигнал

биосенсоров тестировали по отношению к $O_2^{\cdot-}$, H_2O_2 , GSH, GSSG, $\cdot NO$, $ONOO^-$, NaOCl, NaOBr, HOscN, N-хлоротаурину, Na_2S , активным электрофилам (глиоксаль, метилглиоксаль, формальдегид).

Для генерации $O_2^{\cdot-}$ в пробу с биосенсором добавляли 50 мкМ ксантина (Sigma) и 0,25 U/мл ксантин оксидазы (Sigma). Проба с системой ксантин/ксантин оксидаза содержала 0,1 мкМ каталазы для предотвращения образования H_2O_2 . Генерацию $O_2^{\cdot-}$ в системе оценивали по изменению спектра поглощения цитохрома *c*, анализируя на спектрофотометре Varian Cary 5000 Spectrophotometer. Генерацию $\cdot NO$ в пробе обеспечивали добавлением 100 мкМ донора MAHMA NONOate (Sigma). N-хлоротаурин готовили в соответствии с протоколом, представленном в патенте DE4041703A1 (<https://patents.google.com/patent/DE4041703A1/en>). NaOBr готовили в соответствии с описанным протоколом [703], HOscN – по представленному протоколу [704] с использованием лактопероксидазы (Sigma). Раствор пероксинитрита натрия (NaONOO) получали, руководствуясь представленным протоколом [705]. Тестирование биосенсора с NaONOO и NaOBr проводили в 100 мМ натрий-фосфатном буфере с pH 7,4, чтобы избежать возможного образования OCl^- в системе.

2.1.8. Используемые в работе вирусы

В работе использовали аденоассоциированные вирусы (AAV) серотипов 9 и PHP.S для доставки гена нужного биосенсора в ткани крыс или заражения первичной клеточной культуры. Вирусные частицы были преимущественно получены в Институте биоорганической химии ИБХ РАН, вирусные частицы AAV9-hSyn1-SypHer3s(мито) и AAV9-hSyn1-SoNar были получены в Charité–Universitätsmedizin (Берлин, Германия).

Для нейрон-специфичной экспрессии гена использовали конструкции с промотором hSyn1 (human synapsin 1 promoter) [706], последовательность которого интегрировали в AAV9-вектор (Stratagene) по сайтам рестрикции MluI и EcoRI (Thermo Fisher) в множественном сайте клонирования. В эту же область вектора был интегрирован ген выбранного биосенсора по сайтам EcoRI и HindIII (Thermo Fisher). Биосенсор HyPer7 локализовали в матрикс митохондрий, для этого к последовательности биосенсора была добавлена сигнальная последовательность MTS2 (duplicated mitochondrial targeting sequence) [707]. Используемые вирусы:

AAV9-hSyn1-HyPer7-мито (титр $1,4 \times 10^{13}$ вирусных геномов/мл);

AAV9-hSyn1-HyPer7 (титр $4,7 \times 10^{12}$ вирусных геномов/мл);

AAV9-hSyn1-SypHer3s-мито (титр $6,91 \times 10^{12}$ вирусных геномов/мл);

AAV9-hSyn1-SypHer3s (титр $1,81 \times 10^{13}$ вирусных геномов/мл);

AAV9-hSyn1-SoNar (титр $2,1 \times 10^{11}$ вирусных геномов/мл).

Для локализации биосенсора в астроцитах использовали укороченную версию GFAP промотора (680, gfaABC1D) [708].

Используемый вирус:

AAV9-GFAP-HyPer7-мито (титр $2,7 \times 10^{13}$ вирусных геномов/мл)

Для кардио-специфичной экспрессии использовали конструкции с промотором cTNT (cardiac troponin T promoter) [709], последовательность которого интегрировали в AAV-вектор (Stratagene) по сайтам рестрикции MluI и EcoRI (Thermo Fisher) в множественном сайте клонирования. Ген выбранного биосенсора локализовали по сайтам EcoRI и HindIII (Thermo Fisher). Для локализации HyPer7 в матриксе митохондрий также использовали сигнальную последовательность MTS2 [707]. Используемые вирусы:

AAV9-cTnT-SypHer3s (титр $4,8 \times 10^{12}$ вирусных геномов/мл);

AAV-PHP.S-cTnT-HyPer7-мито (титр $8,1 \times 10^{12}$ вирусных геномов/мл).

2.1.9. Используемые в работе клеточные культуры эукариот

2.1.9.1. HeLa Kyoto (EMBL), HEK293 (ATCC)

Клетки указанных линий культивировали в среде RPMI1640 (PanEko) или DMEM (PanEko), содержащей 10% эмбриональной бычьей сыворотки FBS (Biosera), 2 mM L-глутамин (PanEko), 50 Ед/мл пенициллина (PanEko), 50 мкг/мл стрептомицина (PanEko) в инкубаторе при 37 °С в атмосфере с 5% CO₂. Для микроскопии клетки сажали на 35 мм чашки со стеклянным дном FluoroDishes (World Precision Instruments или SPL Lifesciences) или μ -слайды (Ibidi). На следующие сутки проводили трансфекцию клеток плазмидой с геном нужного биосенсора с использованием агента FuGeneHD (Promega), следуя рекомендациям производителя.

2.1.9.2. Смешанная нейрональная культура, выделенная из мозга мышинных эмбрионов

Все работы с животными проведены в соответствии с протоколами, одобренными и утвержденными этической комиссией ИБХ РАН. Эмбрионов мышей C57Bl/6 на стадии E17 экстрагировали и анестезировали холодным HBSS с низким содержанием Mg²⁺ и Ca²⁺. Извлекали мозг и освобождали от мозговых оболочек. Ткань кортикальных слоев или гиппокампов собирали и помещали в охлажденный на льду HBSS, после чего переносили в 0,05% раствор трипсина/ЭДТА (ПанЭко) на 15 мин при 37 °С. Ткани как минимум трижды

промывали теплой средой Neurobasal (Gibco), содержащей 2% B27 (Gibco), 2 mM GlutaMax (Gibco), 1% пенициллин/стрептомицин (Gibco) и 10 % FBS (Gibco). Ткань разделяли осторожным суспендированием, получали примерно 1,5 млн клеток на 1 мл среды. Полученную суспензию клеток по 100 мкл высевали на 35 мм чашки для микроскопии FluoroDishes (World Precision Instruments), предварительно покрытые поли-D-лизином 0,1 мг/мл (Invitrogen). Через 1 ч в чашки добавляли 2 мл указанной нейробазальной среды, затем каждые 3 дня 1/3 среды в чашках заменяли на свежую. Через 5 суток клетки трансфецировали агентом Lipofectamine LTX (Invitrogen), следуя рекомендациям производителя. Клетки также выделяли из гиппокампов. Для этого выделенные гиппокампы промывали раствором HBSS/HEPES, после чего инкубировали в 0,25% растворе трипсина с добавлением ДНК-азы (Thermo Scientific) при 37 °C в течение 15 мин. Клетки, выделенные из гиппокампов, культивировали в среде MEM (Sigma), содержащую 5% FBS (BioloT), 2% B27 (Gibco), 1% GlutaMax (Gibco), 1% пенициллин/стрептомицин (Gibco), 0,6% D-глюкозы на чашках для микроскопии FluoroDishes (World Precision Instruments), покрытых поли-D-лизином 0,1 мг/мл (Invitrogen). Все клетки культивировали в стандартных условиях при 37 °C и 5% CO₂.

2.1.9.3. Культура неонатальных кардиомиоцитов крысы

Неонатальные кардиомиоциты крыс линии SHR получали из сердец животных одного помета. Выделенные сердца помещали в холодный PBS (pH 7,4). Изолировали желудочки от предсердий и кровеносных сосудов, а также удаляли эпикард. Ткань желудочков измельчали и суспендировали в растворе, содержащем смесь ферментов (Neonatal Heart Dissociation Kit, mouse and rat, Miltenyi Biotec) с последующей инкубацией в течение 15 мин при 37 °C. Процесс ресуспендирования и инкубации в указанном растворе повторяли трижды. Затем гомогенат ткани переносили в среду DMEM/F12 (BioloT), содержащую 1% пенициллин/стрептомицин (PanEco) и 10% FBS (BioloT), далее суспензию фильтровали через 70 мкм фильтр (SPL Life Sciences). Образец центрифугировали в течение 5 мин при 600 g, после чего клетки ресуспендировали в 1 мл буфера РЕВ (PBS, 10 % БСА, 2 mM ЭДТА). Для избавления суспензии от эритроцитов пробы в течение 1 мин. инкубировали в специальном растворе Red Blood Cell lysis solution (Miltenyi Biotec), после чего вновь центрифугировали в течение 5 мин при 600 g. Далее клетки ресуспендировали в 1 мл DMEM/F12 с добавлением глутамина и подсчитывали количество клеток с помощью камеры Горяева. Далее клетки рассаживали в 35-мм чашки (SPL Life Sciences) в 1 мл DMEM/F12 из расчета 5×10^5 клеток на чашку.

2.1.9.4. Культура зрелых кардиомиоцитов крысы

За десять минут до выделения кардиомиоцитов крысе линии SHR внутрибрюшинно вводили гепарин (1000 ед/кг). Далее животное анестезировали 5% изофлураном, декапитировали и вскрывали грудную клетку, изолировали сердце, которое промывали раствором Кребса-Гензелейта (КНВ) (118 мМ NaCl, 4,8 мМ KCl, 25 мМ HEPES (PanEco), 1,25 мМ MgSO₄, 1,25 мМ K₂HPO₄, 11 мМ D-глюкоза, 5 мМ таурин (Sigma), pH 7,4). К сердцу подводили канюлю и проводили перфузию по Лангендорфу с использованием раствора КНВ, через который пропускали карбоген (95% O₂, 5% CO₂). Через изолированное сердце пропускали 100 мл раствора КНВ для удаления крови, далее перфузировали раствором КНВ с добавлением 1 г/л БСА (PanEco), 0,6 г/л коллагеназы типа II (Worthington Biochemical Corp.), 0,05 г/л протеазы типа XIV (Sigma) и 25 мкМ CaCl₂. Данный раствор рециркулировал через сердце в течение 40–50 мин. Далее сердце переносили в стерильный ламинарный бокс, удаляли предсердия, а желудочки измельчали и ресуспендировали в 5 мл раствора КНВ с добавлением 10 мМ 2,3-бутандиона монооксида. Затем добавляли еще 5 мл раствора КНВ, содержащим 10 мМ 2,3-бутандиона монооксида, 10 г/л БСА и 0,1 мМ CaCl₂, после чего суспензию клеток фильтровали через 100 мкм фильтр (SPL Life Sciences). Клетки центрифугировали в течение 3 мин при 100 g, после чего вновь ресуспендировали в 2 мл КНВ с указанным составом. В течение 5–7 мин клетки оседали в растворе, после чего их вновь промывали в 25 мл КНВ. Далее в раствор постепенно добавляли Ca²⁺, для этого титровали 20 мМ раствором CaCl₂, добавляя по 250 мкл, 375 мкл и 500 мкл с интервалом 3–5 мин. После чего суспензию клеток вновь центрифугировали при 100 g в течение 3 мин. Клетки ресуспендировали в 5 мл среды DMEM с высоким содержанием глюкозы (4,5 г/л), а также 1% пенициллина/стрептомицина (PanEco), 2 мМ глутамина (Gibco) и 10% FBS (BioloT). Клетки культивировали на 35 мм чашках для микроскопии, покрытых ламином (SPL Life Sciences). Через 3 часа с момента высаживания клеток среду заменяли на свежую.

2.1.9.5. Культура человеческих полиморфноядерных лейкоцитов

Полиморфноядерные лейкоциты были выделены из крови здоровых доноров. Все доноры были проинформированы об использовании их крови и подписали документ об информированном согласии. Исследование одобрено этическим комитетом РНИМУ имени Пирогова и проведено в соответствии с Хельсинкской декларацией.

Кровь была собрана в пробирки с антикоагулянтом ЭДТА, после чего проводили разделение с использованием реагента PolymorphprepTM (Alere Technologies AS) в соответствии с рекомендациями производителя. Далее сыворотку и нужную фракцию клеток переносили в отдельные пробирки. В дальнейшем сыворотку использовали для опсонизации клеток *E.coli*. Суспензию клеток в 10 раз разводили в лизис-буфере red blood

cell lysis solution (Miltenyi Biotec) для удаления эритроцитов, инкубируя пробы при комнатной температуре в течение 10 мин. Далее пробу центрифугировали в течение 10 мин при 400 g. Данную процедуру повторяли два раза. Суспензию клеток, избавленную от эритроцитов, промывали раствором PBS, после чего клетки концентрировали центрифугированием в течение 10 мин при 400 g и переводили в среду RPMI-1640 (PanEko) с добавлением 2 mM L-глутамин (PanEko) и 0,5% FBS (Biosera). Количество клеток оценивали с помощью камеры Горяева, добиваясь оптимальной для данной культуры концентрации $1,5 \times 10^6$ клеток/мл.

Для активации лейкоцитов в среду добавляли рекомбинантный человеческий интерферон γ (GibcoTM) в концентрации 1 мкг/мл, с которым клетки инкубировали в течение 90 мин в инкубаторе при нормальных условиях (37 °C, 5% CO₂). Перед экспериментом среду заменяли на RPMI-1640 без интерферона γ .

2.1.10. Используемые в работе животные

2.1.10.1. Рыбы *Danio rerio*

Эксперименты по регистрации динамики H₂O₂ в тканях эмбрионов рыб в условиях гипоксии были выполнены в ИБХ РАН. Протоколы работы с животными одобрены этической комиссией ИБХ РАН (протокол №359). Рыбы содержались в специально оборудованной комнате в проточной аквариумной системе с поддержанием температуры воды 29 °C, автоматической регуляцией светового дня (14 ч день) и регулярной (2 раза в месяц) проверкой качества воды. Взрослых рыб кормили сухим кормом на основе ракообразных или водорослей один раз в день, раз в неделю в рацион добавляли живой корм *Artemia salina*. Мальков содержали в отдельных резервуарах с меньшей интенсивностью потока воды. Рацион в возрасте до 3 месяцев состоял преимущественно из *Artemia salina*. Для получения икры взрослых особей за несколько часов до конца светового дня переносили в специальные резервуары для разведения с перегородками, разделяющими рыб, и сетчатым дном, защищающим оседающую икру от поедания. Оплодотворенную икру немедленно собирали после нереста для последующей инъекции мРНК.

Эксперименты по регистрации динамики редокс-параметров в тканях рыб также проводили на базе лаборатории профессора Sophie Vigiz (Франция). Протоколы работы с животными были одобрены Французским Министерством сельского хозяйства (n°C75-05-12).

2.1.10.2. Мыши C57Bl/6

Животные содержались в виварии ИБХ РАН (<http://www.ibch.ru/structure/development/vivarium>). Манипуляции по получению первичных клеточных культур одобрены этической комиссией ИБХ РАН (протокол №357).

2.1.10.3. Крысы SHR

Животные содержались в вивариях РНИМУ им. Пирогова и ИБХ РАН (<http://www.ibch.ru/structure/development/vivarium>). Манипуляции с животными проводили в операционных комнатах в ИБХ. Протоколы работы с животными одобрены этической комиссией ИБХ РАН (№237 и №354 – протоколы по моделированию ишемического инсульта, №372 – протокол по получению культуры кардиомиоцитов).

2.2. РАЗРАБОТКА КРАСНОЙ ВЕРСИИ РЕДОКС-ЧУВСТВИТЕЛЬНОГО ФЛЮОРЕСЦЕНТНОГО БЕЛКА roRFP

2.2.1. Получение молекулярно-генетических конструкций roRFP

Конструкция Grx1-roCherry представляет собой белки Grx1 и mCherry, связанные друг с другом посредством линкера из 15 аминокислотных остатков (SGTGGNASDGGGSGG), взятого из биосенсора Peredox [636]. Для этого ген Grx1 мы амплифицировали с последовательности в векторе pQE-60 Grx1-roGFP2-His (Addgene #64799) [523]; mCherry – с вектора pcDNAPhoCl-mCherry-myc (Addgene #87692) [710].

Праймеры для последовательности Grx1:

5'-ATCGATGCCACCATGGCTCAAGAGTTTGTGAACTGCAAAA-3'

5'-СТААAGCAGATTGGAGCTCTGCAGACTTCCGGAАCTGGGGGCAACGCCTCTGACGGTGGT-3'

Праймеры для последовательности mCherry:

5'-СААСGCCTCTGACGGTGGTGGTCTGGTGGTGTGAGCAAGGGCGAGGAGGATAА-3'

5'-ТСТАGATТАAGTCTGCAGAGCTССААТСТGCTTTAGC-3'

Полученные ДНК фрагменты далее были слиты в единую последовательность с помощью техники ПЦР «overlap extension». В праймерах была заложена последовательность линкера. Конструкты клонировали в вектор pCS2+ (Xenbase) по сайтам рестрикции ClaI/XbaI. Внесение в последовательность mCherry редокс-активных Cys (мутации Ala150Cys/Lys203Cys), замену Ser151Glu и внесение дополнительного остатка Thr после Cys150 осуществляли с помощью сайт-направленного мутагенеза, для этого использовали следующие праймеры:

5'-GGGCTGGGAGTGCTCCTCCG-3' и 5'-CGGAGGAGCACTCCCAGCCC-3' (для Ala150Cys);

5'-AACGTCAACATCTGCTTGGACATCACCTCC-3' и 5'-GGAGGTGATGTCCAAGCAGATGTTGACGTT-3' (для Lys203Cys);

5'-GGGAGTGCACCTCCTCCGA-3 и 5'-TCGGAGGAGGTGCACTCCC-3' (для инсерции Thr после Cys150);

5'-GGAGTGCACCGAATCCGAGC-3' и 5'-GCTCGGATTCGGTGCCTCC-3' (для Ser151Glu).

Мы также получили версию roCherry без Grx1 с использованием праймеров:

5'-ATCGATGCCACCATGGTGAGCAAGGGCGAGGA-3',

5'-TCTAGATTAAGTCTGCAGAGCTCCAATCTGCTTTAGC-3'

Для экспрессии биосенсоров в бактериях их гены клонировали в вектор pQE30 (Qiagen), содержащий последовательность 6×His tag, по сайтам рестрикции BamHI/HindIII.

По аналогии получали конструкции редокс-биосенсоров на основе белков mKate2 и mRuby2. Поскольку на основе mRuby2 не удалось получить версию биосенсора, а Grx1-roKate в клетках эукариот демонстрирует необратимый ответ, что существенно ограничивает его применение, мы не останавливаемся подробно на этих версиях.

2.2.2. Определение редокс-потенциала флуоресцентных редокс-чувствительных белков

Оценку редокс-потенциала Grx1-roCherry и Grx1-roKate проводили в PBS pH 7,4. В качестве редокс-пары для построения кривой титрования использовали окисленный и восстановленный DTT (DTT_{ox}/DTT_{red}). Концентрация биосенсора в пробе составляла 40 нМ, общая концентрация DTT – 1 мМ. В каждой пробе устанавливали разное соотношение DTT_{ox}/DTT_{red} , биосенсор инкубировали в течение 3 ч при комнатной температуре, после чего регистрировали эмиссию флуоресценции при 610 нм. По установленным значениям сигнала в заданных условиях строили кривую зависимости сигнала от редокс-потенциала буферной системы, значения сигнала биосенсора нормировали на минимальное. Редокс-потенциал буферных растворов определяли по уравнению Нернста:

$E_{DTT} = E^0_{DTT} - ((RT)/(nF)) \times \ln([DTT_{red}]/[DTT_{ox}])$, где E^0_{DTT} равен -0,33 В при pH 7,0 и 30°C; универсальная газовая постоянная $R = 8,314$ Дж/моль×К; T – абсолютная температура в К; постоянная Фарадея $F = 96485$ Кл/моль; n – количество участвующих электронов, в анализируемой реакции $n=2$; $[DTT_{red}]$ и $[DTT_{ox}]$ – молярные концентрации окисленной и восстановленной форм DTT. Влияние pH учитывали по формуле, используемой ранее для roGFP [604]: $E^0_{pH} = E^0 - 60,1 \text{ мВ} \times (pH - 7)$.

2.2.3. Микроскопия Grx1-roCherry в клеточных культурах

Большинство экспериментов по визуализации биохимических процессов с участием биосенсора Grx1-roCherry проводили на микроскопе Leica DMI6000, укомплектованном ртутной лампой 120W HXP (Osram), CCD-камерой Photometrics CoolSNAP HQ, использовали объективы HCX PL Apo CS 40,0×1,25 Oil, HCX PL APO lbd. BL 63×1,4NA Oil. Для регистрации флуоресцентного сигнала использовали наборы фильтров TX2 (Ex. BP560/40; Em. BP645/75) и GFP (Ex. BP470/40; Em. BP542/27). Микроскопию клеток проводили в 35 мм чашках FluoroDishes (World Precision Instruments) в растворе Tyrode (Sigma) с добавлением 20 мМ HEPES (PanEko) и 20 мМ D-глюкозы. Все эксперименты проводили при 37 °C.

При сравнении свойств Grx1-roCherry и Grx1-roGFP2 в одних и тех же клетках использовали μ -слайды (Ibidi) на конфокальном флуоресцентном микроскопе Olympus FV1200. Для Grx-roGFP2 применяли лазеры 405 nm (4%, 730 HV) и 488 nm (1,9%, 630 HV), для Grx1-roCherry – лазер 559 nm (3,9%, 730 HV).

Окисление внутриклеточной среды вызывали добавлением H_2O_2 (в конечных концентрациях 10-300 мкМ).

Диметилфумарат (DMF, Sigma) добавляли к клеткам в конечной концентрации 50 мкМ, после чего инкубировали сутки. DMF растворяется в DMSO, поэтому в контрольных экспериментах к клеткам добавляли те же объемы DMSO без DMF.

В экспериментах с контролируемой продукцией H_2O_2 использовали следующие комбинации конструкций: 1) DAAO-NLS + Grx1-roCherry + мито-Grx1-roGFP2 и 2) мито-DAAO + Grx1-roCherry + мито-Grx1-roGFP2. Эндогенную генерацию H_2O_2 в этих системах запускали добавлением 2 мМ D-норвалина (Sigma). Активность TrxR ингибировали добавлением 2,5 мкМ ауранофина (Enzo) с инкубацией перед экспериментом в течение 14-16 часов. Ауранофин растворяется в LVCJ, поэтому в качестве контроля к клеткам добавляли те же объемы растворителя.

Полученные изображения клеток обрабатывали в программе ImageJ (EMBL), последующий анализ данных проводили с помощью пакета инструментов OriginPro 9.0 (OriginLab).

2.2.4. Проточная цитометрия

Оценивали воздействие дихлорацетата (DCA, Sigma) на редокс-статус клеток HeLa Kyoto. DCA смещает метаболизм клеток с гликолиза на окислительное фосфорилирование. DCA добавляли к клеткам в концентрации 30 мМ с инкубацией в течение 48 ч. Далее к

клеткам добавляли 0,25% раствора Трипсин/ЭДТА (PanEko), приготовленного на растворе Версена (PanEko). После открепления с подложки клетки ресуспензировали и центрифугировали в течение 10 мин при 900 об/мин, после чего переводили в PBS с добавлением 1 % FBS. Флуоресцентные сигналы биосенсоров Grx1-roCherry, SoNar, SupHer-2 регистрировали с помощью проточного цитометра FACS Aria III (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA). Данные экспортировали в формат csv с помощью Cytobank (<https://www.cytobank.org/>), последующую обработку проводили в RStudio.

2.3. РАЗРАБОТКА БИОСЕНСОРА ДЛЯ РЕГИСТРАЦИИ ГИПОГАЛОГЕННЫХ КИСЛОТ

2.3.1. Получение молекулярно-генетических конструкций версий Nurocrates

Для получения ДНК-фрагмента *srYFP* в качестве матрицы использовали плазмиду pQE30-NuPer-2 [560] со следующими парами праймеров:

5'-tctgcaggctacaacagcgacaacgtctatatcatggcc-3' и 5'-accgtgtactccagcttgccccca-3' с линкерами SAG/G

5'-tccgccggctacaacagcgacaacgtctatatcatggcc-3' и 5'-ggtgccgtgtactccagcttgccccca-3' с линкерами SAG/GT

Фрагмент *NemR^{C106}* был амплифицирован с плазмиды pET-21b(+)-*NemR^{C106}* (плазмида предоставлена проф. Ursula Jacob) с использованием пары праймеров:

5'-atatatggatccatgaacaacacacacgaacatgatactgc-3' и 5'-atatataagcttctaaccggcagcgtcgcgaataatgtttttac-3'

Фрагменты, соответствующие N-концевой части химерной конструкции *NemR^{C106}-srYFP* амплифицировали с использованием концевой праймера:

5'-atatatggatccatgaacaacacacacgaacatgatactgc-3' и, в зависимости от позиции интеграции *srYFP* и состава линкера, одного из следующих:

97-98/G 5'-gtgtcgtctgttagcctgcagaaaaactggtcagtggttgctgtaataagcca-3'

98-99/GT 5'-gctgttagcggcgagctaaactggtcagtggttgctgtaataagc-3'

99-100/G 5'-gtgtcgtctgttagcctgcagattggctaaactggtcagtggttgctgtaataag-3'

100-101/GT 5'-gctgttagcggcggaatgttgctaaactggtcagtggttgctg-3'

101-102/G 5'-gtgtcgtctgttagcctgcagatccatgttgctaaactggtcagtggtg-3'

102-103/GT 5'-gctgttagcggcgaggttccatgttgctaaactggtcagtg-3'

103-104/G 5'-gtgtcgtctgttagcctgcagagatggttccatgttgctaaactggtcagtg-3'

104-105/GT 5'-gctgttagcggcggaactgatggttccatgttgctaaactggtt-3'

103-105/G 5'-gtgtcgtctgttagcctgcagagatggttccatgttgctaaactggtcagtg-3'

103-105/GT 5'-gctgttagcggcgagatggttccatgttgctaaactggtcagtg-3'

102-105/G 5'-gtgtcgtctgttagcctgcagaggttccatgttgctaaactggtcagtg-3'

102-105/GT 5'-gctgttagcggcgaggttccatgttgctaaactggtcagtg-3'

Фрагменты, соответствующие С-концевой части химерной конструкции NemR^{C106}-срYFP амплифицировали с использованием концевого праймера:

5'-atatataagcttctaaacggcaggcgtcgcataatgtttttac-3' и, в зависимости от позиции интеграции срYFP и состава линкера, одного из следующих:

97-98/G 5'-ggcacaagctggagtacaacggtagccaacatggaaccatcagtggtg-3'

98-99/GT 5'-acaagctggagtacaacggcaccsaacatggaaccatcagtggtgcct-3'

99-100/G 5'-ggcacaagctggagtacaacggctcatggaaccatcagtggtgcctgac-3'

100-101/GT 5'-acaagctggagtacaacggcaccggaaccatcagtggtgcctgacag-3'

101-102/G 5'-ggcacaagctggagtacaacgggtaccatcagtggtgcctgacagtaaaactc-3'

102-103/GT 5'-acaagctggagtacaacggcaccatcagtggtgcctgacagtaaaactcctc-3'

103-104/G 5'-ggcacaagctggagtacaacggtagtggtgcctgacagtaaaactcctc-3'

104-105/GT 5'-acaagctggagtacaacggcaccggtgcctgacagtaaaactcctgcc-3'

103-105/G 5'-ggcacaagctggagtacaacggtggtgcctgacagtaaaactcctgcc-3'

103-105/GT 5'-acaagctggagtacaacggcaccggtgcctgacagtaaaactcctgcc-3'

102-105/G 5'-ggcacaagctggagtacaacggtggtgcctgacagtaaaactcctgcc-3'

102-105/GT 5'-acaagctggagtacaacggcaccggtgcctgacagtaaaactcctgcc-3'

Для создания контрольной версии HurocratesCS использовали следующие пары праймеров, с помощью которых вносили мутацию Cys355Ser в конструкцию Hurocrates:

5'-atatatggatccatgaacaacacaccgaacatgatactcgc-3' и 5'-tactgtcaggctaccggtgcc-3'

5'-ggcaccggtagcctgacagta-3' и 5'-atatataagcttctaaacggcaggcgtcgcataatgtttttac-3'

Для создания контрольной версии HurocratesKA использовали следующие пары праймеров, с помощью которых вносили мутацию Lys424Ala в конструкцию Hurocrates:

5'-atatatggatccatgaacaacacaccgaacatgatactcgc-3' и 5'-cgcgaaattgcgccctgcag-3'

5'-ctgcaggccgcaatttcgcg-3' и 5'-atatataagcttctaaacggcaggcgtcgcataatgtttttac-3'

Для клонирования Hurocrates в вектор pCS2+ применяли следующую пару праймеров:

5'-atatatcgcgatccaccatgaacaacacaccgaacatgatactcgc-3' и 5'-atatattctagactaacggcaggcgtcgcataatgtttttac-3'

2.3.2. Определение кинетических свойств NemR^{C106} и Hurocrates

Данная серия экспериментов была проведена в лаборатории Joris Messens (Бельгия). Измерение предстационарной кинетики проводили с помощью метода остановленной струи на приборе Applied Photophysics SV20, укомплектованном флуоресцентным детектором. При работе с исходным белком NemR^{C106} регистрировали флуоресценцию Trp, используя фильтр >320 нм, лех 295 нм. При работе с Hurocrates регистрировали флуоресценцию срYFP, используя фильтр >515 нм, лех 485 нм. Предварительно все

образцы восстанавливали добавлением 30 мМ DTT в течение 30 минут при комнатной температуре, после чего белки переводили в 100 мМ натрий фосфатный буфер (pH 7,4) с помощью гель-фильтрации с использованием колонок Hi-Trap® desalting column (GE Healthcare). На этом этапе через растворы пропускали аргон, чтобы не допустить наличия O₂. Далее к пробам Нурocrates (0,5 мкМ) или NemR^{C106} (1 мкМ) добавляли NaOCl, NaOBr или NCT с возрастающей концентрацией, регистрируя соответствующий сигнал. Кривые описывали с помощью двойной экспоненциальной модели, полученные значения k_{fast} использовали для расчета констант скорости второго порядка. Данные анализировали в программе OriginPro 9.0.

2.3.3. Определение пространственной структуры Нурocrates

Работы по определению пространственной структуры Нурocrates проводили в лаборатории Joris Messens (Бельгия).

Кристаллы НурocratesCS получали из раствора с концентрацией 7 мг/мл и температуре 10 °С или 20 °С методом паровой диффузии висячей капли, которая формировалась при смешивании 1 мкл белка и 1 мкл буфера составом 0,1 М Tris (pH 8,0), 0,1 М CaCl₂, 0,1 М MgCl₂, 15% PE15/4. Этот же раствор, но с увеличением PE15/4 до 30% использовали в качестве криопротектора при сборе данных рентгеновской дифракции. Данные получены на установке Proxima 2 в Soleil synchrotron facility (Франция) при 100 К длине волны 0.980113Å с последующей обработкой с помощью программного пакета XDS 0.6.5.5 [711]. Для определения структуры НурocratesCS применяли подход молекулярного замещения (Phenix suite [712,713]), для сравнения сенсорной части НурocratesCS использовали исходный белок NemR из *E.coli* (PDB: 4YZE), для флуоресцентной – сенсор для регистрации Ca²⁺, который также основан на srYFP (PDB: 3O77). Работы по анализу структуры НурocratesCS проводили с помощью программ Coot 0.8.9.2 EL [714] и Phenix.Refine 1.11.1_2575 [715]. Все параметры сведены в **таблицу 4**.

2.3.4. Измерение активности миелопероксидазы с помощью Нурocrates

К очищенному белку Нурocrates в растворе PBS добавляли человеческую миелопероксидазу (0,1 U/мл) и 100 мкМ H₂O₂, далее регистрировали спектр возбуждения флуоресценции (Em. 525 нм) с помощью флуориметра Varian Cary Eclipse. В качестве контрольных экспериментов регистрировали сигнал в пробах, которые содержали только миелопероксидазу или только H₂O₂. Для визуализации временной динамики продукции HOCl в описываемой системе регистрировали ратиометрический сигнал Нурocrates (соотношение интенсивностей эмиссии в области 525 нм, возбуждаемой отдельными

длинами волн 425 нм и 500 нм) с временным интервалом 2,4 секунды также с помощью прибора Varian Cary Eclipse в режиме Cary Eclipse Kinetics 1.1(133). Реакцию запускали добавлением H_2O_2 . В качестве контроля аналогичным образом при тех же условиях измерения проба либо не содержала миелопероксидазу, либо не добавляли H_2O_2 . Данные анализировали в программе OriginPro 9.0 (OriginLab).

Таблица 4. Сводная таблица по сбору дифракционных данных и параметрам структуры для биосенсора HupocratesCS.

Значения в скобках относятся к оболочке с самым высоким разрешением.

HupocratesCS	
Сбор дифракционных данных	
Пространственная группа	C222 ₁
Параметры ячейки	
<i>a, b, c</i> (Å)	90,23; 95,44; 106,25
α, β, γ (°)	90,000; 90,000; 90,000
Область разрешения (Å)	47,72-2,20 (2,27-2,20)*
<i>R</i> _{merge} (%)	8,2 (49,5)
<i>I</i> / σI	15,8 (2,8)
Полнота набора (%)	95,0 (87,9)
Избыточность набора (%)	9,1 (6,2)
Уточнение структуры	
Область разрешения (Å)	47,72-2,20
Количество отражений	22261 (2029)
<i>R</i> _{work} / <i>R</i> _{free}	19,85/27,30
Количество атомов	
Белок	3299
Лиганд	нет
Вода	185
<i>B</i>-факторы	
Белок	42,53
Лиганд	нет
Вода	43,92
Среднеквадратичные значения отклонений	
Длин связей (Å)	0,01
Углов связей (°)	1,01

2.3.5. Микроскопия Нурocrates в клеточных культурах

Флуоресцентную микроскопию клеток HeLa Kyoto с экспрессией гена Нурocrates проводили на следующие сутки после трансфекции на микроскопе Leica DMI 6000, оснащенным ртутной лампой 120W HXP (Osram), CCD-камерой Photometrics CoolSNAP HQ, использовали объектив HCX PL Apo CS 40,0×1,25 Oil. Для регистрации сигнала использовали наборы фильтров CFP (Ex.BP436/20; дихроическое зеркало 455; Em.BP480/40) и GFP (Ex.BP470/40; дихроическое зеркало 500, Em.BP525/50). Микроскопию клеток проводили в 35 мм чашках со стеклянным дном (SPL Lifesciences) в среде PBS при комнатной температуре, которой заменяли основную для культивирования DMEM среду непосредственно перед проведением эксперимента. Выбор PBS обусловлен тем, что NaOCl эффективно реагирует с компонентами органических сред, что затрудняет оценку воздействия окислителя на клетки в добавляемых количествах. 10 мМ стоковый раствор NaOCl (EMPLURA) всегда использовали свежеприготовленный перед экспериментом. Требуемое количество NaOCl разбавляли в 100 мкл PBS и равномерно добавляли в чашку. При расчете учитывали количество клеток. Сигнал Нурocrates рассчитывали, как соотношение интенсивностей флуоресценции, полученной в двух каналах (Ex₅₀₀/Ex₄₂₅). В каждой серии сигнал нормализовали к исходному значению. Обработку изображений и анализ данных проводили с помощью программного обеспечения Fiji 2.0.0-rc-69/1.52p/Java 1.8.0_172 (<https://fiji.sc>) и OriginPro 9.0 (OriginLab).

Для исследования эндогенной продукции гипогалогенных кислот, визуализируемой с помощью биосенсора Нурocrates, использовали полиморфноядерные лейкоциты человека. Данные клетки демонстрируют активность в культуре лишь около 5-6 часов после выделения, поэтому получить такие клетки с экспрессией гена Нурocrates не представлялось возможным. Поэтому мы оценивали динамику гипогалогенного стресса в фагоцитируемых этими клетками бактериях *E.coli* штамма XL1 Blue. Для этого бактериальные клетки по стандартному протоколу трансформировали плазмидами pQe30-Нурocrates и контрольной версией pQe30-НурocratesCS. Флуоресцентные бактериальные клетки подвергали опсонизации, для этого их инкубировали в течение 30 мин при 37 °C и постоянном перемешивании 200 об/мин в человеческой сыворотке крови в соотношении объемов 1:1 в общем объеме 1 мл. Далее клетки 3 раза промывали PBS, центрифугуя в течение 2 мин при 1200 g. Полученную суспензию бактериальных клеток доводили до значения OD₆₀₀ 0,5.

Перед микроскопией культуру полиморфноядерных лейкоцитов переводили с помощью центрифугирования (10 мин, 400 g) в среду RPMI-1640 (PanEko) с добавлением 2

мМ L-глутамин (Sigma-Aldrich), 0,5% FBS (Biosera) и 20 мМ HEPES, среда не содержала феноловый красный и бикарбонат натрия. Полученную суспензию клеток в объеме 800 мкл ($1,8 \times 10^6$ клеток/мл) переносили в 35-мм чашки для микроскопии (SPL Lifesciences). Далее к этим клеткам вносили 75 мкл суспензии бактерий *E.coli* (значение OD₆₀₀ 0,5) с экспрессией гена *Hucocrates* или контрольной версии *HucocratesCS*. Микроскопию проводили на микроскопе ECLIPSE Ti2 (Nikon Instruments Inc.), использовали объектив Plan Apo VC 100X NA 1,40 oil. Сигнал биосенсоров регистрировали в двух каналах с использованием диода 395 нм (100 мс, интенсивность 9%) и диода 470 нм (200 мс, интенсивность 9%), а также использовали режим проходящего света для визуализации фагоцитов. Флуоресцентный сигнал рассчитывали как E_{470}/E_{395} . Значения флуоресцентного сигнала в бактериях нормировали к исходным до фагоцитоза. Обработку изображений и анализ данных проводили в программах Fiji (<https://fiji.sc>) и OriginPro 9.0 (OriginLab).

2.4. МОДЕЛИРОВАНИЕ УСЛОВИЙ ГИПОКСИИ/РЕОКСИГЕНАЦИИ В КУЛЬТУРЕ КЛЕТОК И ТКАНЯХ РЫБ *Danio rerio*

Схема собранной нами установки для моделирования гипоксии/реоксигенации представлена и подробно описана в разделе 3.2.1.1. Чашку со стеклянным дном для микроскопии с исследуемым объектом, культурой клеток или эмбрионами рыб *Danio rerio*, помещали в перфузионную систему. В инкубатор (Miniature Incubator TC-MWP, Bioscience Tools) с объектом подавался раствор из одного из двух сосудов, содержащих нормальную концентрацию O₂ или полностью деоксигенированный. Для получения нужной газовой смеси использовали контроллеры CO₂-O₂-MI, Bioscience Tools и CO₂ controller Tokai Hit. Узлы системы, через которые проходил ток жидкости посредством перистальтических насосов (Longer Precision Pump Co.), были соединены непроницаемыми для O₂ трубками Tygon. Концентрацию O₂ оценивали с помощью мультиканального оксиметра Multi-Channel Oxygen Meter OXY-4 SMA (G3), PreSens Precision Sensing GmbH, соединенного с кислородными сенсорами FTC-PSt3, которые были установлены в основных узлах системы: на входной и выводящей трубках в камере, в сосудах с подаваемыми растворами.

К чашке с исследуемым объектом подводили объектив микроскопа и проводили стандартную флуоресцентную микроскопию в условиях изменений концентрации O₂ в системе. В экспериментах с моделированием условий гипоксии применяли биосенсоры SoNar для регистрации NAD⁺/NADH [641], HuPer7 для регистрации H₂O₂ [562], pH биосенсор SynHer3s [566] – все они основаны на флуоресцентном ядре cpYFP. При работе

с культурой нейронов и эмбрионами рыб *D. rerio* для регистрации флуоресцентного сигнала биосенсоров использовали микроскоп Nikon Eclipse Ti2. Для возбуждения и регистрации флуоресценции указанных биосенсоров использовали источник LED-DA/FI/TR/Cy5-B с системой фильтров DAPI/FITC/TRICTC/Cy5-Full Multiband Quad, Ex. 352–404 нм, Ex. 461–488 нм, Em. 500–530 нм. Использовали объективы 20X (S PLAN FL LWD 20x/0,70) и 40X (Plan Apo λ 40x/0,95 ∞ /0,11–0,23, WD 0,25–0,17 мм). При работе с культурой кардиомиоцитов использовали микроскоп Olympus Fluoview FV3000, регистрацию сигнала HyPer7 и SypHer3s проводили с помощью источника LED и набора фильтров DAPI/FITC/Cy3/Cy5 Quad, Ex. 370–420 нм, Ex. 447–503 нм, Em. 495–527 нм. Использовали объектив Olympus UPLFLN 20 X.

2.4.1. Особенности работы с гиппокампальной нейрональной культурой, полученной из эмбрионов мыши, в модели гипоксии

Смешанную нейрональную культуру клеток, полученную из эмбрионов мыши, заражали частицами аденоассоциированного вируса серотип 9 (AAV9), содержащих ген нужного биосенсора SoNar [641], HyPer7 [562], SypHer3s [566] при показателе MOI (multiplicity of infection) 10 000 вирусных геномов на клетку. Вектора содержали конститутивный нейрон-специфичный гибридный промотор, состоящий из энхансера CMV и промотора человеческого синапсина 1 (hSyn1) [706]. Перед экспериментом ростовую среду клеткам заменяли на раствор, содержащий 120 мМ NaCl, 5 мМ KCl, 2 мМ CaCl₂, 1 мМ MgCl₂, 25 мМ NaHCO₃, 5,5 мМ HEPES, 10 мМ D-глюкозы, pH 7,4 без сыворотки, после инкубации клеток при 37 °C в течение 20 мин клетки помещали в камеру установки для моделирования гипоксии. Для моделирования условий гипергликемии в клеточной среде изменяли концентрацию D-глюкозы (5 мМ, 30 мМ, 60 мМ). В экспериментах по моделированию гипергликемии деоксигенированная среда не содержала D-глюкозу.

Для оценки выживаемости клетки окрашивали красителями: йодидом пропидия (Sigma), проникающим только через поврежденные мембраны, и Hoechst 33342 (Thermo Fisher Scientific), следуя протоколам производителей. Для окрашивания в среду добавляли йодид пропидия (50 мкг/мл) и Hoechst 33342 (5 мкг/мл), после чего инкубировали в течение 5 мин при комнатной температуре. Затем клетки отмывали той же средой и визуализировали сигнал красителей с помощью микроскопа Olympus Fluoview FV3000. Процент окрашенных клеток рассчитывали с помощью программы Fiji (<https://fiji.sc>).

2.4.2. Особенности работы с культурой кардиомиоцитов, полученной из эмбрионов или взрослых крыс, в модели гипоксии

Культуру неонатальных или зрелых кардиомиоцитов, полученных из крыс линии SHR, заражали вирусными частицами AAV серотипа 9 и PHP.S с генами нужного биосенсора HyPer7 [562] или SynHer3s [566] при показателе MOI (multiplicity of infection) 10 000 вирусных геномов на клетку. Вирусные вектора содержали конститутивный кардио-специфичный гибридный промотор, состоящий из энхансера CMV и промотора сердечного тропонина T (cTnT). За час до микроскопии клеткам заменяли ростовую среду на раствор Тироде (118 мМ NaCl, 4,7 мМ KCl, 2,2 мМ NaH₂PO₄, 1,2 мМ MgCl₂, 1,2 мМ CaCl₂, 25 мМ NaHCO₃, 5 мМ глюкозы, pH 7,4). Кардиомиоцитам моделировали условия гипоксии и глюкозной депривации. Для этого в перфузионную камеру с клетками подавали деоксигенированный раствор Тироде без добавления глюкозы.

2.4.3. Рамановская микроспектрометрия для определения редокс-статуса митохондрий зрелых и неонатальных кардиомиоцитов

Эксперименты с использованием Рамановской спектроскопии были выполнены в лаборатории Браже Надежды Александровны (МГУ им. Ломоносова, ИБХ РАН). Рамановские спектры для культивируемых кардиомиоцитов получали с помощью конфокального Рамановского микроспектрометра InVia Qontor (Renishaw) при длине волны возбуждения лазера 532 нм. За 30 мин до эксперимента клеточную среду заменяли на раствор Тироде. Для работы с образцами, в частности, поиска клеток, фокусировки возбуждающего света использовали микроскоп Leica FSM с объективом 63× NA 0,9 (Leica), микроскоп был соединен в Рамановским микроспектрометром. Мощность лазера составляла менее 0,5 мВт для области регистрации диаметром 400 нм. Спектры комбинационного рассеяния света записывали с центральной части кардиомиоцитов, время накопления сигнала 60 с. Сравнивали клетки в условиях насыщения O₂ и аноксии. В первом случае в чашку с клетками подавали раствор, через который непрерывно пропускали O₂. Для создания условий гипоксии подавали деоксигенированный раствор с добавлением 1 мг/мл дитионит натрия (Sigma) – эффективного восстановителя, который взаимодействует с различными молекулами, в том числе компонентами электрон-транспортных цепей, восстанавливая их.

Полученные спектры комбинационного рассеяния были проанализированы командой исследователей под руководством Браже Н.А. с помощью программного обеспечения Pyraman <https://github.com/abrazhe/pyraman>. Интенсивность рассеяния в

клетках и тканях в 100–1000 раз выше для восстановленных цитрохромов по сравнению с окисленными. Поэтому в спектрах наблюдаются только восстановленные цитохромы. Для расчетов использовали следующие соотношения интенсивностей пиков: соотношения I_{750}/I_{1450} и I_{1126}/I_{1450} для оценки относительного количества восстановленных цитохромов *c*-типа и *b*-типа при нормализации на количество липидов; I_{570}/I_{750} для оценки вероятности образования скрученной (ruffled) конформации гема восстановленного цитохрома *c*.

2.4.4. Особенности работы с эмбрионами рыб *Danio rerio* в модели гипоксии

В работе использовали 2-дневных личинок рыб *Danio rerio*, экспрессирующих ген биосенсора HyPer7 [562] или SypHer3s [566] в тканях повсеместно. Для временной экспрессии биосенсора применяли подход инъекции мРНК в оплодотворенные икринки на стадии зиготы. Соответствующую мРНК синтезировали *in vitro* с помощью набора mMessage mMachine SP6 transcription kit (Invitrogen) в соответствии с рекомендациями производителя. Раствор мРНК в воде инъекцировали с помощью инъектора Eppendorf FemtoJet 4i injector и капилляра из боросиликатного стекла в желточный мешок в объеме, который не превышал 10% желтка, концентрация материала 100 нг/мл. Через 24 часа отбирали особей, демонстрирующих флуоресцентный сигнал.

На 2-е сутки после оплодотворения эмбрионы анестезировали 0,016% раствором трикаина (Sigma) pH 7,0 и фиксировали на дне чашки для микроскопии (SPL Lifesciences) в 0,8 % легкоплавкой агарозе (TopVision Agarose, Thermo Scientific). Микроскопию фиксированных в агарозе эмбрионов рыб проводили в привычной аквариумной воде с добавлением анестетика. Деоксигенированную воду получали пропусканием смеси 0,3% CO₂ и 99,7% N₂, концентрацию CO₂ подбирали экспериментально таким образом, чтобы значение pH деоксигенированной воды не отличалось от обычной. В отличие от клеточных культур все эксперименты с *D. rerio* проводили при комнатной температуре.

2.4.5. Определение внутриклеточного pH в тканях рыб *Danio rerio*

Для определения pH в тканях мальков *D. rerio* в условиях гипоксии/реоксигенации строили калибровочную кривую зависимости сигнала SypHer3s от значений pH. Для этого использовали клетки HeLa Kyoto, культивируемые при стандартных условиях (раздел 2.1.9.1.), рассаживали на 35 мм чашки для микроскопии (SPL Lifesciences) и подвергали трансфекции плазмидой с геном биосенсора SypHer3s (pCS2+-SypHer3s) с использованием трансфецирующего агента FuGene HD (Promega Corporation) по протоколу производителя. На следующий день после трансфекции в клетках регистрировали флуоресцентный сигнал

биосенсора на установке по моделированию гипоксии на тех же настройках микроскопа, которые применяли для микроскопии эмбрионов *D. rerio*. Клеткам заменяли среду на буферные растворы с заданным значением pH (от 5,5 до 9,0 с шагом 0,5 единиц), инкубировали в течение 5 мин для установления равновесия между внешним и внутриклеточным pH, после чего получали изображение в двух флуоресцентных каналах (Ex₄₇₀/Em₅₁₀ и Ex₃₉₅/Em₅₁₀). Буферные растворы, добавляемые к клеткам, также содержали ионофоры монензин и нигерицин в концентрациях по 5 мкМ. Состав буферных растворов: 125 мМ KCl (Sigma-Aldrich), 20 мМ NaCl (Sigma-Aldrich), 0,5 мМ MgCl₂ (Sigma-Aldrich), 0,2 мМ эгтазовой кислоты (EGTA, Sigma-Aldrich), 5 мкМ нигерицина (Sigma-Aldrich), 5 мкМ монензина (Sigma-Aldrich). Буферные растворы с pH в диапазоне 5,5 – 6,5 содержали также 20 мМ 2-морфолинэтансульфоновой кислоты (MES, Sigma-Aldrich); буферные растворы с pH 7,0 и 7,5 содержали 20 мМ 4-(2-гидроксиэтил)-1-пиперазинэтансульфоновой кислоты (HEPES, Sigma-Aldrich); буферные растворы с pH в диапазоне 8,0 – 9,0 содержали TRIS (Sigma-Aldrich).

Обработку изображений проводили в программе Fiji (<https://fiji.sc>). Преобразование сигнала SytHer3s из значений сигнала Ex₄₇₀/Ex₃₉₅ в конкретные значения pH проводили в программе OriginPro 8.5 (OriginLab) с использованием полиномиальной аппроксимации калибровочной кривой, полученной на клетках HeLa Kyoto.

2.5. ИССЛЕДОВАНИЕ ДИНАМИКИ БИОХИМИЧЕСКИХ ПАРАМЕТРОВ В КЛЕТКАХ ГОЛОВНОГО МОЗГА КРЫС *IN VIVO* ПРИ ИШЕМИЧЕСКОМ ИНСУЛЬТЕ С ПОМОЩЬЮ БИОСЕНСОРОВ И ОПТОВОЛОКОННОГО ИНТЕРФЕЙСА

Данную серию работ проводили в сотрудничестве с лабораторией Алексея Михайловича Желтикова (МГУ им. Ломоносова).

2.5.1. Инъекция вирусных частиц в ткани мозга крыс и имплантация оптических волокон

Исследования проводили на крысах гипертензивной линии SHR (Charles River), в эксперименте участвовали животные обоих полов весом не более 280 г. Перед началом манипуляций животных анестезировали 2-3% изофлураном с помощью аппарата SomnoSuite для газового наркоза (Kent Scientific). Голову животного при постоянной подаче наркоза через маску фиксировали в стереотаксической установке (Stoelting Co или

RWD). Подкожно в головную часть вводили 0,25% раствор бупивакаина. Далее наносили разрез, обнажая поверхность черепа. В черепе в обоих полушариях с помощью дрели делали два краниальных отверстия диаметром 0,4 мм на расстоянии 0,9 мм сзади от брегмы и на 4 мм от средней линии. В каждое из полученных отверстий поочередно медленно вводили иглу калибра 33 на глубину 5,2 мм от нижней поверхности черепа, попадая в область хвостатого ядра, затем с помощью 5-мл шприца Гамильтон и инъектора (Stoelting Co. Или RWD) в указанную область мозга инъецировали 1 мкл суспензии вирусных частиц AAV. После завершения инъекции вируса в эти же координаты мозга имплантировали оптические волокна. Получение волокон описано в разделе 3.2.1.2., который посвящен разработке оптоволоконной платформы для исследований процессов в мозге *in vivo*. Имплантируемое многомодовое оптоволокно с общим диаметром 125 мкм и диаметром сердцевины 105 мкм (FG105UCA, Thorlabs) одной стороной было приклеено с помощью оптического клея (NOA61, Thorlabs) к керамическому адаптеру, к которому в дальнейшем можно было подключать оптический кабель, ведущий в оптическую установку (см. раздел 3.2.1.2.). Керамический адаптер оставался на поверхности черепа, мы закрепляли его с помощью стоматологического композита, который затвердевал при обработке мягким ультрафиолетом (DentLight-Flow A3, Vladmiva). В задней части черепа делали дополнительное углубление диаметром 1 мм, куда ввинчивали анкерный винт. Затем винт и адаптеры скрепляли акриловым стоматологическим цементом (Stoelting Co) для усиления конструкции. После окончания операции животному вводили подкожно кетопрофен (5 мг/кг) и выводили из наркоза. До следующих манипуляций животные содержались одиночно со свободным доступом к пище и воде.

Протоколы работы с животными одобрены этической комиссией ИБХ РАН (№237 и №354).

2.5.2. Модель ишемического инсульта мозга у крыс путем окклюзии средней мозговой артерии

Через 3-4 недели после проведения инъекции вируса и имплантации в мозг оптических волокон крыс подвергали ишемическому инсульту. Для этого животных вводили в наркоз (2-3% изофлуран, наркозный аппарат SomnoSuite, Kent Scientific). Керамические адаптеры на голове очищали растворами H₂O₂ и изопропанола, далее наносили иммерсионное масло и подключали каждое волокно к оптическому кабелю, ведущему в оптическую установку. Животное располагали на спине на операционном столе, изолируя контакты оптоволоконной непроницаемой черной тканью. С этого момента

начинали запись флуоресцентного сигнала биосенсора в обоих полушариях мозга. Описание установки и ее схему мы намерено поместили в раздел 3.2.1.2., как важнейший результат многолетней междисциплинарной работы нескольких коллективов. Данная установка позволяет регистрировать рациометрический (E_{x490}/E_{x405}) флуоресцентный сигнал одновременно в нескольких координатах мозга.

Левосторонний ишемический инсульт головного мозга у крыс моделировали по стандартной технике окклюзии средней мозговой артерии [716]. Для этого через внутреннюю сонную артерию вводили специальный окклюдер с силиконовым покрытием длиной 0,5 см и диаметром 0,35–0,37 мм (Doccol corporation). После перекрытия средней мозговой артерии животное в течение 60 мин находилось в покое при непрерывной регистрации сигнала, в это время развивалась ишемия тканей мозга в бассейне указанной артерии. Затем окклюдер вынимали и восстанавливали кровоток указанной области, моделируя условия реперфузии ткани. Животных из ложнопериоперированной группы подвергали аналогичным хирургическим манипуляциям, однако окклюдер не доводили до средней мозговой артерии и, таким образом, не вызывали инсульт. Этих животных использовали в качестве контроля, оценивая, как анестезия и проводимые хирургические манипуляции влияют на сигнал биосенсора в тканях мозга.

Для местной анестезии использовали 0,25% раствор бупивакаина. В конце хирургической операции инъецировали кетопрофен (подкожно, 5 мг/кг). На протяжении всей операции осуществляли контроль температуры тела и при необходимости температуру поддерживали. Животных выводили из наркоза и помещали в клетку с одиночным содержанием и свободным доступом к пище и воде. По завершении эксперимента (не менее, чем через 24 часа) животных подвергали эвтаназии (избыток изофлурана, цервикальная дислокация, декапитация), после чего извлекали мозг и получали 2 мм свежие коронарные срезы. Объем ишемического повреждения оценивали после прокраски срезов в 1% растворе 2,3,5-трифенилтетразолия хлористого – красителя, позволяющего оценить дегидрогеназную активность в исследуемом образце (поврежденная область не окрашивается). Объем повреждения измеряли с помощью программного обеспечения ImageJ (EMBL). Для этого на каждом срезе с обеих сторон измеряли площадь неокрашенной поврежденной области, рассчитывали среднее. Далее умножали на толщину среза (2 мм) и суммировали результаты по всем срезам.

Протоколы работы с животными одобрены этической комиссией ИБХ РАН (№237 и №354).

2.5.3. Модель стрептозотоцин-индуцируемого сахарного диабета у крыс

Крыс линии SHR с гипергликемическим статусом получали с помощью инъекции стрептозотоцина. Это вещество используется для моделирования сахарного диабета 1 типа, поскольку вызывает повреждение и гибель β -клеток поджелудочной железы [717]. За 8 часов до инъекции стрептозотоцина животным с экспрессией в тканях мозга гена биосенсора *NyPer7* [562] и с имплантированными волокнами ограничивали доступ к пище, при этом к воде доступ был свободным. Далее животных вводили в наркоз (2-3% изофлуран, наркозный аппарат *SomnoSuite*, Kent Scientific), взвешивали и забирали кровь (~10 мкл) для анализа глюкозы (система *Accu-Chek Active*). Затем инъекцировали стрептозотоцин внутривентриально в дозе 65 мг/кг (раствор стрептозотоцина приготовлен в 50 мМ натрий цитратном буфере, pH 4,5, концентрация 32,5 мг/мл). Контрольной группе животных инъекцировали раствор буфера без стрептозотоцин в том же объеме, исходя из расчета на вес животного индивидуально. Далее животных выводили из наркоза и помещали в условия с доступной пищей и воды, содержащей 10% сахарозы. На следующий день воду заменяли на обычную. На 7-й день после инъекции стрептозотоцина проверяли концентрацию глюкозы в крови. На 8-е сутки животных подвергали ишемическому инсульту. Во время операции, а также при ишемии и последующей реперфузии регистрировали флуоресцентный сигнал. Ишемическое повреждение оценивали на срезах мозга при прокраске 2,3,5-трифенилтетразолием хлористым.

Протоколы работы с животными одобрены этической комиссией ИБХ РАН (№354).

2.5.4. Определение pH в клетках мозга крыс *in vivo*

Биосенсор *SyrHer3s*, ген которого с помощью вирусной системы доставки был направлен в ткани мозга крыс, может быть откалиброван для количественной оценки значений pH в исследуемой системе. Для этого мы получали очищенный белковый препарат *SyrHer3s* (как описано в пункте 2.1.3.). Имплантируемое оптическое волокно, подсоединенное к оптической установке, погружали в кювету с препаратом белка (0,5 мкМ), регистрируя флуоресцентный сигнал при возбуждении 405 нм и 490 нм. Сигнал регистрировали в течение 60 с и усредняли. С использованием стандартного буферного ряда (подробно описано в пункте 2.1.5.) строили калибровочную кривую зависимости сигнала *SyrHer3s* от значения pH. Далее по полученной кривой вычисляли значение pH в тканях *in vivo*.

2.5.5. Проверка функционирования биосенсора HyPer7 в тканях мозга *ex vivo*

Чтобы проверить функционирование биосенсора HyPer7 в клетках мозга крысы, мы проводили тесты *ex vivo* на свежесеченном мозге животного. К срезам мозга, помещенным в физиологический раствор в чашку Петри, подводили оптическое волокно, ведущее в оптическую установку. Использовали те же параметры и настройки, что и при регистрации радиометрического сигнала HyPer7 *in vivo*. Далее в среду вносили H₂O₂ в высокой концентрации (10 мМ и 30 мМ), добиваясь максимальной амплитуды ответа биосенсора. Биосенсор HyPer7 трудно откалибровать по примеру SupHer3s, поскольку H₂O₂ является нестабильным аналитом, быстро реагирующим со многими мишенями. Кроме того, HyPer7 чувствителен к окислению, поэтому получение белкового препарата требует присутствия высоких концентраций восстанавливающих агентов. Поэтому была проведена проверка качественной реакции биосенсора, а не количественная оценка.

2.6. ИССЛЕДОВАНИЕ ДИНАМИКИ РЕДОКС-ПАРАМЕТРОВ В ТКАНЯХ *Danio rerio* *IN VIVO* В УСЛОВИЯХ ВОСПАЛЕНИЯ

Эксперименты по моделированию воспалительных реакций в тканях *Danio rerio* мы проводили в сотрудничестве с лабораторией профессора Sophie Vrız (Франция). Приведенные исследования с животными были одобрены Французским Министерством сельского хозяйства (n°C75-05-12).

мРНК, кодирующие биосенсоры Hypocrates, HypocratesCS и HyPerRed, были синтезированы *in vitro* с помощью набора mMessage mMachine Transcription Kit (Invitrogen) согласно протоколу, прилагаемому производителем.

На одноклеточной стадии эмбрионального развития рыбам *D.rerio* (дикий тип, Tübingen) инъецировали смесь мРНК в комбинациях Hypocrates или HypocratesCS (80 нг/мкл) + HyPerRed (50 нг/мкл). Эмбрионы содержали в воде при 28 °C с добавлением 0,2 мМ N-фенилтиомочевины (Sigma), предотвращающей развитие пигментации у мальков. Все эксперименты проводили через 48 ч с момента оплодотворения. К этому моменту у рыб развивался флуоресцентный сигнал в тканях.

Перед началом микроскопии личинок анестезировали в 0,02% растворе MS-222 трикаина (Sigma), далее помещали в 0,8% легкоплавкую агарозу и под стереомикроскопом ампутировали кончик хвостового плавника. Регистрацию флуоресцентного сигнала осуществляли с помощью микроскопа Zeiss Axio Observer Z1, укомплектованного вращающимся диском CSU-W1 Yokogawa, камерой sCMOS Hamamatsu и масляным объективом Zeiss 0,8 Imm WD: 0,19 мм) с 25x увеличением. Для работы с Hypocrates и

HyocratesCS использовали твердотельные лазеры с диодной накачкой 405 нм (100 мВ) и 491 нм (150 мВт) и полосовой запирающий фильтр 525/50. Для HyPer-Red применяли лазер 561 нм (100 мВ) и полосовой запирающий фильтр 595/50. Флуоресцентный сигнал биосенсора, регистрируемый в тканях *D. rerio* в каждой временной точке, нормализовали к исходному значению сигнала до ампутации. Обработку полученных изображений и анализ данных проводили в программах Fiji (<https://fiji.sc>), Excel 2016 (Microsoft) и OriginPro 9.0 (OriginLab).

2.7. ТЕСТИРОВАНИЕ БИОСЕНСОРОВ В МУЛЬТИФОТОННОМ РЕЖИМЕ ВОЗБУЖДЕНИЯ ФЛУОРЕСЦЕНЦИИ

По стандартному протоколу получали очищенные белковые препараты тестируемых биосенсоров (SynHer3s, HyPer7, Hyocrates). Работы по определению мультифотонного спектра белков, а также визуализацию сигнала в биологических объектах проводили на базе лаборатории фотоники и нелинейной спектроскопии физического факультета (ФФ) МГУ в сотрудничестве с к.ф.-м.н. Ланиным Александром Александровичем. Для исследования яркости биосенсоров при двухфотонном возбуждении на различных длинах волн и двухфотонной визуализации динамики сенсоров в живых системах (клеточных культурах, переживающих срезах или анестезированных животных) были реализованы различные оптические схемы в основе которых располагался лазерный сканирующий микроскоп Thorlabs, укомплектованный перестраиваемыми по длине волны фемтосекундными лазерными источниками на кристалле титан-сапфир (**Ti:S на рис. 36**) и параметрическим генератором света (**ОРО на рис. 36**). Флуоресцентный сигнал 500-545 нм, возбуждаемый двумя фотонами накачки на центральных длинах волн, варьируемых от 760 нм до 1050 нм, регистрировали с помощью фотоумножителя H7422PA-40. В пробах белков сигнал регистрировали с чашки Петри с площади 360x360 мкм² на удалении 100 мкм от поверхности. При регистрации радиометрического сигнала с клеток (HeLa Kyoto, нейроны первичной культуры, ткани мозга мыши *ex vivo* или *in vivo*) использовали пару импульсов с фиксированными центральными длинами волн 775 и 1000 нм.

Регистрацию сигнала биосенсора в мультифотонном режиме возбуждения в тканях мозга мышей C57BL/6 возрастом 8-10 недель осуществляли через краниальное окно. Все работы выполнены в соответствии с протоколом, одобренным этической комиссией ИБХ РАН (протокол №360). Животному под анестезией (изофлуран) удаляли часть скальпа и мягкие ткани под ним, обнажая кость черепа. На расстоянии 1,5 мм латерально и 1 мм каудально от точки брегмы в черепе делали круглое отверстие диаметром 3 мм с помощью

моторизованного сверла и стереотаксической установки (Stoelting Co). С помощью стеклянного капилляра в кору головного мозга через полученное отверстие вводили 1 мкл суспензии вирусных частиц AAV9 с конструкцией hSyn1-HyPer7-мито на глубину 1 мм от нижней поверхности черепа, для этого применяли иньектор Drummond Nanoject II (Drummond Scientific Company). Далее отверстие закрывали покровным стеклом диаметром 4 мм (D263 Coverslip/Coverglass, Warner Instruments), приклеивая к черепу цианакрилатным клеем, открытую часть черепа покрывали стоматологическим цементом (50000, Stoelting Co), затем прикрепляли металлический адаптер для последующей фиксации животного под микроскопом. Флуоресцентный сигнал в тканях мозга детектировали уже через 10 дней с момента инъекции вируса, но максимальных значений флуоресцентный сигнал достигал через 18 дней (на примере биосенсора HyPer7).

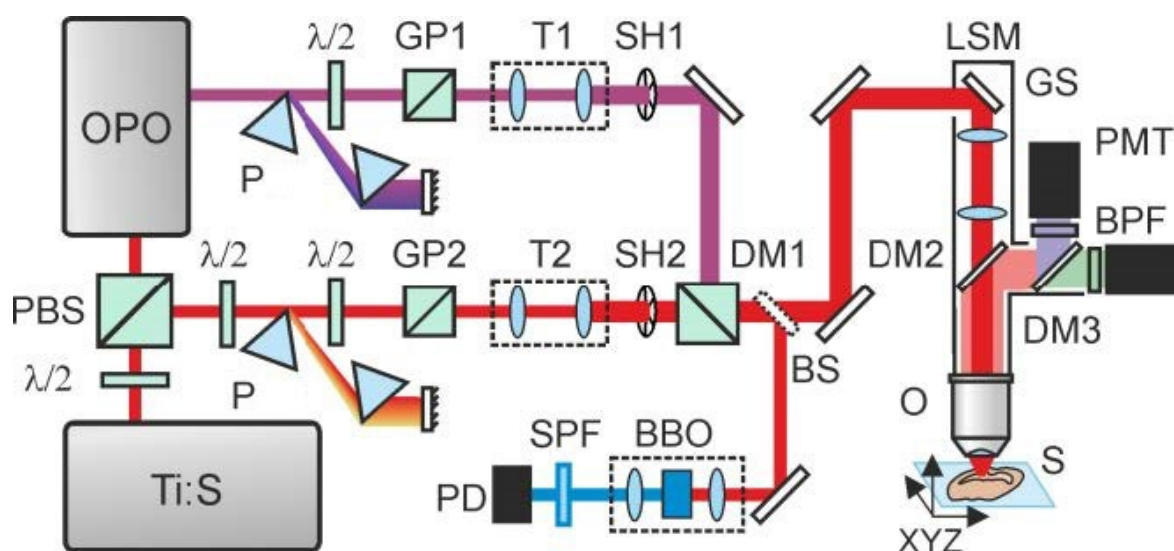


Рисунок 36. Схема для мультифотонного возбуждения флуоресценции биосенсоров на базе ядра $cpYFP$. Обозначения: *Ti:S* – титан-сапфировый лазер; *OPO* – *optical parametric oscillator*, параметрический генератор света; *PBS* – *polarization beam splitter*, поляризацонный светодетель; *GP1* и *GP2* – *Glan prisms*, призмы Глана; *P* – *prisms*, призмы; *T1* и *T2* – *telescopes*, телескопы; *DM1,2,3* – *dichroic mirrors*, дихроичные зеркала; *SH1,2* – *shutters*, шатеры; $\lambda/2$ – *half-wave plates*, полуволновые пластинки; *BBO* – *barium borate crystal*, кристалл BaB_2O_4 для генерации второй гармоники; *SPF* – *shortpass filter*, высокочастотный фильтр; *PD* – *photodiode*, фотодиод; *BS* – *beam splitter*, разделитель луча; *GS* – *galvano scanner*, гальваносканер; *PMT* – *photomultiplier*, фотоумножитель; *BPF* – *bandpass filter*, полосовой фильтр; *O* – *objective*, объектив; *LSM* – *laser scanning microscope*, лазерный сканирующий микроскоп; *S* – *sample*, образец (клетки или ткань).

ГЛАВА 3

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Первая часть 3.1. настоящей диссертации посвящена разработкам новых редокс-биосенсоров на основе флуоресцентных белков, эта часть сфокусирована на идеях дизайна новых молекулярных инструментов, их характеристиках и свойствах, которые мы детально исследовали в системах *in vitro* и клеточных культурах. Вторая часть 3.2. диссертации посвящена описанию подходов применения генетически кодируемых биосенсоров *in vivo* на животных моделях (грызуны, рыбы), которые были нами разработаны для исследования редокс-процессов при некоторых патологических состояниях (ишемия, диабет, воспаление).

3.1. НОВЫЕ РЕДОКС-БИОСЕНСОРЫ

3.1.1. Редокс-чувствительные белки с красной эмиссией флуоресценции

FP, в структуру которых были внесены редокс-активные остатки Cys, исторически можно считать первыми генетически кодируемыми редокс-биосенсорами. В 2001 году был получен rYFP [517], образование S-S связи между остатками Cys, расположенными на соседних β -листах желтого белка, приводят к выраженным спектральным изменениям. Поскольку редокс-активные Cys вовлечены в тиол-дисульфидный обмен клетки, флуоресцентный сигнал rYFP отражает внутриклеточный редокс-статус, который, в свою очередь, определяется редокс-состоянием пула глутатиона – соотношением восстановленной формы глутатиона GSH к окисленной GSSG (2GSH/GSSG). Немного позднее в 2004 году по аналогичному принципу были получены версии roGFP1 и roGFP2 также с зеленой эмиссией флуоресценции, но по сравнению с rYFP они демонстрировали ряд преимуществ, главные из которых радиометрический тип сигнала и его устойчивость к изменениям pH в физиологическом диапазоне [604,605]. Редокс-чувствительные FP, как и другие внутриклеточные участники тиол-дисульфидного обмена, должны быть включены во взаимодействия с глутаредоксин- (Grx) или тиоредоксин (Trx)-зависимыми системами. Связывание Grx с rYFP или roGFP на уровне гена через полипептидный линкер на несколько порядков улучшает кинетические характеристики этих биосенсоров [523,623].

С тех пор коллекция редокс-чувствительных FP стремительно пополнялась, в настоящий момент эти биосенсоры являются одними из самых востребованных и наиболее часто используемых в медико-биологических исследованиях [662]. Однако до недавнего времени все версии биосенсоров из представленного семейства были получены на основе

белков с зеленой эмиссией флуоресценции. Пробы, которые не отличаются спектрально, нельзя применить в режиме мультипараметрической регистрации сигнала, т.е. в комбинации друг с другом или другими редокс-биосенсорами, большинство из которых построены на хромофоре с зеленой эмиссией. Практически сразу после того, как данные биосенсоры себя зарекомендовали, появилась потребность в получении разноцветных версий таких редокс-чувствительных белков. В 2015 году впервые было получено несколько биосенсоров на основе BFP [612]. Безусловно, это является важным достижением и весомым вкладом в развитие коллекции гоFP, однако наличие этих проб лишь отчасти решило поставленную задачу. Кроме того, белки с эмиссией флуоресценции, смещенной в более коротковолновую голубую область, демонстрируют ряд недостатков при работе с живыми объектами. Коротковолновой фиолетовый свет возбуждения хромофоров BFP более токсичен для клеток. К тому же, в этом оптическом окне для биологических объектов наблюдается наиболее высокий уровень автофлуоресценции, что связано со спектральными характеристиками многих молекул клетки. Таким образом, при недостаточной яркости флуоресценции таких биосенсоров и низкой амплитуде ответа бывает крайне сложно отличить целевой сигнал от шума. Особенно эти проблемы выражены при работе *in vivo* в тканях животных, в большинстве случаев регистрация попросту невозможна. Поэтому неоднократно предпринимались попытки создания редокс-чувствительного белка с красной эмиссией флуоресценции. В том же 2015 году был опубликован gxRFP [616], однако по дизайну этот белок отличается от остальных в семействе. Его основу составляет круговой пермутант красного белка mApple (cpmApple), который ранее был использован в биосенсоре R-GECO1 для регистрации Ca^{2+} [567], а позднее в нашей лаборатории для создания красной версии НуPer для регистрации H_2O_2 [563]. В gxRFP пара редокс-активных Cys расположена не на соседних β -листах структуры, как у всех представителей семейства редокс-чувствительных FP, а на N- и C-концах, которые расположены у пермутированных FP вблизи хромофора. Круговые пермутанты FP демонстрируют более гибкую структуру β -бочонка, именно поэтому их используют в биосенсорах, функционирование которых основано на конформационных изменениях взаимодействующих друг с другом сенсорной и флуоресцентной частей. Круговые пермутанты демонстрируют высокую лабильность спектральных характеристик, но, с другой стороны, такая структура белка делает хромофор более доступным для окружающей среды, а потому сигнал может отображать разные воздействия. Особенно это касается одиночных пермутированных белков, N- и C-концы которых не интегрированы в последовательность какого-либо сенсорного модуля. Версия gxRFP по своей сути является

одиноким пермутантом, из-за внесения ключевых Cys на N- и C-концы к нему не был присоединен Grx.

Поэтому мы поставили задачу создать первый редокс-чувствительный красный флуоресцентный белок с канонической для данного семейства биосенсоров структурой.

3.1.1.1. Создание и скрининг версий красных редокс-чувствительных белков

Поскольку неочевидно, какой из белков лучше подходит для основы будущего биосенсора, мы выбрали несколько вариантов среди мономерных красных белков, а именно mCherry [471], mRuby2 [718] и mKate2 [480], демонстрирующих высокую яркость флуоресценции. В структуры этих белков 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. Для улучшения кинетических параметров по аналогии с Grx1-roGFP2 [523] ко всем выбранным красным белкам на уровне гена мы добавили Grx1 человека к N-концу через гибкий полиглициновый линкер составом (Gly-Gly-Ser-Gly-Gly)₆.

Все версии белков Grx1-mCherry, Grx1-mRuby2 и Grx1-mKate2 мы тестировали в бактериальных клетках *E.coli* штамма XL1 Blue. Оказалось, что все полученные конструкции демонстрировали выраженный флуоресцентный сигнал. На следующем этапе скрининга мы проверяли их функциональность. Для этого мы получали суспензию бактериальных клеток и регистрировали спектр возбуждения флуоресценции. К этой же суспензии клеток мы добавляли 5 мМ H₂O₂, после чего повторно регистрировали спектры при тех же настройках. H₂O₂ является сильным окисляющим агентом, который при больших концентрациях смещает редокс-статус внутриклеточного пула глутатиона в сторону окисления. С помощью такого подхода мы отбирали версии, которые демонстрировали наибольшие изменения в спектрах. Среди Grx1-mCherry были отобраны 2 версии с мутациями Ala150Cys/Arg169Cys и Ala150Cys/Lys203Cys, обе демонстрировали увеличение интенсивности флуоресценции на 10-15 % при окислении. Среди версий Grx1-mRuby2 лишь один мутант Glu146Cys/Arg203Cys демонстрировал снижение интенсивности флуоресценции на ~10% при окислении. Схожий результат по амплитуде и по направленности сигнала демонстрировал мутант Grx1-mKate2-Glu141Cys/Arg198Cys.

Данный тип биосенсоров прежде всего представляет интерес для исследований в эукариотических системах. Поэтому уже на этом первичном этапе разработки мы начали проверку полученных конструкций в клетках линии HeLa Kyoto. Все отобранные версии в клетках HeLa Kyoto также демонстрировали выраженный сигнал и равномерное распределение сигнала по клетке для каждой конструкции. Это важно отметить, поскольку нередко новые тестируемые биосенсоры демонстрируют образования агрегатов или оказывают явный токсический эффект. Общий окислительный стресс клеток мы вызывали добавлением H_2O_2 в среду до конечной концентрации 2 мМ, регистрируя с помощью флуоресцентного микроскопа динамику сигнала в реальном времени. Все тестируемые версии в основном демонстрировали те же свойства при окислении, что и в бактериальных клетках. На данном этапе нам было важно оценить, как первичные версии биосенсоров ведут себя в разных клеточных системах (бактерии/эукариоты), поэтому мы не проводили детального анализа. Кроме того, все полученные версии нуждались в оптимизации, поскольку демонстрировали низкую амплитуду ответа. Для дальнейшей работы мы отобрали Grx1-mCherry-Ala150Cys/Lys203Cys, эта версия демонстрировала при окислении быстрое, хотя и незначительное (максимально на 16 %) увеличение интенсивности флуоресценции в клетках HeLa Kyoto. Мы также отобрали Grx1-mKate2-Glu141Cys/Arg198Cys, демонстрирующую, как и в бактериях, снижение интенсивности флуоресценции на 10 %. Другие версии, в том числе на основе mRuby2, в клетках HeLa Kyoto демонстрировали либо гораздо меньшую амплитуду ответа, либо для них была характерна более низкая яркость.

Существуют разные подходы оптимизации свойств белковых биосенсоров. Все они направлены на внесение аминокислотных остатков в определенные позиции структуры, это приводит к изменениям конформационной подвижности, чувствительности к аналиту или селективности, спектральных и кинетических характеристик и многих других параметров. По нашему многолетнему опыту, внесение даже одной аминокислотной замены может приводить к существенным изменениям свойств белковой молекулы. Такой подход может быть рациональным, тогда конкретную замену вносят в определенную позицию в последовательности белка. Но в большинстве случаев сложно предсказать, какую именно мутацию и куда нужно внести для получения белковой конструкции с желаемыми свойствами. Тогда реализуют подходы случайного мутагенеза. В этом случае в улучшаемую версию белка вносят мутации, при этом их количество можно контролировать, но сами мутации и их позиции в выбранном участке гена случайны. В результате получается библиотека мутантов, насчитывающая тысячи версий, на этом этапе задачей исследователя является отобрать вариант с наилучшими свойствами. Случайному

мутагенезу мы подвергли обе конструкции Grx1-mKate2-Glu141Cys/Arg198Cys и Grx1-mCherry-Ala150Cys/Lys203Cys, скрининг проводили в бактериальных клетках, выращиваемых на твердых агар-средах. Мы отбирали клоны с самой яркой флуоресценцией, после чего наращивали с них клеточную биомассу в жидкой среде LB и стандартным образом тестировали изменение спектральных характеристик при окислении, вызванном добавлением в среду 5 мМ H₂O₂ (конечная концентрация). Среди конструкций на основе белка mKate2 мы обнаружили версию, которая демонстрировала снижение сигнала при окислении на ~40%. Анализ результатов секвенирования последовательности ДНК выявил, что данная версия содержит 2 дополнительные мутации Lys12Glu и Asn21Asp. Мы назвали эту версию Grx1-roKate (**рис. 37А**). С помощью подхода случайного мутагенеза нам так и не удалось найти версии с улучшенными свойствами на основе mCherry.

Версию Grx1-mCherry-Ala150Cys/Lys203Cys мы решили подвергнуть направленным модификациям. Прежде всего, мы решили заменить линкерную часть между белками Grx1 и mCherry, поскольку от линкера зависит эффективность взаимодействия этих белков. Мы заменили линкер (GGSGG)₆, свойственный большинству биосенсоров данного типа, на линкер с последовательностью SGTGGNASDGGSGG, который ранее использовали в биосенсоре Peredox для регистрации соотношения NAD⁺/NADH [636]. Амплитуда ответа Grx1-mCherry-Ala150Cys/Lys203Cys с обновленным линкером в ответ на окисление не изменилась, однако новая версия стала значительно ярче по сравнению с исходной. Мы предположили, что незначительное изменение сигнала версии на основе mCherry вероятнее всего связано с невыраженной конформационной подвижностью в окружении хромофора. Для увеличения подвижности структуры mCherry локально вблизи Cys150 мы решили внести дополнительный аминокислотный остаток. Подобный подход применяли для получения редокс-чувствительных BFP [612]. Поскольку сложно предсказать, какой именно остаток следует вносить, мы протестировали все протеиногенные аминокислоты за исключением Cys. Часть полученных версий полностью утратили способность к флуоресценции. Однако мы все же обнаружили версию, которая демонстрировала увеличение сигнала при окислении на 33 %, что в 2 раза лучше по сравнению с исходным вариантом. Ключевую роль в этой оптимизации сыграл остаток Thr, внесенный сразу после Cys150. Следующая идея по оптимизации также основывалась на изменении свойств окружения хромофора mCherry. Мы начали заменять близкорасположенные к хромофору аминокислотные остатки на остатки полярных аминокислот, в результате мы заменили Ser151 поочередно на Thr, Asn, Gln, Asp и Glu, а также Glu153 на Thr, Asn, Gln и Asp. Среди всех проверенных мутаций лишь замена Ser151Glu привела к увеличению динамического

диапазона конструкции до 2 раз при максимальном окислении. Полученную версию Grx1-mCherry-Ala150Cys/Thr(+)/Ser151Glu/Lys203Cys мы назвали Grx1-roCherry (**рис. 37Б**).

Далее для более детального анализа свойств мы получили очищенные белковые препараты Grx1-roKate и Grx1-roCherry из клеток *E.coli* XL1 Blue с помощью методов металл-аффинной хроматографии и гель-фильтрации. Все работы по экстракции и очистке белков проводили в присутствии 5 мМ 2-меркаптоэтанола для предотвращения окисления белков. Очищенный 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. 37В**). Для Grx1-roCherry также характерно по одному пику в спектрах возбуждения и эмиссии флуоресценции с максимумами при 589 нм и 610 нм (**рис. 37Г**). 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 (GR) для устранения из среды следовых количеств GSSG, которые содержит даже коммерческий реактив GSH формы. Окисленное и восстановленное состояние Grx1-roCherry и Grx1-roKate хорошо различимы спектрально (**рис. 37Д,Е**). Мы также убедились, что оба белка не окисляются H₂O₂ напрямую. В бактериальных и эукариотических клетках эффект воздействия H₂O₂ опосредован окислением пула глутатиона. Поэтому, не демонстрируя спектральных изменений при добавлении H₂O₂ напрямую, Grx1-roCherry и Grx1-roKate окисляются в системе *in vitro* в присутствии одновременно H₂O₂ и GSH, что объясняется образованием GSSG. Такие восстановители, как дитиотреитол (DTT) и 2-меркаптоэтанол способны восстанавливать Grx1-roKate и Grx1-roCherry после окисления, что свойственно большинству белков с редокс-активными Cys.

Мы протестировали Grx1-roKate и Grx1-roCherry 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*. Важно, что именно Grx1 и редокс-активные Cys определяют механизм функционирования Grx1-roKate, при их отсутствии в структуре не происходит флуоресцентного ответа в клетках. Однако по не установленной нами причине Grx1-roKate окисляется в эукариотических клетках необратимо (**рис. 38А**). Grx1-roCherry в этих же экспериментах демонстрировал выраженный ответ максимально до 2-х раз, изменение сигнала при этом обратимо. Наличие Grx1 также является необходимым условием для участия белка в редокс-реакциях. Версия roCherry без Grx1 демонстрировала сниженную амплитуду ответа (**рис. 38Б**).

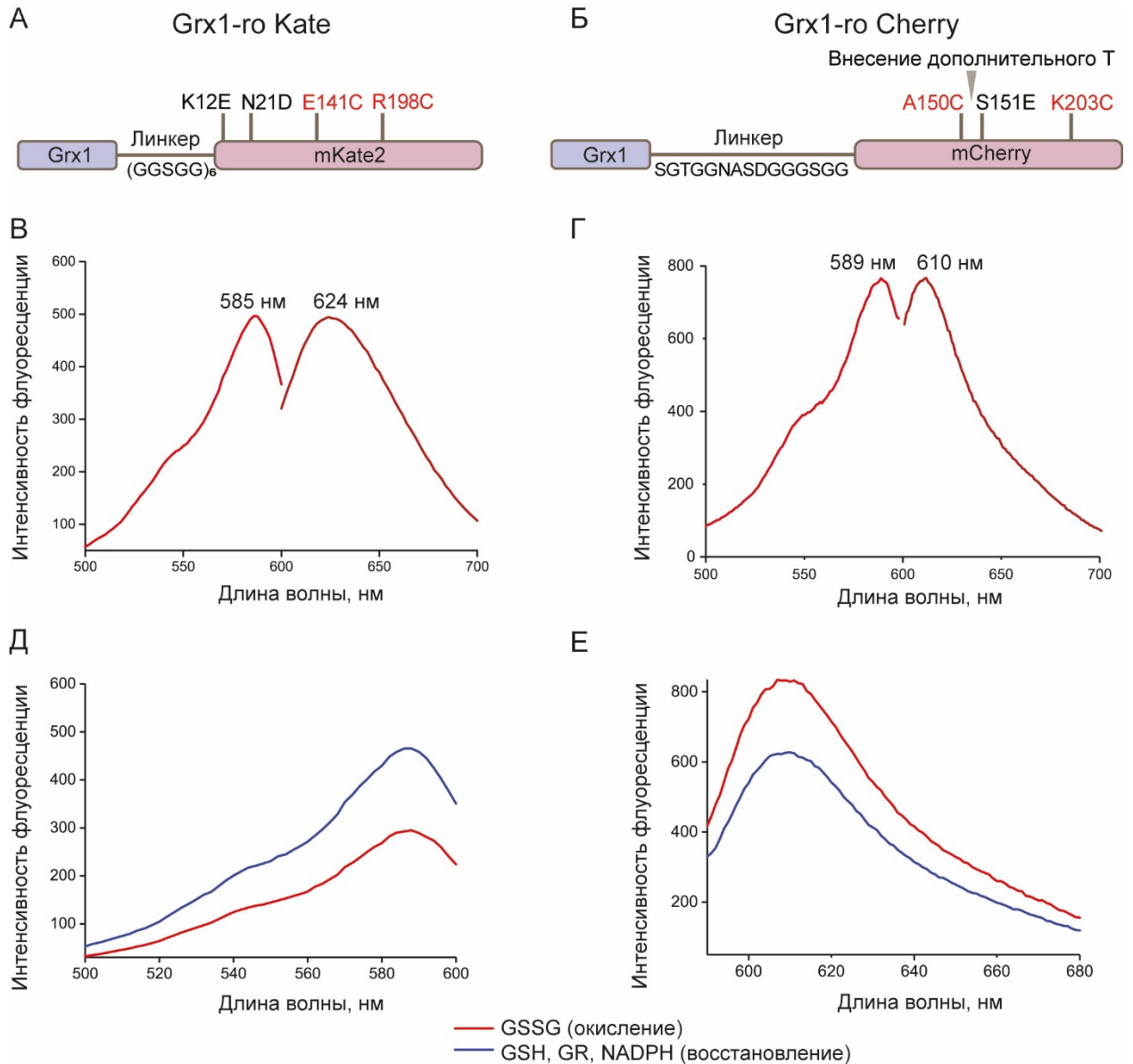


Рисунок 37. Редокс-чувствительные биосенсоры Grx1-roKate и Grx1-roCherry. (А) Схема структуры Grx1-roKate, на которой отмечены составные части биосенсора и внесенные мутации. (Б) Аналогичная схема структуры для Grx1-roCherry. (В и Г) Спектры возбуждения и эмиссии флуоресценции Grx1-roKate (В) и Grx1-roCherry (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.

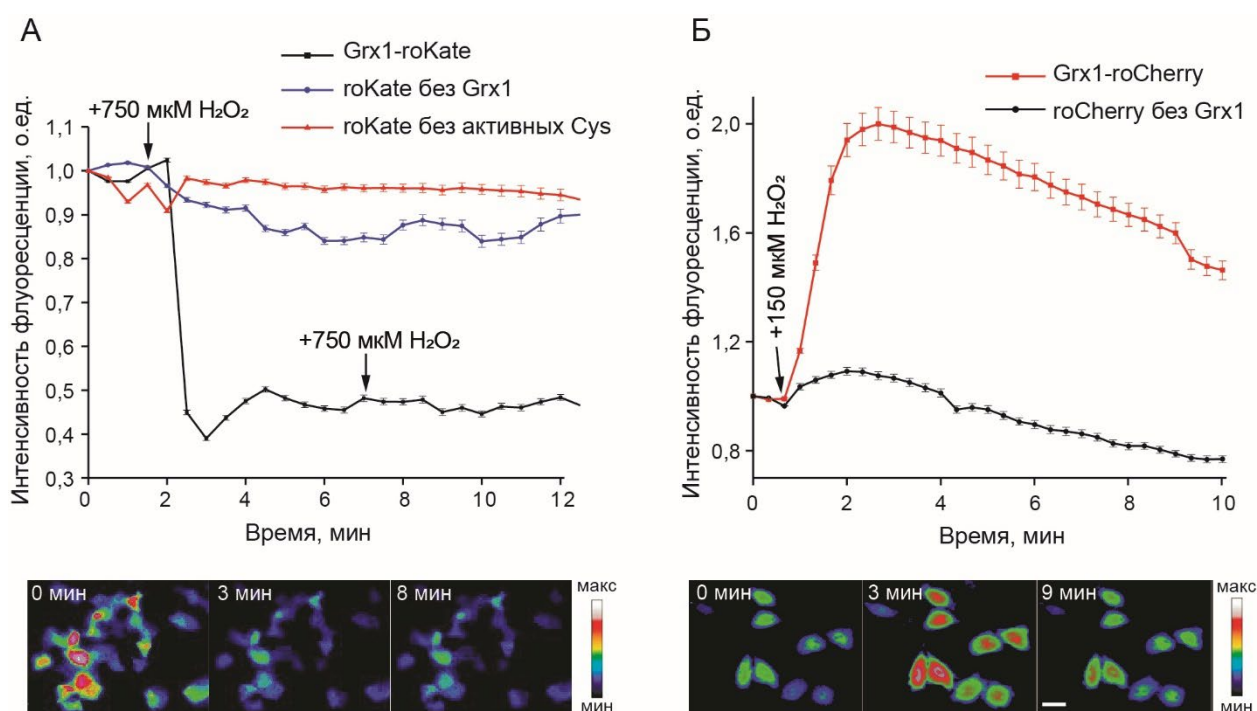


Рисунок 38. Grx1-roKate и Grx1-roCherry в клетках HeLa Kyoto. (А) Динамика изменения флуоресцентного сигнала Grx1-roKate, версии roKate без Grx1 и Grx1-roKate без редокс-активных Cys в цитозоле клеток HeLa Kyoto в условиях окислительного стресса, вызванного H₂O₂. (Б) Динамика изменения флуоресцентного сигнала Grx1-roCherry и версии без Grx1 в цитозоле клеток HeLa Kyoto в условиях окислительного стресса, вызванного H₂O₂.

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

В дальнейшем мы сосредоточились на биосенсоре Grx1-roCherry, который демонстрирует выраженный и при этом обратимый в клетках млекопитающих ответ на редокс-изменения. Grx1-roKate может быть рассмотрен в качестве своего рода «биосенсора редокс-памяти», с помощью которого можно зафиксировать момент окисления в живой системе. Это может быть удобно в моделях, где между биологическим событием и моментом регистрации флуоресцентного сигнала проходит большой промежуток времени, например, при длительных пробоподготовках в ходе получения образцов тканей или клеток. Но все же преимущество генетически кодируемых биосенсоров заключается именно в возможности регистрации динамики исследуемого процесса в режиме реального времени. Для этих целей подходит Grx1-roCherry. Сигнал биосенсора Grx1-roCherry отражает как динамику внутриклеточных окисляющих процессов, так и работу

антиоксидантных систем. Таким образом, Grx1-roCherry представляет собой первый в истории пример редокс-чувствительного RFP с канонической для данного семейства биосенсоров структурой.

3.1.1.2. Свойства Grx1-roCherry

Очищенный белковый препарат Grx1-roCherry демонстрирует быстрый ответ на увеличение концентрации GSSG в пробе (**рис. 39А**). При внедрении нового молекулярного инструмента необходимо установить, вызывает ли окисление биосенсора другие биологически значимые окисляющие агенты. Инкубация белкового препарата с избытком DTT (20 мМ) позволил нам получить биосенсор в максимально восстановленном состоянии. В качестве контроля во всех наших экспериментах мы использовали Grx1-roGFP2 [523]. К препаратам полностью восстановленных Grx1-roCherry и Grx1-roGFP2, содержащимся в 1 мл PBS в концентрации 40 нМ, мы добавляли различные окисляющие агенты, регистрируя спектры возбуждения флуоресценции до и после добавления. Напомним, что для Grx1-roCherry характерен интенсификационный сигнал (F_{589}), для Grx1-roGFP2 – ратиометрический (F_{405}/F_{488}). Ожидаемо наибольшую амплитуду ответа для обоих биосенсоров мы наблюдали при добавлении GSSG в конечных концентрациях 10 мкМ и 1 мМ (**рис. 39Б**). Примечательно, что для Grx1-roCherry 10 мкМ GSSG уже являлась насыщающей концентрацией, вызывающей максимальный ответ. Мы подтвердили, что белок Grx1-roCherry действительно 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, и, хотя концентрация H_2O_2 в системе была значительно выше физиологически возможной, этот эффект нельзя полностью исключать в некоторых системах. 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. В недавних опубликованных работах этот эффект взаимодействия roFP с гипогалогенными кислотами и их производными уже был описан [624,654], поэтому данный эффект также необходимо учитывать при применении подобного рода инструментов в моделях с выраженным гипогалогенным стрессом. Grx1-roCherry не стал исключением в линейке биосенсоров данного семейства. Судя по всему, поверхностные редокс-активные Cys являются легкодоступной мишенью для таких реакционноспособных соединений, как гипогалогенные кислоты. Grx1-roCherry и Grx1-roGFP2 демонстрируют изменение сигнала при избыточных концентрациях в системе с ксантинооксидазой (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 $\cdot NO$, продуцируемого донором МАНМА NONOate в концентрации 100 мкМ в пробе, что также лежит за пределами физиологически возможных концентраций данного редокс-активного соединения (рис. 39Б).

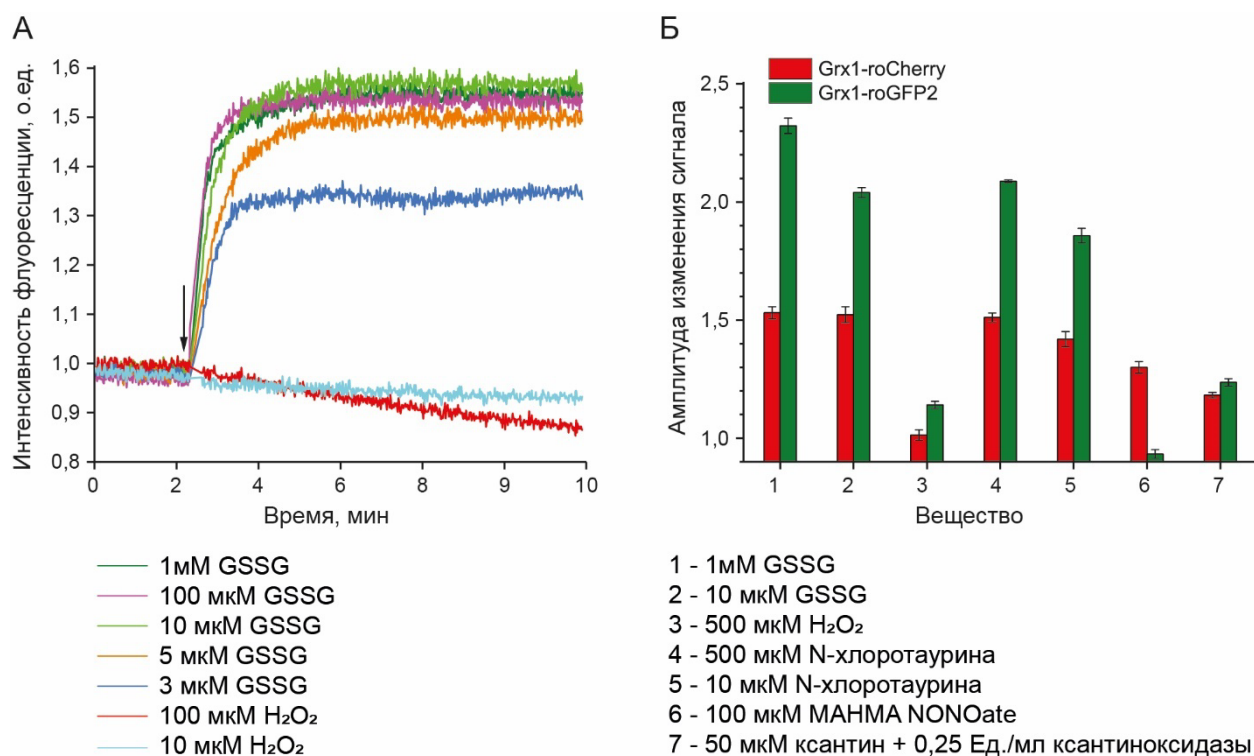


Рисунок 39. Селективность Grx1-roCherry. (А) Динамика изменения интенсивности флуоресценции Grx1-roCherry при добавлении разных концентраций GSSG и H₂O₂ (момент добавок отмечен стрелкой). Измерение сигнала проводилось раз в 1 с. Каждый график нормализован к значению сигнала, полученному для образца Grx1-roCherry, инкубированному в тех же условиях, но в отсутствии окислителей. В каждой пробе объемом 1 мл содержалось 40 нМ белка (PBS, pH 7,4). (Б) Амплитуда ответа полностью восстановленного Grx1-roCherry (F₅₈₉) и Grx1-roGFP2 (F₄₀₅/F₄₈₈) при добавлении указанных редокс-активных соединений или их доноров. В каждой пробе объемом 1 мл содержалось 40 нМ белка (PBS, pH 7,4). Инкубация перед регистрацией сигнала для образцов 1-5 составила 3 мин, для 6 и 7 – 10 мин. Сигнал полностью восстановленного Grx1-roCherry и Grx1-roGFP2 принят за 1. Планки погрешностей соответствуют стандартной ошибке среднего, N=3.

Селективность roFP долгое время была предметом оживленных дискуссий. Изначально этот тип биосенсоров рассматривался исключительно в контексте определения редокс-статуса пула глутатиона, некоторые коллективы до сих пор настаивают на том, что динамика флуоресцентного сигнала roFP отражает динамику соотношения 2GSH/GSSG. В некотором смысле это действительно так, поскольку показатель 2GSH/GSSG зависит от

наличия и времени жизни в рассматриваемой системе различных 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 roFP напрямую, особенно это актуально в системах с высокой продукцией подобных соединений, например, при окислительном стрессе. В наших тестах с некоторыми окислителями, например, H_2O_2 , $\cdot NO$, $O_2^{\cdot -}$, мы использовали заведомо высокие маловероятные в биологических системах концентрации, чтобы установить максимально возможный эффект взаимодействия. При этом АФГ и их производные, в частности, хлорамины, влияют на сигнал roFP в диапазоне концентраций, вполне достижимых в клетках, например, при воспалительных процессах. Наши исследования и целый ряд независимых работ наших коллег свидетельствуют в пользу того, что представителей roFP все же следует рассматривать в качестве биосенсоров на общий редокс-статус клетки, что при этом не отменяет их ценности в качестве инструмента. Некоторые биосенсоры данного семейства, например, Oba-Q [612], FROG/B [618], не были протестированы на селективность к широкой панели биологически значимых окислителей. Поэтому на сегодняшний день трудно заключить, имеются ли все-таки специфичные исключительно к изменению редокс-статуса глутатиона представители данного семейства биосенсоров. Приведенные обсуждения касаются именно острых процессов. Важно понимать, что высокореактивные соединения находятся в клеточной среде относительно недолго, они находят мишени или быстро нейтрализуются антиоксидантными системами, при этом их эффект на редокс-статус клетки может сохраняться гораздо дальше. И в этом случае соотношение 2GSH/GSSG – универсальный показатель редокс-статуса, а roFP идеально подходят в качестве инструментов для его определения.

Все FP чувствительны к изменениям pH, что определяется свойством хромофора. При изменении pH изменяется флуоресцентный сигнал большинства биосенсоров на основе FP, что может привести к неверной интерпретации результатов. Поэтому диапазон pH-чувствительности является еще одной важной характеристикой биосенсора. Мы получили график зависимости интенсивности флуоресценции Grx1-roCherry от значения pH среды (**рис. 40А**). Для этого мы добавляли одинаковые количества очищенного белка Grx1-roCherry в растворы буферного ряда с известным pH, регистрируя сигнал в каждой такой пробе. В диапазоне pH 3,0 – 9,5 сигнал биосенсора изменяется в 87 раз, значение pK_a составляет 6,7. Если рассматривать физиологический диапазон изменений pH (6,0 – 8,0), интенсивность флуоресценции изменяется ~ в 4 раза. Для другого полученного нами белка Grx1-roKate изменение сигнала в том же диапазоне pH составило ~ в 3 раза. Как мы и

предполагали, сигнал красных roFP с канонической структурой оказался гораздо устойчивее к изменениям pH по сравнению с полученным ранее rxRFP на основе пермутанта smApple [616]. По этому параметру Grx1-roCherry превосходит rxFP ~ в 5,5 раз.

Далее мы определили редокс-потенциал для Grx1-roCherry, он составляет -311 мВ при pH 7,0 и -335 мВ при pH 7,4 (рис. 40Б). Для этого белок инкубировали в растворах с разным соотношением редокс-пары DTT_{ред}/DTT_{окс}. В этих же условиях потенциал для Grx1-roGFP2 составил -290 мВ при pH 7,0 и -315 мВ при pH 7,4. Как и в случае Grx1-roGFP2, полученную нами красную версию биосенсора мы не рекомендуем использовать во внутриклеточных компартментах с наиболее окисляющими условиями, в частности, в люмене эндоплазматического ретикулума. Полученные экспериментально значения редокс-потенциала для Grx1-roCherry и Grx1-roGFP2, а также представленная нами диаграмма селективности (рис. 39Б), указывают на то, что биосенсор Grx1-roCherry по сравнению с Grx1-roGFP2 более чувствителен к окислению. Редокс-потенциал полученной нами версии Grx1-roKate, демонстрирующей необратимый сигнал в эукариотической системе, составляет -245 мВ, что сравнимо с -238 мВ roGFP2-iL [609] и -236 мВ roGFP1-iE [608].

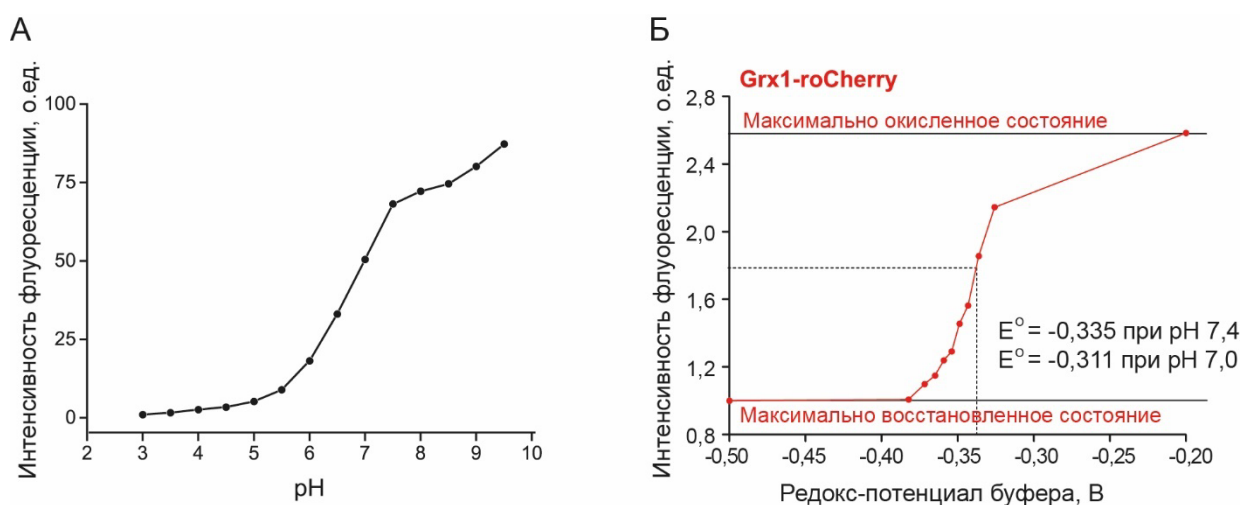


Рисунок 40. Некоторые свойства Grx1-roCherry. (А) Зависимость флуоресцентного сигнала очищенного препарата Grx1-roCherry от значений pH. (Б) Зависимость флуоресцентного сигнала очищенного препарата Grx1-roCherry от редокс-потенциала системы. В качестве редокс-пары использовали DTT_{окисленный} и DTT_{восстановленный} 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.

Мы показали, что спектральные свойства Grx1-roCherry, а именно расположение максимумов в спектрах возбуждения и эмиссии флуоресценции, как и форма спектров, идентичны исходному белку mCherry без мутаций. Далее мы оценили, насколько внесенные

мутации изменили яркость белка. Молярный коэффициент экстинкции (ϵ) для окисленного Grx1-roCherry составил $14\,500\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$, для mCherry значение этого параметра составляет $72\,000\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$. Значения квантового выхода (QY) этих белков схожи и составляют $\sim 0,23$ для Grx1-roCherry и $\sim 0,22$ для mCherry. Таким образом, яркость флуоресценции, которая рассчитывается произведением значений QY и ϵ , для Grx1-roCherry составляет $\sim 3\,335$, что в 4,7 раз уступает по яркости исходному белку mCherry. Оказалось, что по яркости Grx1-roKate \sim в 3 раза превосходит Grx1-roCherry.

Таким образом, свойства полученного нами Grx1-roCherry по большинству параметров сравнимы с популярным биосенсором Grx1-roGFP2. Показатели яркости, pH-чувствительности и редокс-потенциала делают также интересной в качестве инструмента версию Grx1-roKate, но необратимый характер изменения сигнала при окислении в клетках эукариот является единственным, но, к сожалению, существенным недостатком, ограничивающим широкое применение данного биосенсора. Возможно, дальнейшие подходы по оптимизации этого белка путем направленных мутаций позволят найти версию, отвечающую необходимым требованиям.

3.1.1.3. Прямое сравнение Grx1-roCherry и Grx1-roGFP2 в одной системе экспрессии

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. Версии белков не содержали каких-либо сигнальных последовательностей и потому были свободно распределены в цитозоле. 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. Сигнал Grx1-roGFP2, рассчитываемый как F_{405}/F_{488} , изменялся максимально до 6 раз. В этих же клетках Grx1-roCherry демонстрировал изменение интенсиметрического сигнала (F_{589}) не более, чем в 1,8 раз. Биосенсоры показывают схожую чувствительность. На **рисунке 41** представлены графики зависимости сигналов Grx1-roCherry и Grx1-roGFP2 в одних и тех же клетках от концентрации H_2O_2 в среде. 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.

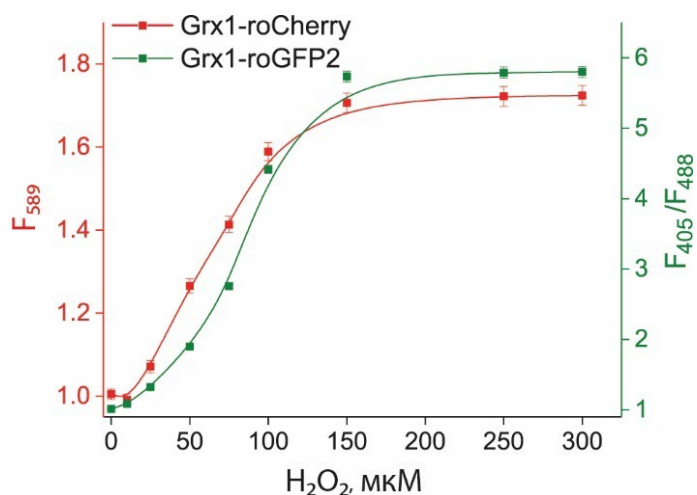


Рисунок 41. Сравнение динамики сигналов Grx1-roCherry (F₅₈₉) и Grx1-roGFP2 (F₄₀₅/F₄₈₈) в клетках HeLa Kyoto при добавке разных концентраций H₂O₂. Гены биосенсоров коэкспрессированы в одних и тех же клетках. Значение сигнала в каждой временной точке нормализовано на исходное значение сигнала для каждого биосенсора. Планки погрешностей соответствуют стандартной ошибке среднего, не менее 100 обработанных клеток для каждой точки, N=3.

В результате нам удалось получить версию редокс-чувствительного RFP с канонической для биосенсоров данного типа структурой. В дальнейшем мы применили мультипараметрический подход регистрации сигнала, комбинируя Grx1-roCherry с разнообразными спектрально различающимися биосенсорами в различных клеточных моделях.

3.1.1.4. Редокс-статус цитозоля и митохондриального матрикса клетки при воздействии диметилфумарата

Диметилфумарат (DMF) применяется в терапии некоторых заболеваний (в основном кожных), а также его по-прежнему активно тестируют по отношению к другим патологиям, с 2018 года внесен в перечень необходимых и важнейших лекарственных препаратов. Протекторный для клеток эффект DMF обусловлен его действием на целый ряд внутриклеточных событий, которые приводят к увеличению GSH, в том числе посредством активации GR [719]. Считается, что DMF делает клетки устойчивее к окислительному стрессу. Мы решили проверить эффект DMF на редокс-статус разных компартментов клетки с помощью биосенсоров Grx1-roCherry и Grx1-roGFP2.

Мы локализовали Grx1-roCherry в цитозоле клеток HeLa Kyoto, в этих же клетках Grx1-roCherry направили в матрикс митохондрий. Для этого на уровне гена к N-концу биосенсора была добавлена сигнальная метка в виде дублированной последовательности короткого пептида MTS (mitochondrial targeting sequence) из субъединицы VIII цитохром *c* оксидазы [707,720]. По данным литературы, DMF вызывает долгосрочные ответы в клетке, поэтому мы регистрировали сигналы биосенсоров после инкубации клеток с 50 мкМ DMF в течение суток. Инкубированные с DMF клетки не проявляли отличий от контрольных клеток по морфологии и обоим

сигналам биосенсоров. Мы решили проверить отличия в динамике редокс-изменений в клетках, вызванных окислительным стрессом при добавлении 150 мкМ H_2O_2 . Действительно, динамика сигнала редокс-биосенсоров в клетках, предварительно обработанных DMF, отличалась от клеток в контроле. Амплитуда ответа Grx1-roCherry в цитозоле клеток, инкубированных с DMF, оказалась значительно ниже по сравнению с контрольными клетками в этих же условиях. Т.е. клетки после инкубации с DMF характеризовались менее подверженной к окислению внутриклеточной средой. Этот эффект мы наблюдали лишь в цитозоле. В матриксе митохондрий, где был локализован Grx1-roGFP2, мы не увидели разницы в динамике сигнала между опытными и контрольными клетками при добавлении H_2O_2 . Из отличий можно лишь отметить, что после добавки в среду H_2O_2 Grx1-roGFP2 в митохондриях клеток с DMF восстанавливался быстрее, чем в контрольных клетках, хотя этот эффект не был выраженным (**рис. 42А**). Разница между редокс-событиями в цитозоле и матриксе могла быть обусловлена отличиями в свойствах Grx1-roCherry и Grx1-roGFP2. Поэтому мы провели аналогичный эксперимент, поменяв местами локализации сенсоров: в этот раз красный биосенсор локализовали в митохондриях, а зеленый в цитозоле. Мы получили аналогичный предыдущему результат (**рис. 42Б**). Важно отметить, что Grx1-roGFP2 в цитозоле продемонстрировал еще более выраженный эффект на DMF. Ранее мы обсудили, что для зеленой версии биосенсора характерно более положительное значение редокс-потенциала по сравнению с Grx1-roCherry и, следовательно, Grx1-roGFP2 менее чувствителен к окислению, что и объясняет наблюдаемые различия в данном эксперименте с DMF. Таким образом, DMF действительно в большей степени оказывает восстанавливающий эффект на редокс-баланс цитозоля клетки, а не на митохондриальный матрикс. Как и в предыдущем эксперименте, динамика сигнала биосенсора в матриксе митохондрий не отличается при окислении, однако в дальнейшем восстановление происходит быстрее также в клетках, обработанных DMF. Настоящий пример наглядно демонстрирует преимущества подхода регистрации редокс-событий одновременно в разных компартментах клетки с использованием спектрально различающихся биосенсоров на один и тот же параметр.

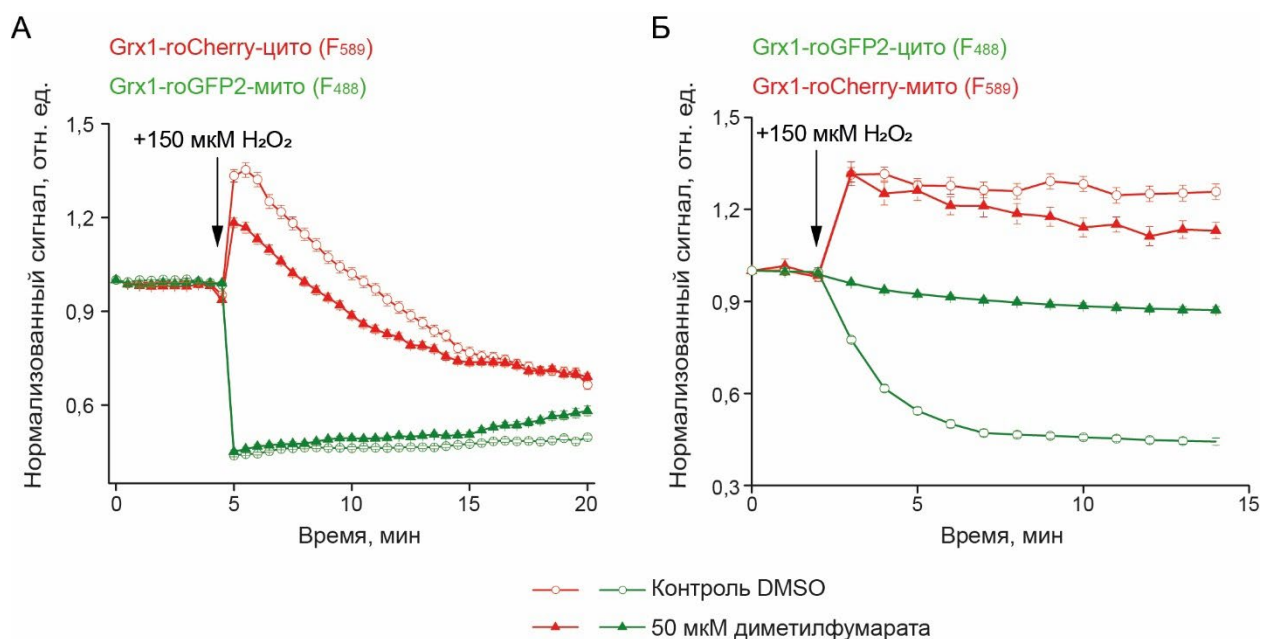


Рисунок 42. Динамика сигналов Grx1-roCherry и Grx1-roGFP2 в цитозоле и матриксе митохондрий клеток HeLa Kyoto в условиях окислительного стресса в присутствии диметилфумарата (DMF). (А) Grx1-roCherry (F₅₈₉) локализован в цитозоле, Grx1-roGFP2 (F₄₈₈) локализован в матриксе митохондрий. Клетки были предварительно проинкубированы в течение суток в среде с содержанием 50 мкМ DMF, растворенном в DMSO. В качестве контроля другие клетки инкубировали при тех же условиях только с растворителем DMSO. Значения сигналов биосенсоров в каждой временной точке нормализовали на исходные значения. Сигнал усреднен по 103 клеткам в 3-х независимых экспериментах с добавкой DMF и по 119 клеткам в 3-х независимых контрольных экспериментах. Планки погрешностей соответствуют стандартной ошибке среднего. (Б) Аналогичный эксперимент, но Grx1-roCherry локализован в митохондриях, Grx1-roGFP2 в цитозоле. Сигнал усреднен по 30 клеткам в 2-х независимых экспериментах с добавкой DMF и по 34 клеткам в 2-х независимых контрольных экспериментах. Планки погрешностей соответствуют стандартной ошибке среднего. При окислении наблюдается увеличение сигнала F₅₈₉ и снижение F₄₈₈.

3.1.1.5. Изменение редокс-статуса разных типов клеток при смещении метаболизма от гликолиза к окислительному фосфорилированию

Метаболизм большинства онкоклеток зависит от гликолиза даже в присутствии O₂. Этот феномен известен как аэробный гликолиз или эффект Варбурга [721]. Подходы, позволяющие смещать метаболизм онкоклеток к окислительному фосфорилированию, в настоящее время рассматривают в качестве перспективных методов лечения онкологических заболеваний. Патогенные клетки чувствительны к окислительному стрессу, поэтому многие из них демонстрируют усиленную антиоксидантную систему защиты. Активное дыхание митохондрий связано с повышенным риском образования АФК, поэтому онкоклетки используют этот тип метаболизма в меньшей степени [722,723]. Дихлорацетат (DCA) представляет пример соединения, которое позволяет переключать метаболизм онкоклеток с гликолиза на окислительное фосфорилирование

[724]. Механизм действия DCA обусловлен активацией пируватдегидрогеназного комплекса посредством ингибирования киназы пируватдегидрогеназы. Однако неизвестно, меняются ли при таком метаболическом переходе редокс-параметры клеток.

Мы проверили, как DCA влияет на важнейшие редокс-параметры клетки – соотношения 2GSH/GSSG и NAD^+/NADH . В клетках HeLa Kyoto мы коэкспрессировали гены биосенсоров красного Grx1-roCherry (для определения 2GSH/GSSG) и зеленого SoNar (для определения NAD^+/NADH) [641]. Клетки инкубировали в среде с 30 мМ DCA в течение 48 часов. В качестве контроля с другими клетками проводили аналогичные манипуляции, но без добавления DCA. Далее с помощью проточной цитометрии анализировали распределение флуоресцентного сигнала в популяциях клеток опытной и контрольной групп. Оказалось, что DCA вызывает в цитозоле HeLa Kyoto окисление пула глутатиона и при этом восстановление пула NAD (**рис. 43А**). Аналогичный эксперимент мы провели на человеческих эмбриональных клетках линии HEK293, метаболизм которых соответствует нормальным клеткам. При тех же условиях эксперимента в цитозоле HEK293 мы не обнаружили каких-либо изменений в сигналах биосенсоров Grx1-roCherry и SoNar после инкубации с DCA, сравнивая со значениями в клетках контрольной группы (**рис. 43Б**). В данных экспериментах мы применяли также биосенсор SypHer2 [565], выяснив, что DCA не влияет на внутриклеточное значение pH клеток.

Судя по всему, воздействие DCA действительно приводит к проокислительному сдвигу в клетках HeLa Kyoto в отличие от HEK293, для которых характерен нормальный метаболизм и, вероятно, поэтому подобные редокс-эффекты для этих клеток не наблюдаются. Чтобы судить о глобальном и универсальном эффекте DCA на редокс-параметры необходимо проведение экспериментов на большем количестве разных типов клеток, отличающихся особенностями метаболизма. В данной серии экспериментов мы продемонстрировали возможность комбинирования Grx1-roCherry не только с биосенсорами данного типа, но и с биосенсорами на другие параметры.

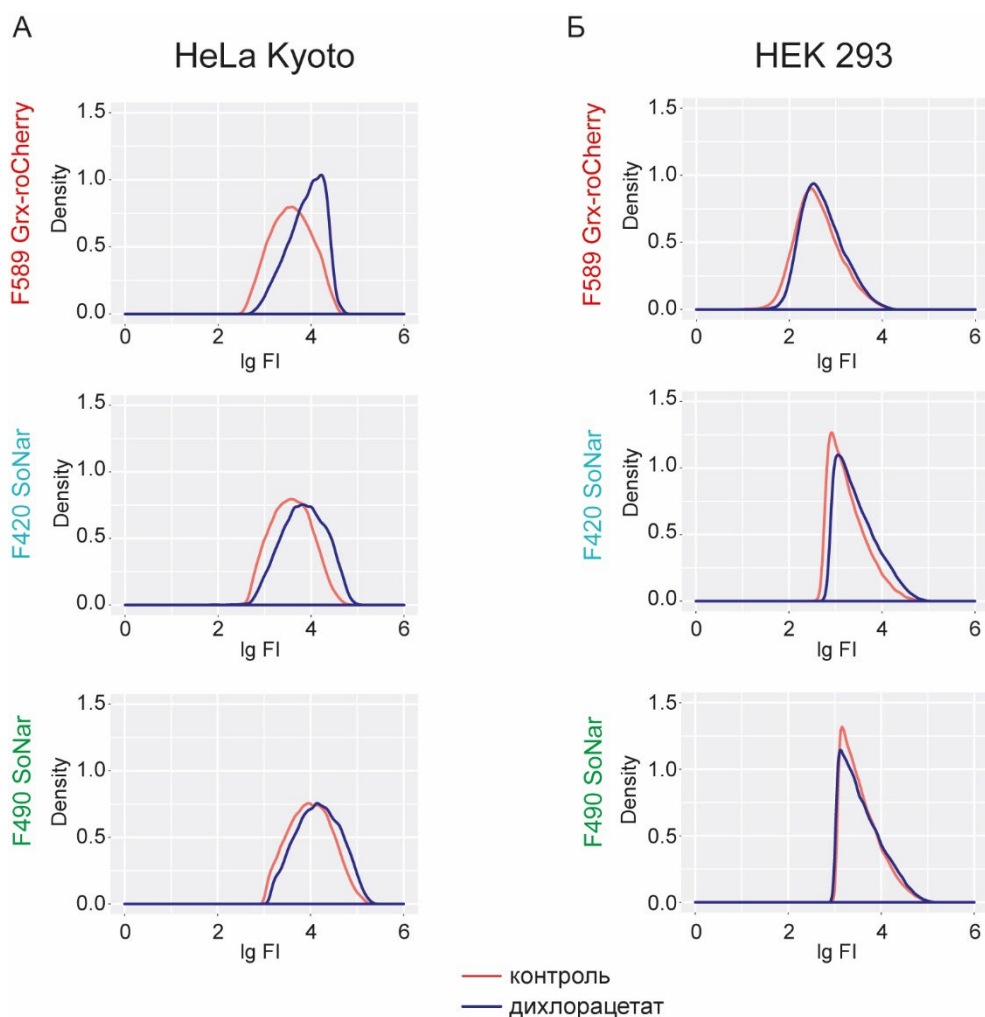


Рисунок 43. Определение влияния дихлорацетата (DCA) на редокс-статус пулов глутатиона и NAD с помощью биосенсоров Grx1-roCherry и SoNar в клетках (А) HeLa Kyoto и (Б) HEK293. Гены Grx1-roCherry и SoNar коэкспрессированы в указанных клетках. Анализ флуоресцентного сигнала в каждом канале проводили с помощью проточной цитометрии. Для этого оценивали распределение сигналов Grx1-roCherry (lgF_{589}) и SoNar (lgF_{420} и lgF_{490}) в клетках, которые инкубировали в течение 48 часов с 30 мМ DCA, а также контрольных без добавления вещества. На каждом графике по оси X обозначена интенсивность флуоресценции по каждому каналу в логарифмической шкале, по оси Y представлена ядерная оценка плотности распределения флуоресцентного сигнала (KDE, kernel density estimation) в анализируемой популяции клеток. Для каждого графика проанализировано не менее 10 000 клеток.

3.1.1.6. Редокс-различия в компартментах разных типов клеток при локализованной продукции H_2O_2

При окислительном стрессе H_2O_2 является основным фактором, окисляющим пул глутатиона. Однако неизвестно, как продукция H_2O_2 в определенных компартментах клетки влияет на 2GSH/GSSG в других компартментах. Например, влияет ли образование H_2O_2 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 H_2O_2 в качестве продукта реакции [725]. D-аминокислоты являются менее распространенными оптическими изомерами в клетках млекопитающих, поэтому DAAO можно использовать для направленной генерации H_2O_2 в системе, индуцируя реакцию внесением в систему какой-либо D-аминокислоты [159,726]. Например, в клеточных культурах это достигается добавлением D-аминокислоты в клеточную среду, в животных моделях путем добавления D-аминокислоты в пищу или инъекцией в ткани.

В наших экспериментах мы работали с двумя клеточными культурами: первичными кортикальными нейронами мыши и клетками линии HeLa Kyoto. С помощью сигнальных полипептидных меток мы локализовали DAAO в ядре (DAAO-NLS) и митохондриальном матриксе (DAAO-мито). Редокс-статус оценивали в цитозоле указанных типов клеток с помощью Grx1-roCherry-цито и матриксе митохондрий с помощью Grx1-roGFP2-мито. Индукцию производства H_2O_2 в ядре или митохондриях запускали добавлением в клеточную среду 2 mM D-норвалина. Мы показали, что образование H_2O_2 в ядре приводит к окислению биосенсоров как в цитозоле, так и митохондриях обоих типов клеток (**рис. 44А,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. 44В**). 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. 44Г**).

Клетки HeLa Kyoto по своей природе представляют онкотип. Такие клетки обладают высокой антиоксидантной активностью, причем у большинства клеток она основана на Trx-зависимой системе [727]. В частности, наблюдается повышенная экспрессия Trx и TrxR, именно поэтому Trx-зависимую систему рассматривают в качестве перспективной мишени для терапии [728]. Чтобы подтвердить роль Trx-системы в качестве основного фактора, ограничивающего распространение межкомpartmentного окисления в клетках HeLa Kyoto, мы применили ингибитор TrxR ауранофин [729]. 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 DAAO. При ингибировании TrxR в клетках HeLa Kyoto мы наблюдали окисление не только в митохондриях, но и цитозоле (**рис. 44Д**).

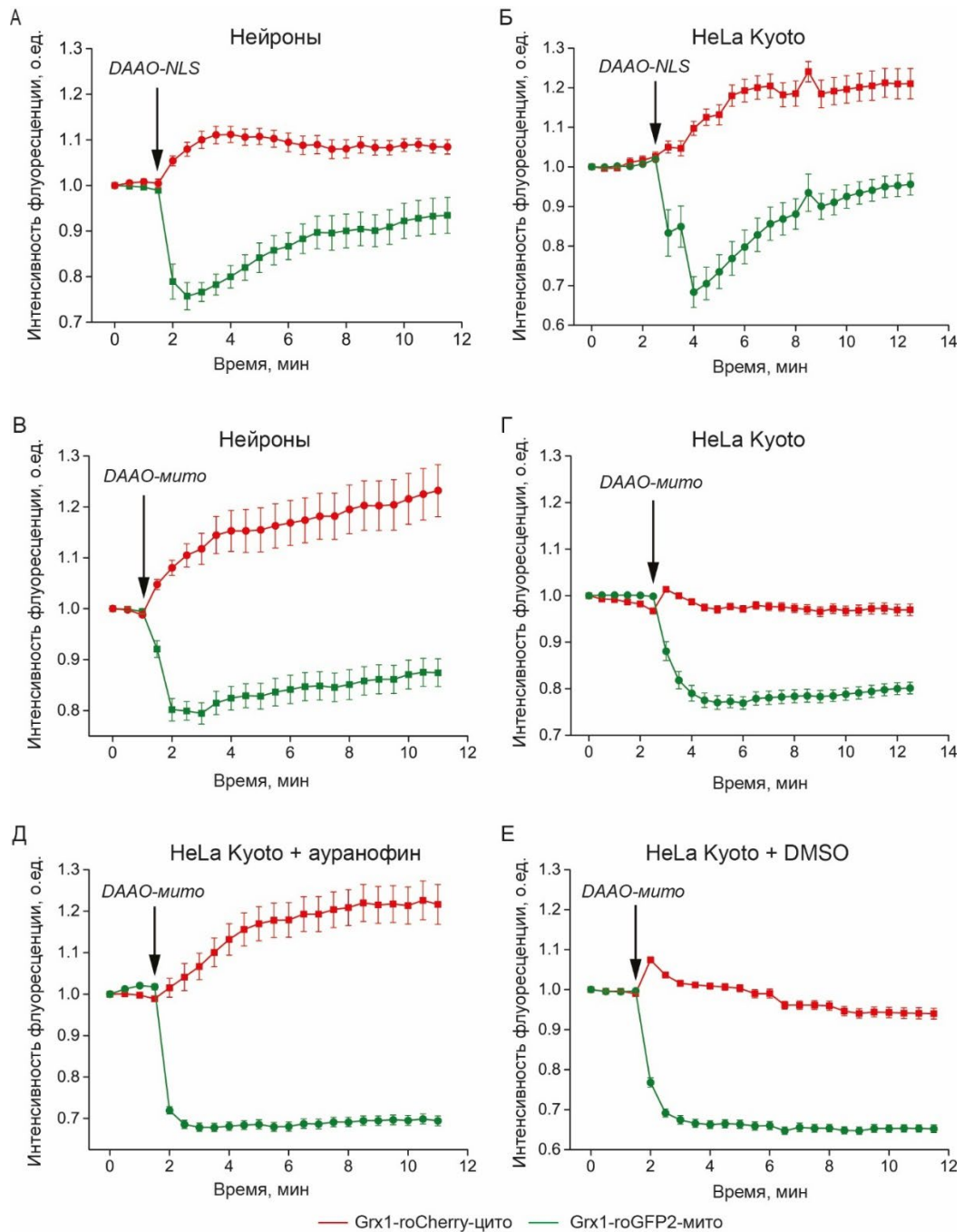


Рисунок 44. Динамика изменений редокс-статуса цитозоля (красные линии, измерено биосенсором Grx1-roCherry, сигнал F₅₈₉) и матрикса митохондрий (зеленые линии, измерено Grx1-roGFP2, сигнал F₄₈₈) в условиях локальной продукции H₂O₂ в митохондриях и ядре клеток HeLa Kyoto и нейронах смешанной эмбриональной 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 в качестве контроля.

На всех графиках стрелками обозначен момент добавки в среду 2 мМ D-норвалина – субстрата DAAO, что запускает продукцию H₂O₂. 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 F₅₈₉ и снижение F₄₈₈.

Причем при заданных условиях динамика сигнала Grx1-roCherry в цитозоле HeLa Kyoto оказалась сравнимой с динамикой в цитозоле нейронов (рис. 44Д). Добавление к клеткам DMSO в качестве контроля, так как в нем растворяли ауранофин, не оказывало подобного эффекта на сигнал биосенсоров (рис. 44Е). Таким образом, Trx-зависимая система играет ключевую роль в контроле распространения редокс-сигналов между внутриклеточными компартментами.

Позднее в схожей модели мы получили данные с применением биосенсоров NuPer для регистрации H_2O_2 . Генерация H_2O_2 в ядре клеток HeLa Kyoto приводит к формированию градиента H_2O_2 в цитозоле. Именно Trx-зависимая система играет ключевую роль в поддержании этого градиента, предотвращая широкую диффузию H_2O_2 в цитозоле. Это было доказано экспериментально также с применением ингибитора TrxR ауранофина.

3.1.2. Биосенсор для регистрации гипогалогенных кислот

В настоящее время гипогалогенные кислоты представляют собой класс наименее изученных биологически значимых соединений с высокой реакционной способностью. При этом давно известно, что активные формы галогенов (АФГ) активно участвуют в молекулярных реакциях иммунного ответа различных организмов. Основными представителями таких соединений в биологических системах являются $HOCl$ и $HOBr$. Схожие свойства демонстрирует $HOSCN$, эта кислота хотя и не является производной галогена, относится к так называемым псевдогипогалогенным кислотам по характерным свойствам. Все эти соединения производятся в клетках млекопитающих различными пероксидазами: миелопероксидазой, лактопероксидазой, пероксидазой эозинофилов и т.д. [237].

$HOCl$ и $HOBr$ являются сильными окислителями и взаимодействуют с различными нуклеофилами, содержащими атомы серы и азота, например, с аминами и тиолами, а также органическими соединениями, содержащими ароматические кольца и ненасыщенные связи [245,246,730,731]. В этом контексте выглядит логичным, что в природе появились системы, использующие подобные соединения для защиты тканей организма от чужеродных агентов. Действительно, нейтрофилы с помощью $HOCl$ нейтрализуют бактерии и помогают бороться с грибковыми заболеваниями [732,733]. $HOBr$ образуется в эозинофилах [734], которые проявляют активность против многоклеточных паразитов. $HOSCN$ демонстрирует наименее агрессивные свойства в ряду данных соединений, но все же является мощным антибактериальным агентом, который производится лактопероксидазой и содержится во многих биологических жидкостях: слюне, слезе, молоке, жидкостях, покрывающих

дыхательные пути [735,736]. При неконтролируемой повышенной продукции (псевдо)гипогалогенные кислоты оказывают разрушающий эффект на собственные клетки тканей. Гипогалогенный стресс является маркером различных заболеваний, сопровождающихся острым или хроническим воспалением [737–740].

На сегодняшний день нам мало известно о пространственной и временной динамике гипогалогенных кислот и их производных в живых системах. Есть основания полагать, что их роль в организме не ограничивается лишь участием в реакциях иммунного ответа и в развитии неспецифических повреждений в ходе воспалительных процессов. Например, среди этого класса выделяется HO₂SCN, которая, будучи более слабым окислителем, демонстрирует селективность по отношению к тиолам и селеносодержащим молекулам [260,261]. Агрессивная по своим химическим свойствам HOCl в живых клетках при взаимодействии с аминами конвертируется в N-хлорамины, которые также демонстрируют селективность по отношению к редокс-активным Cys [256,741,742]. Таким образом, HO₂SCN и хлорамины – более мягкие и более стабильные окислители, которые могут выполнять функции регуляторов редокс-процессов. Процессы и механизмы реакций с их участием еще предстоит исследовать.

Ограничения в исследованиях (псевдо)гипогалогенных кислот и их производных обусловлены отсутствием инструментов для их регистрации в живых целостных системах. До недавнего времени создание генетически кодируемого биосенсора представлялось невозможной задачей, поскольку считалось, что гипогалогенные кислоты неспецифично модифицируют аминокислотные остатки белков, и поэтому белка, подходящего на роль сенсорного домена, попросту не существует в природе. Повышенный интерес к этой теме подтверждается созданием большого количества синтетических красителей, взаимодействующих с продуктами гипогалогенного стресса. Современная коллекция таких красителей насчитывает несколько десятков, среди них есть селективные индикаторы, демонстрирующие быстрый и обратимый ответ [743–749], причем некоторые демонстрируют селективность по отношению к конкретной кислоте, например, создан специфичный синтетический индикатор для регистрации HOBr [703].

Сегодня мы наблюдаем, как появляется все больше и больше сведений о том, что (псевдо)гипогалогенные кислоты и их производные участвуют в направленной регуляции некоторых белков как прокариотических, так и эукариотических, вызывая модификации по определенным аминокислотным остаткам [593–595,750–753]. Вероятно, мы наблюдаем ситуацию в истории, некогда уже произошедшую с представителями активных форм кислорода, которым также приписывали роль исключительно повреждающих факторов до тех пор, пока не обнаружили и не подтвердили их участие во множестве физиологических

процессов. Поэтому мы поставили цель создать первый в своем роде генетически кодируемый биосенсор для исследования в живых системах (псевдо)гипогалогенных кислот и их производных.

3.1.2.1. Создание и скрининг версий биосенсора для регистрации гипогалогенных кислот

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) [593], RclR (YkgD) [595] и NemR [596], были обнаружены в *E.coli* и один, HupR (YubR) [594], в клетках *B.subtilis*. Позднее, когда мы уже остановили свой выбор и уже работали над созданием биосенсора на основе белка NemR, список подобных сенсорных белков пополнился еще тремя: HupR [753] из *S.aureus*, причем HupR из *S.aureus* и HupR из *B.subtilis* не являются гомологами, а также HupS [754] из *M.smegmatis* и HprS [755] – еще один регулятор из *E.coli*.

Мы остановили выбор на белке NemR из *E.coli*, поскольку на тот момент он был наиболее охарактеризован. Для остальных кандидатов либо не была расшифрована пространственная структура, либо было недостаточно сведений о селективности по отношению к гипогалогенным кислотам.

Транскрипционный фактор NemR из *E.coli* является TetR-подобным регулятором, который контролирует экспрессию генов *nemR*, *nemA* и *gloA* в одном опероне [756]. Исходно NemR был определен как сенсор бактерий на активные электрофилы, например, хиноны и карбонильные соединения с высокой реакционной способностью. При увеличении их концентрации в NemR, функционирующем в виде димера, происходит образование межсубъединичных S-S связей между Cys21 и Cys21', Cys116 и Cys116'. В результате сродство NemR к ДНК снижается, что запускает транскрипционный ответ в клетке на изменяющиеся условия [756]. Однако также было обнаружено, что транскрипция указанных генов под контролем NemR усиливается, если клетки испытывают гипогалогенный стресс [596]. NemR *E.coli* содержит 6 остатков Cys, но лишь Cys106 является ключевым в запуске транскрипционного ответа в присутствии HOCI. Для изучения механизма взаимодействия NemR с гипогалогенными кислотами группа исследователей под руководством Ursula Jacob получила мутантную версию NemR^{C106}, которая содержит только Cys106, остальные 5 остатков в позициях 21, 98, 116, 149 и 153 были заменены на Ser. Далее они получили кристалл NemR^{C106} и расшифровали пространственную структуру этого белка [752]. Область структуры белка вблизи Cys106 формирует подвижную петлю

(а.о. 97-105) (**рис. 45**). При некоторых конформациях этой петли боковая группа Cys106 сближается с Lys175 (**рис. 45**). Авторы предположили, что в условиях повышенных концентраций HOCl Cys106 подвержен хлорированию и является электрофильной мишенью для аминогруппы Lys175, в результате между Cys106 и Lys175 образуется сульфенамидная связь [752].

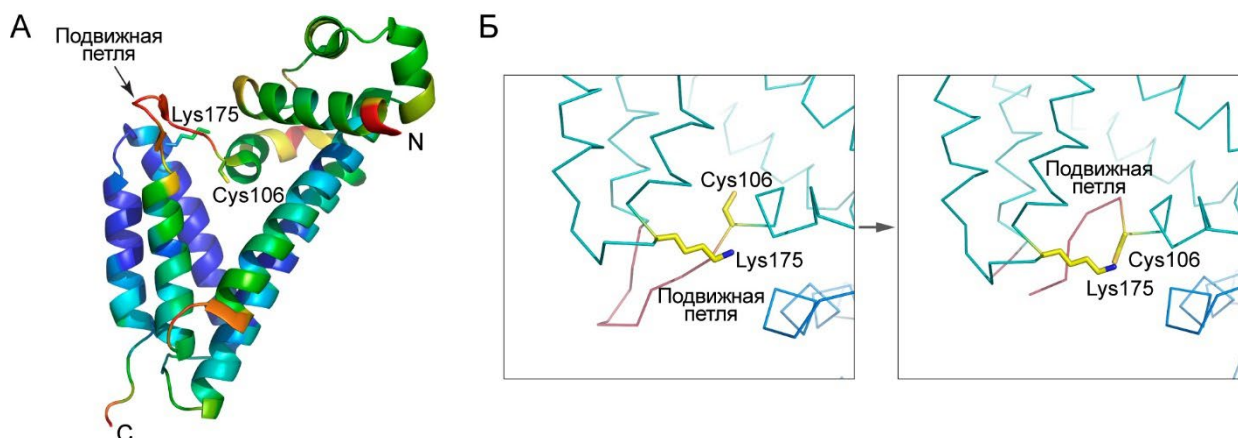


Рисунок 45. Пространственная структура NemR^{C106} E.coli. (А) На структуре NemR^{C106} (PDB ID: 4YZE) представлены цвета, обозначающие молекулярную подвижность (b-фактор): от наиболее подвижных (красные оттенки) до наиболее жестких (голубые оттенки). **(Б)** Конформационные переходы подвижной петли, вызванные окислением HOCl, что в результате приводит к сближению Cys106 и Lys175.

Таким образом, NemR был выбран нами в качестве основы для нового биосенсора. Мы сразу решили работать с одноцистеиновой версией NemR^{C106}, которую нам любезно предоставила лаборатория U.Jacob. Выбор NemR^{C106} позволил нам исключить реакцию будущего биосенсора с активными электрофилами. В качестве флуоресцентного ядра нами был выбран srYFP, который ранее нами и нашими коллегами был успешно применен при создании различных биосенсоров.

Примечательно, что при окислении NemR не испытывает глобальных конформационных изменений в структуре за исключением упомянутой подвижной петли в области а.о. 97-105. Поэтому мы решили интегрировать srYFP в эту подвижную область, предполагая, что локальные конформационные изменения, вызванные взаимодействием с HOCl, будут передаваться на FP, меняя микроокружение хромофора и спектральные характеристики. Предполагаемая схема функционирования биосенсора представлена на **рисунке 46**. Схожий дизайн реализован в различных биосенсорах, например, NuPer [555] и SoNar [641].

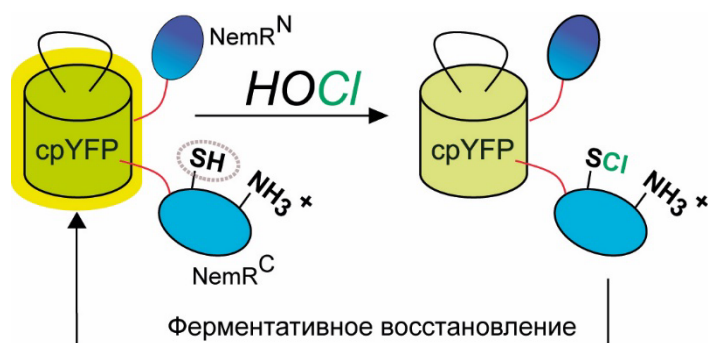


Рисунок 46. Предполагаемая схема функционирования биосенсора на основе $NemR^{C106}$ из *E.coli* и интегрированного в его структуру cpYFP.

Выбранная нами область в структуре *NemR* оказалась небольшой (с 97 а.о. по 105 а.о.), поэтому мы решили проверить 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. Укорачивание аминокислотной последовательности в области сенсорного домена, в которую предстоит интегрировать FP, иногда способствует лучшей передачи сигнала в виде конформационных переходов от сенсорной части к репортерной флуоресцентной. Вероятно, данный эффект в таком случае можно объяснить более тесным сопряжением FP с сенсорным модулем. Такой подход, например, был реализован при создании SoNag [641]. Поэтому мы также получили несколько версий химерного белка *NemR*-cpYFP, в котором мы удалили аминокислотные остатки в позиции 104 или одновременно в двух позициях 104,105. В общей сложности нами было получено 12 версий *NemR*-cpYFP с разными вариациями.

Полученные версии тестировали в клетках *E.coli* штамма XL1 Blue. Примечательно, что все 12 версий демонстрировали флуоресцентный сигнал в бактериальных клетках. Далее мы оценивали их способность к изменению спектральных характеристик при окислении HOCl. Для этого к 1 мл PBS с суспензией бактерий, экспрессирующих гены версий *NemR*-cpYFP, мы добавляли NaOCl до конечной концентрации 80 мкМ. Мы регистрировали спектры возбуждения флуоресценции каждой версии до добавки окислителя и после. Только 5 версий, а именно конструкции со вставкой cpYFP в позиции между 104-105 (линкеры SAG/GT), 103-105 (SAG/G), 103-105 (SAG/GT), 102-105 (SAG/G) и 102-105 (SAG/GT), демонстрировали выраженные изменения в спектрах. Наибольшие изменения показала версия 102-105 (SAG/GT) (рис. 47), и в итоге была отобрана нами для дальнейших тестов. Новый биосенсор мы назвали Hypocrates (от **Н**ypo**ch**lorite **R**atiometric **S**ensor), что также созвучно с именем античного врача Гиппократа (англ. Hippocrates), который один из первых в истории начал описывать воспалительные процессы в организме человека.

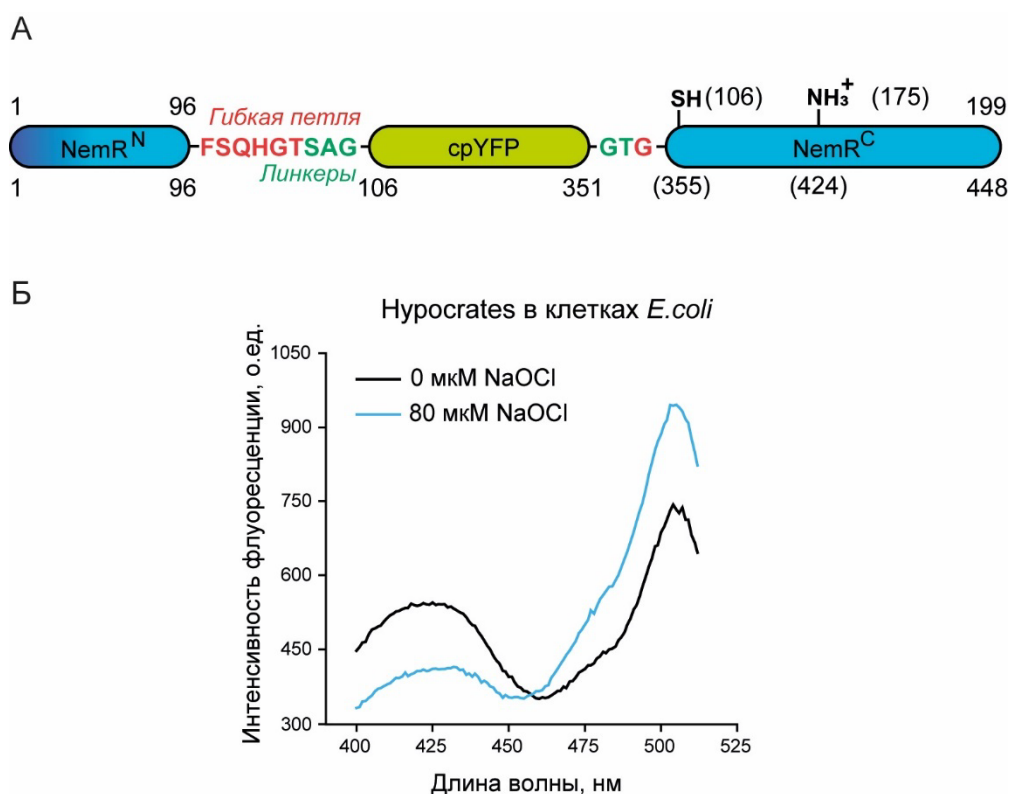


Рисунок 47. Биосенсор Hucrates. (А) Структура Hucrates: голубым отмечены части $NemR^{C106}$, желтым – $cpYFP$, линкеры SAG и GT обозначены зеленым, последовательность красных букв обозначает подвижную петлю в $NemR$. Нумерация ключевых а.о. относительно последовательности $NemR$ обозначена сверху. Снизу те же а.о. указаны относительно последовательности общей химерной конструкции. (Б) Спектр возбуждения флуоресценции биосенсора Hucrates в клетках *E.coli* в восстановленной и окисленном состояниях.

3.1.2.2. Свойства биосенсора Hucrates

Мы получили очищенный белковый препарат биосенсора Hucrates. Биосенсор 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. 48А). Добавление к белку NaOCl приводит в спектре возбуждения флуоресценции к выраженному увеличению интенсивности депротонированной формы хромофора при пропорциональном падении интенсивности протонированной (рис. 48Б). Таким образом, Hucrates демонстрирует радиометрическое поведение сигнала, который рассчитывается как соотношение E_{x500}/E_{x425} . Важно, что изменение флуоресцентного сигнала обратимо, при инкубировании этой же пробы с избытком восстановителя DTT (5 мМ) мы наблюдали восстановление спектра (рис. 48Б).

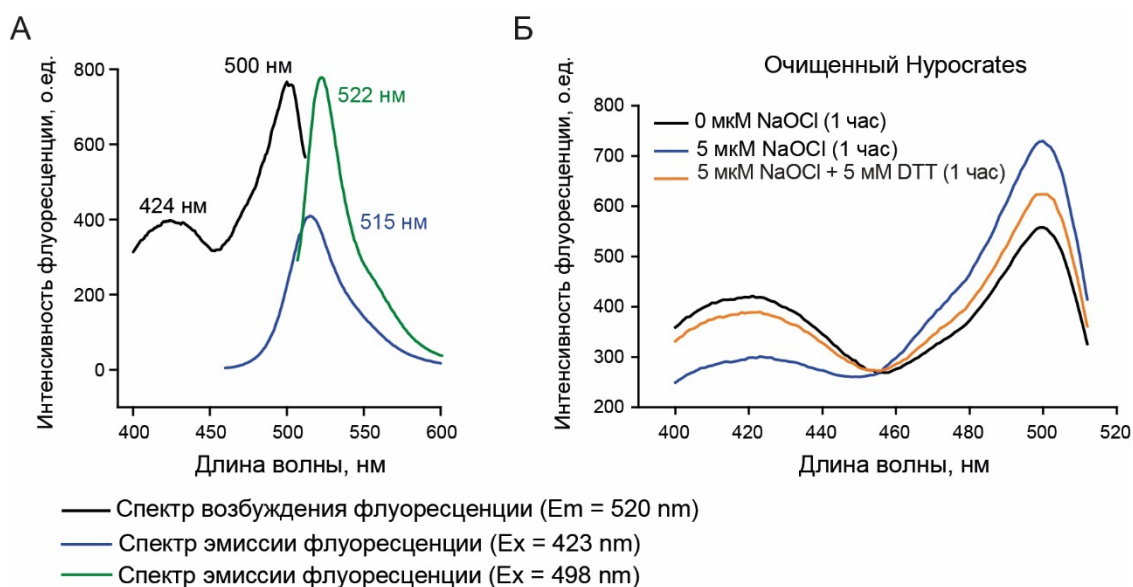


Рисунок 48. Спектральные характеристики биосенсора Нурocrates. (А) Спектры возбуждения и эмиссии флуоресценции Нурocrates. (Б) Изменения в спектре возбуждения флуоресценции Нурocrates при добавлении NaOCl и последующей инкубации с восстановителем DTT. Измерения сделаны в PBS, концентрация белка в пробе 0,5 мкМ. Для максимально выраженного ответа каждую пробу инкубировали в течение 1 часа перед измерением.

Гипогалогенные кислоты представлены целым классом соединений. Поэтому важно было проверить, демонстрирует ли Нурocrates изменение сигнала при взаимодействии с другими представителями класса. Как оказалось, добавление NaOBr к пробе Нурocrates вызывает сравнимые с NaOCl изменения в спектре возбуждения флуоресценции (**рис. 49А**). HO SCN, которую относят к так называемым псевдогипогалогенным кислотам за сходства химических свойств с HOCl и HOBr, вызывает аналогичные спектральные изменения биосенсора Нурocrates (**рис. 49Б**). 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 [757]. Например, именно в нейтрофилах NCT является одним из наиболее распространенных производных HOCl [257]. При взаимодействии с NCT Нурocrates также демонстрирует обратимое изменение сигнала (**рис. 49В**). Таким образом, мы позиционируем Нурocrates как биосенсор на (псевдо)гипогалогенные кислоты и их производные. Важно отметить, что в биологических системах при функционировании гемовых пероксидаз Нурocrates в основном и будет находиться в условиях образования смеси АФГ и их производных.

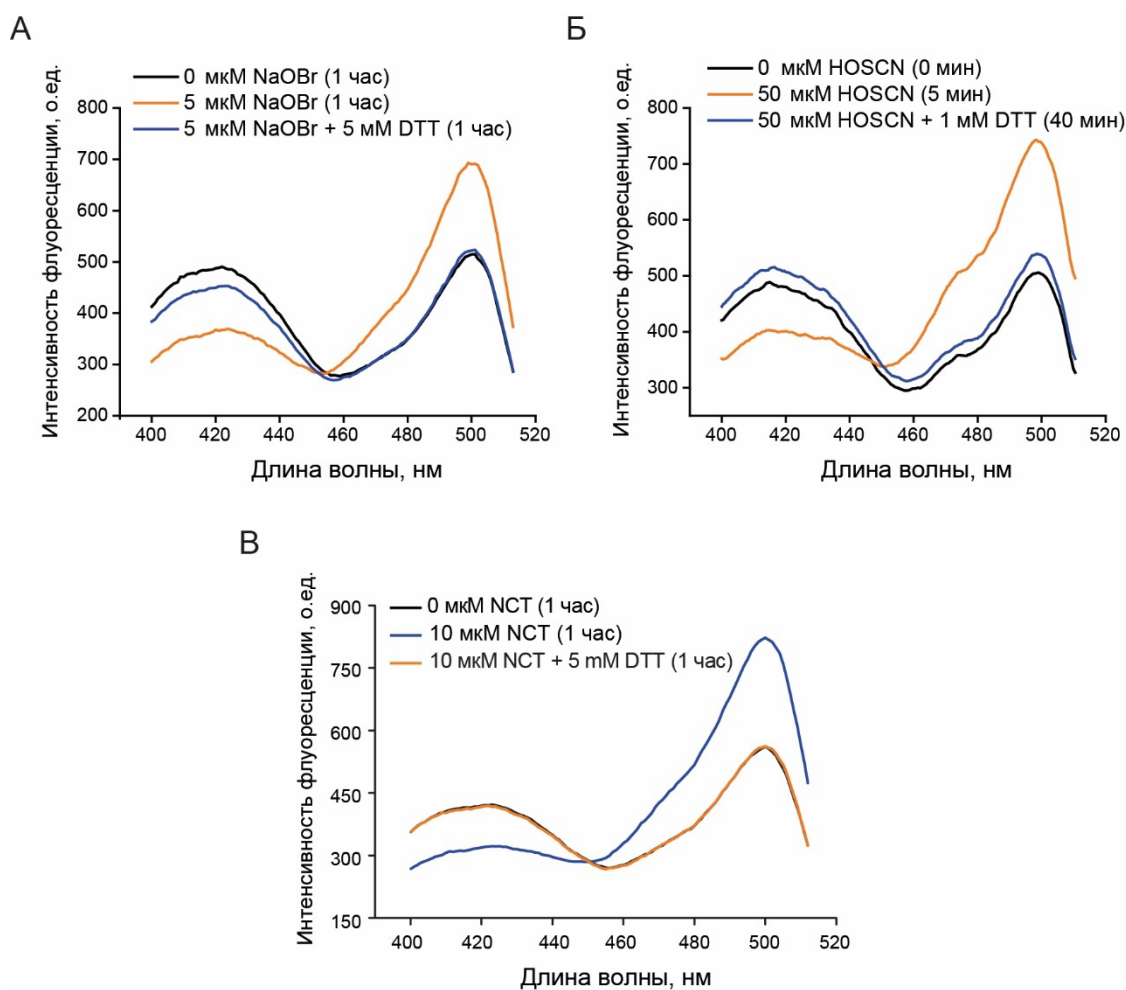


Рисунок 49. Изменения в спектре возбуждения флуоресценции биосенсора Нуросcrates в присутствии (А) NaOBr (Б) HOSCN (В) N-хлортаурина (NCT) при последующей инкубации всех проб с восстановителем DTT. Концентрация белка в пробе с HOSCN 2 мкМ, в остальных – 0,5 мкМ. Для максимально выраженного ответа каждую пробу инкубировали в течение 1 часа перед измерением.

При определении спектральных характеристик Нуросcrates мы установили значения его яркости флуоресценции в окисленном и восстановленном состояниях. В зависимости от состояния Нуросcrates его яркость находится в диапазоне 4 400 – 13 900, что составляет 7%-22% от белка сравнения EYFP (Fpbase ID: 8DNLG). В **таблице 5** подробно представлены все характеристики.

Мы обратили внимание, что инкубация проб белка Нуросcrates с DTT приводит к полному восстановлению только в случае, если биосенсор был предварительно окислен HOSCN или NCT. HOSCN и NCT демонстрируют более мягкие окислительные свойства и характеризуются большей селективностью по отношению к редокс-активным остаткам Cys по сравнению с HOCl или HOBr [241,245]. Вероятно, взаимодействие Нуросcrates с NaOCl или NaOBr, что в чистом виде реализуемо только в системе *in vitro*, приводит к возникновению неспецифичных модификаций в некоторых молекулах белка в пробе. Т.е. в

пробе присутствует некоторое количество «неправильно» окисленных молекул. Такие модификации, вероятно, необратимы, и поэтому мы не наблюдаем полного восстановления спектра пробы при инкубации с DTT.

Таблица 5. Оптические свойства Нурocrates в восстановленном и окисленном состояниях.

Восстановленного состояния пробы достигали инкубацией с DTT; окисленного – инкубацией с *N*-хлоротаурином (NCT). Яркость рассчитывается как произведение молярного коэффициента поглощения и квантового выхода.

Длина волны, нм	Восстановленный	Окисленный
Квантовый выход		
425	~ 0,19	~ 0,15
500	~ 0,82	~ 0,83
Молярный коэффициент поглощения, M ⁻¹ см ⁻¹		
425	~ 31200	~ 29600
500	~ 12000	~ 16700
Яркость		
425	~ 5900	~ 4400
500	~ 9900	~ 13900

Среди таких «неправильных» модификаций могут быть образования сульфонов Met, тирозин-тирозиновые сшивки, может происходить образование сульфеновых и сульфоновых кислот по Cys. Мы проверили, как будет изменяться спектр биосенсора при увеличении соотношения белок:окислитель в пробе. При увеличении этого соотношения до 1:200 в случае с NaOCl и NaOBr происходит полное выгорание биосенсора и потеря его флуоресцентных свойств (**рис. 50**). При этом избыток NCT в этой же системе приводит к максимальному окислению Нурocrates, не вызывая деградации белка (**рис. 50**). Выбранные нами соотношения белок:окислитель являются очень высокими. По данным литературы известно, что для некоторых белков и при меньшем этом показателе наступает деградация, это показано на примере фибронектина I при молярном соотношении с NaOCl 1:40 [758] или липопротеинов при соотношении 1:25 [759]. Схожим образом в другом исследовании тестировали воздействие HOCl и хлораминов на структурную целостность коллагена и восприимчивость к протеолизу, где было показано, что NCT также не оказывает эффекта, в то время как HOCl при тех же концентрациях оказывает выраженное воздействие [760]. Судя по всему, HOCl и NCT действительно более специфично модифицируют белки, созданный нами Нурocrates не исключение.

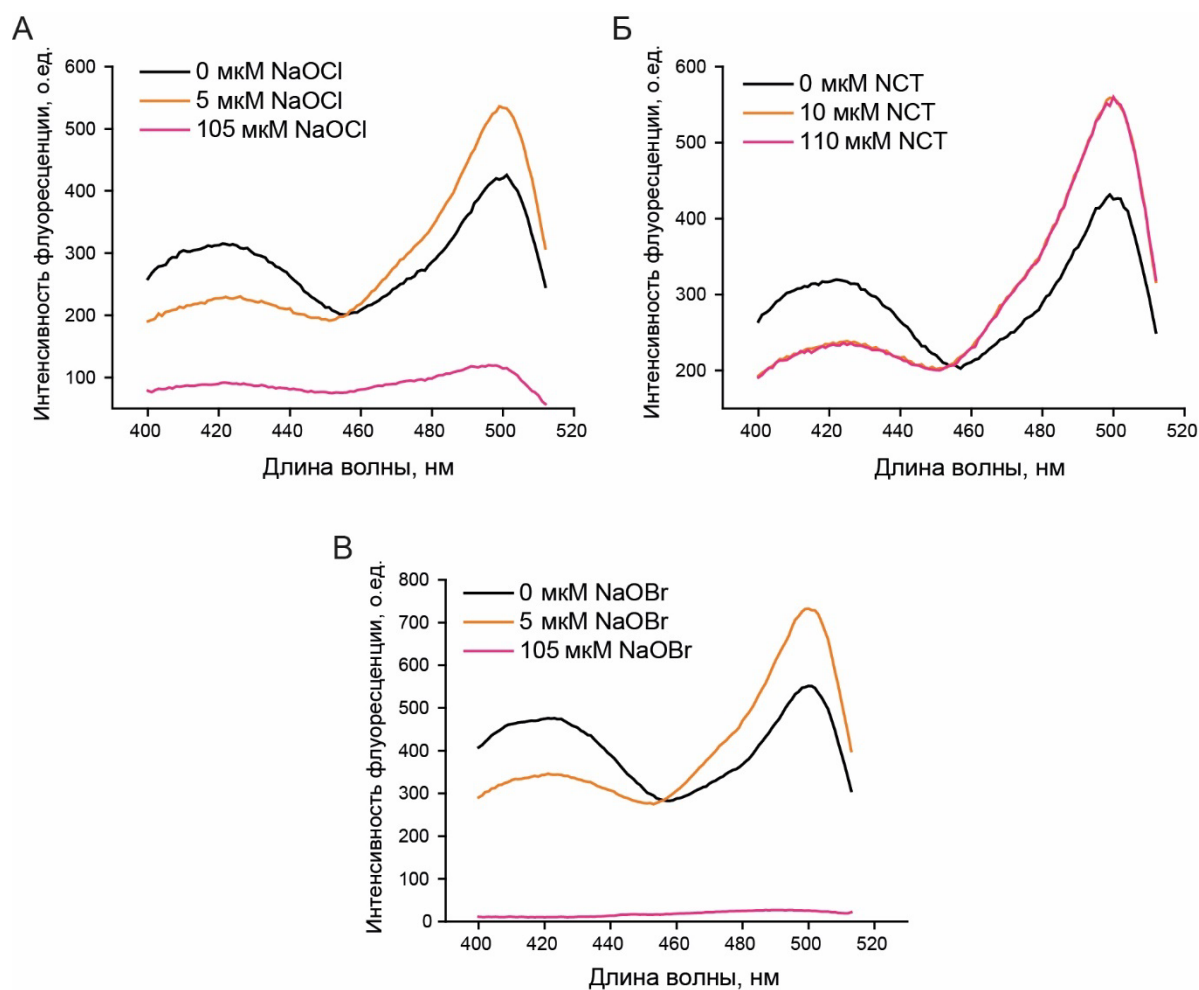


Рисунок 50. Изменения в спектре возбуждения флуоресценции биосенсора Hurocrates в присутствии избытка (А) NaOCl (Б) N -хлоротаурина (NCT) (В) NaOBr . Концентрация белка в пробе 0,5 мкМ.

Для определения чувствительности мы титровали белок Hurocrates (0,5 мкМ белка в пробе) разными концентрациями целевых аналитов (до 15 мкМ). Hurocrates 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. 51). Ответ с HOscN достигал насыщения в меньшей концентрации окислителя, в среднем максимальный ответ мы наблюдали в пробе уже при соотношении белок:окислитель в значении 1:2; для NaOCl , NaOBr , NCT эффект был достигнут примерно при 1:10 (рис. 51). Поскольку HOscN из представленных соединений демонстрирует бóльшую селективность по отношению к Cys, в том числе в сравнении с NCT, полученные данные выглядят закономерными. В пробе с белком *in vitro* HOscN в меньшей степени вызывает неспецифичные реакции, в основном модифицируя редокс-активный Cys, и поэтому для «правильного» окисления всех молекул биосенсора расходуется меньше окислителя по сравнению с аналогичными пробами для HOCl , HOBr и даже NCT.

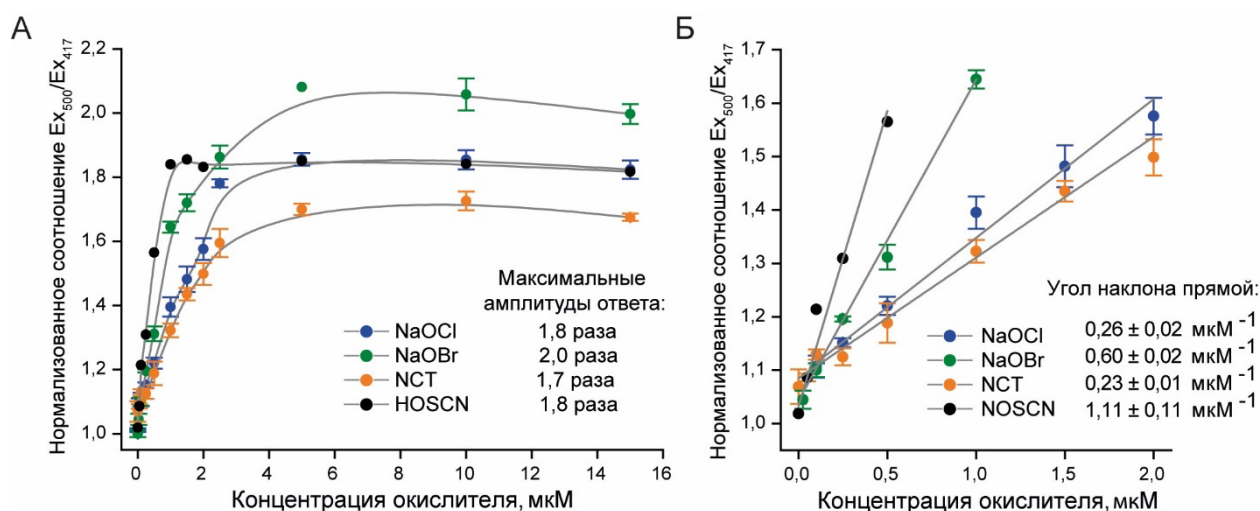


Рисунок 51. Чувствительность биосенсора Hurocrates. (А) Кривые титрования Hurocrates (0,5 мкМ в пробе) в натрий-фосфатном буфере при добавлении NaOCl, NaOBr, HOscN или NCT. Данные представлены в виде среднего, планки погрешностей обозначают стандартную ошибку среднего, $N \geq 2$. Максимальные амплитуды 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.

Чтобы установить, какие минимальные концентрации гипогалогенных кислот может регистрировать Hurocrates, мы воспользовались формулой $3Sy|x/b$, где $Sy|x$ обозначает стандартное отклонение регрессионной модели, b соответствует углу наклона линейного участка на графиках кривых титрования (рис. 51Б). Таким образом, 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 АФГ могут достигать локально нескольких мМ, чувствительность биосенсора Hurocrates является достаточной для применения данного инструмента в биологических моделях.

АФГ обладают высокой реакционной способностью и поэтому быстро взаимодействуют с широким спектром внутриклеточных мишеней. Их времена жизни в свободном состоянии крайне малы. Важно, чтобы разрабатываемый инструмент в условиях живой клетки не проигрывал различным мишеням в скорости взаимодействия с АФГ. В коллаборации с лабораторией Joris Messens (Бельгия) мы определили кинетические свойства Hurocrates, применив метод остановленной струи (a stopped-flow instrument). Полученные кривые описали с помощью двойных экспоненциальных уравнений и построили графики зависимости быстрых кинетических компонент (k_{fast}) от концентраций соответствующего окислителя. Вычислив углы наклона прямых на графиках, мы рассчитали значения констант скорости второго порядка (рис. 52). Мы выяснили, что Hurocrates ~ 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 ($\sim 6,1 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$).

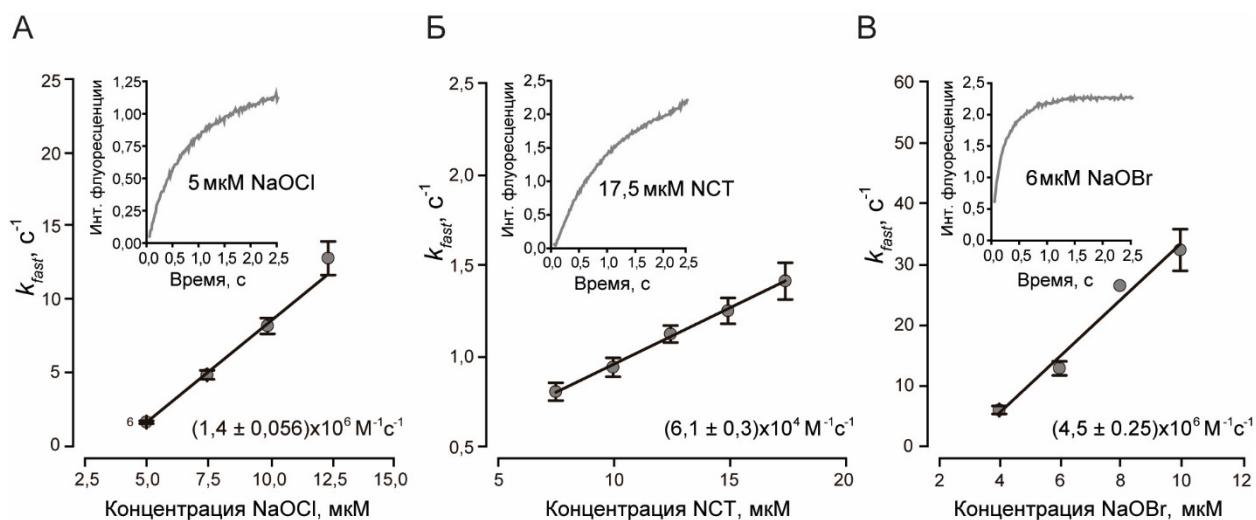


Рисунок 52. Скорость реакций биосенсора Nurocrates. Кинетические данные получены с помощью метода остановленной струи, при внесении соответствующего окислителя регистрировали временную динамику изменения флуоресцентного сигнала (Ex. 485 нм, Et. > 515 нм) – кривые приведены в верхней части. Основные графики представляют зависимость вычисленного значения k_{fast} от концентраций (А) NaOCl, (Б) NCT, (В) NaOBr. Представлены средние значения, планки погрешностей обозначают среднеквадратическое отклонение, $N \geq 2$.

Мы также определили кинетические параметры для исходного белка $\text{NemR}^{\text{C106}}$, при этом в качестве сигнала использовали автофлуоресценцию Trp. Исходный $\text{NemR}^{\text{C106}}$, взятый за основу биосенсора, ~ в 100 раз быстрее реагирует с NaOCl ($\sim 3,0 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$), чем с NCT ($\sim 4,4 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$) (рис. 53).

Ожидаемо, что биосенсор Nurocrates и исходный белок NemR быстрее реагирует с гипогалогенными кислотами по сравнению с хлорамином NCT. Однако при анализе литературы оказалось, что оба тестируемых нами белка на 2 порядка медленнее взаимодействуют с HOCl по сравнению с реакцией взаимодействия HOCl со свободным цистеином и другими схожими соединениями [761]. При этом оба белка демонстрируют необычно высокие значения констант по отношению к NCT. Для свободного цистеина и некоторых белков, например, для глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы и креатинкиназы значения этих констант для NCT составляют $\sim 1\text{-}3 \times 10^2 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$ [256,741]. Причем Nurocrates ($6,1 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$) реагирует с NCT даже быстрее, чем исходный $\text{NemR}^{\text{C106}}$ ($4,4 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$). Таким образом, на селективность и кинетические свойства белков влияет окружение редокс-активных Cys. В свете полученных данных важно внести следующее уточнение. Nurocrates 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, т.е. в присутствии других соединений, конкурирующих за взаимодействия с данными окислителями, Нурocrates, вероятнее всего, будет предпочтительнее взаимодействовать с более селективными и стабильными производными, например, хлораминами.

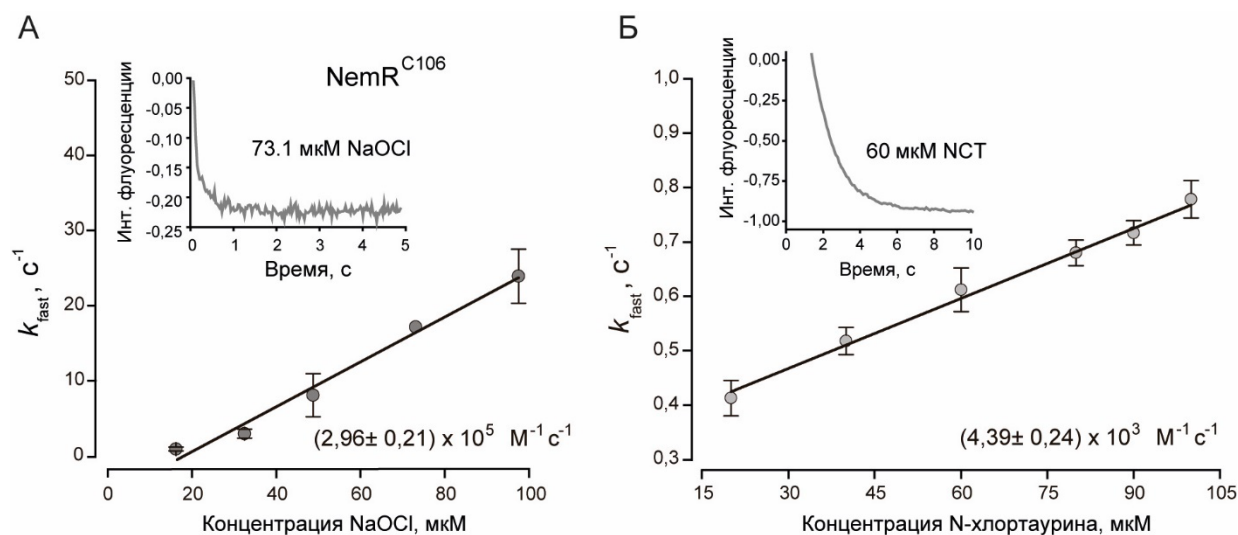


Рисунок 53. Скорость реакций NemR^{C106}. Кинетические данные получены с помощью метода остановленной струи, при внесении соответствующего окислителя регистрировали временную динамику изменения автофлуоресценции остатков Trp (Ex. 295 нм, Em. 350 нм) – кривые приведены в верхней части. Основные графики представляют зависимость вычисленного значения k_{fast} от концентраций **(А)** NaOCl и **(Б)** N-хлортаурина (NCT). Представлены средние значения, планки погрешностей обозначают среднеквадратическое отклонение, $N \geq 1$.

Далее мы установили влияние на сигнал Нурocrates 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 МАНМА NONOate), $ONOO^-$, Na_2S , ряда активных электрофилов, среди которых глиоксаль, метилглиоксаль, формальдегид. Мы также обнаружили, что в отличие от белковых препаратов многих других редокс-биосенсоров, Нурocrates устойчив к атмосферному O_2 , для этого белка характерно длительное хранение без добавления восстанавливающих агентов. Нурocrates продемонстрировал выраженный радиометрический ответ помимо целевых аналитов лишь в присутствии $ONOO^-$ (Рис. 54). На данный момент трудно сказать, является ли это свойство Нурocrates, 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. Оценка концентрации $ONOO^-$ в биологической системе также представляет сложную задачу. $ONOO^-$ образуется при

взаимодействии $O_2^{\cdot -}$ с $\cdot NO$. Утечка электронов на O_2 является нормальным процессом для клетки, поэтому лимитирующим фактором образования $ONOO^-$, как правило, является $\cdot NO$. По некоторым оценкам, концентрация $\cdot NO$ в условиях *in vivo* не превышает несколько единиц нМ [762]. Но некоторые данные описывают, что при определенных патологических состояниях, например, в ишемизированных тканях, могут быть достигнуты мкМ значения $\cdot NO$ [763]. Конечно же, далеко не весь образованный $\cdot NO$ преобразуются в $ONOO^-$. Также важно учитывать и сложные взаимодействия различных редокс-систем друг с другом. Так, например, продукция АФГ влияет на продукцию АФА. В частности, в результате активности миелопероксидазы образуется хлорированный L-аргинин, который является ингибитором $\cdot NO$ -синтаз [764].

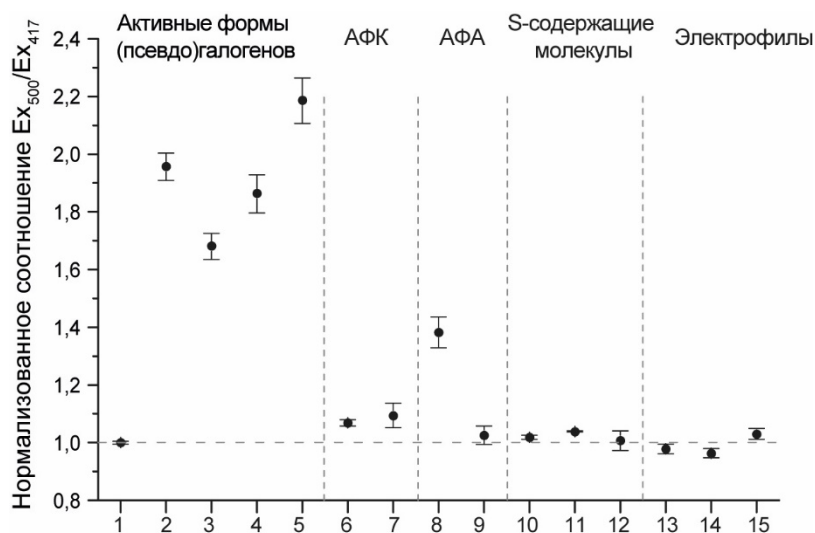


Рисунок 54. Профиль селективности очищенного препарата биосенсора Нуросcrates (2 мкМ в пробе) по отношению к различным редокс-компонентам.

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

- 1 - Восстановленный
- 2 - NaOCl (50 мкМ)
- 3 - NCT (50 мкМ)
- 4 - HOscN (50 мкМ)
- 5 - NaOBr (50 мкМ)
- 6 - H_2O_2 (50 мкМ)
- 7 - Ксантинооксидаза + ксантин (50 Ед/л, 50 мкМ) + каталаза
- 8 - $ONOO^-$ (50 мкМ) + каталаза
- 9 - MAHMA/NO (50 мкМ)
- 10 - GSH (500 мкМ)
- 11 - GSSG (500 мкМ)
- 12 - Na_2S (50 мкМ)
- 13 - Глиоксаль (50 мкМ)
- 14 - Метилглиоксаль (50 мкМ)
- 15 - Формальдегид (50 мкМ)

Все GFP-подобные белки демонстрируют чувствительность к изменению pH среды, что обусловлено особенностью хромофорной группы. Мы построили калибровочные кривые зависимости сигнала окисленного и восстановленного Нуросcrates от значений pH (рис. 55).

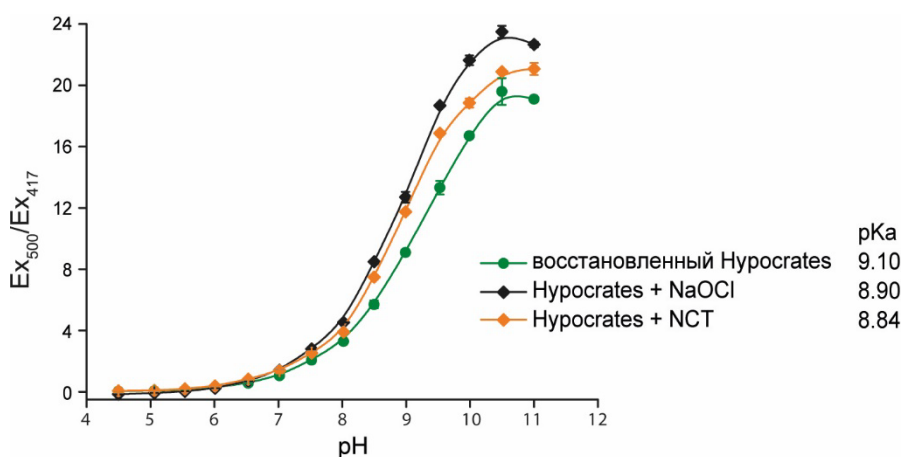


Рисунок 55. Чувствительность биосенсора Hypocrates к изменению pH среды. Кривые построены для восстановленного Hypocrates и окисленного при взаимодействии с NaOCl и NCT. Концентрация белка в пробе 0,5 мкМ. Представлены средние значения, планки погрешностей обозначают стандартное отклонение среднего, $N \geq 3$.

Значение pK_a восстановленного Hypocrates составляет 9,1. Для окисленного биосенсора это значение оказалось ниже – 8,9 при окислении NaOCl и 8,84 при окислении NCT. При изменении pH от 6,0 до 8,0 сигнал биосенсора увеличивается в 12 раз. Таким образом, в системах со значительным изменением pH этот параметр будет вносить основной вклад в динамику сигнала, перекрывая вклад целевой реакции. Как мы уже неоднократно обсуждали в данной работе, это является обычной ситуацией для большинства биосенсоров на основе FP, в особенности их круговых пермутанов, которые отличаются более открытым и потому доступным для окружающей среды хромофором. Данная проблема решается подбором подходящего контроля или еще лучше созданием контрольной версии для каждого конкретного биосенсора.

3.1.2.3. Создание контрольной версии для биосенсора Hypocrates

Контрольной версией биосенсора считается конструкция, которая демонстрирует схожие свойства за исключением ответа на целевой аналит. Такая версия также позволяет в большинстве случаев подтвердить молекулярный механизм функционирования биосенсора, например, установить роль конкретных аминокислотных остатков.

Ранее было выдвинуто предположение, что в белке NemR за реакцию с АФГ отвечает Cys106, который хлорируется и взаимодействует с Lys175 с образованием сульфенамидной связи [752]. Следовательно, мутации по этим ключевым остаткам должны нарушать взаимодействие белка с (псевдо)гипогалогенными кислотами и их производными. Мы получили версию Hypocrates-Cys355Ser (HypocrateCS, Cys355 соответствует Cys106 в NemR) и Hypocrates-Lys424Ala (HypocrateKA, Lys424 соответствует

Lys175 в NemR). Обе версии, HupocrateCS и HupocrateKA, демонстрировали схожие с исходным Hupocrates спектральные характеристики в клетках *E.coli*. При добавлении к суспензии бактерий 80 мкМ NaOCl флуоресцентный сигнал HupocrateCS не изменялся (рис. 56А), однако HupocrateKA по динамике сигнала практически не отличался от исходной версии биосенсора (рис. 56Б).

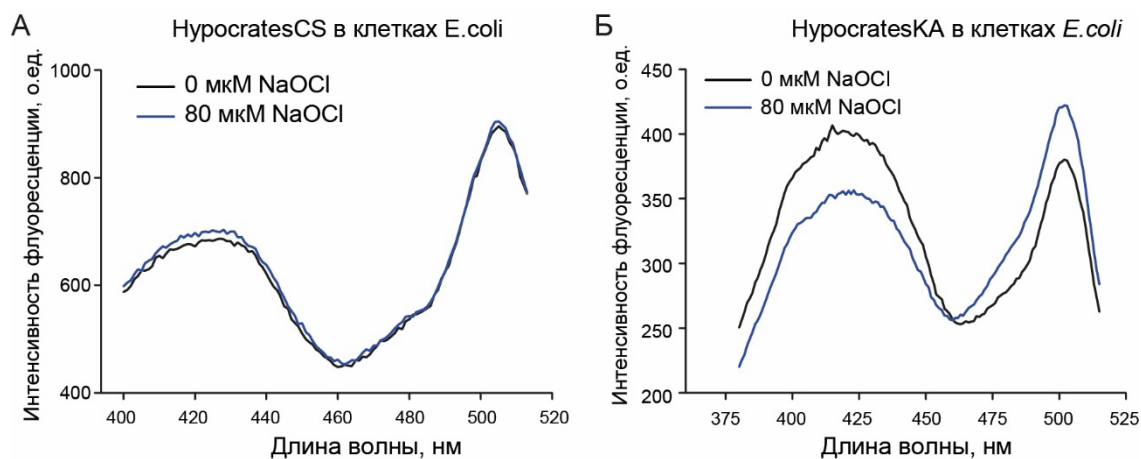


Рисунок 56. Спектры возбуждения флуоресценции версий (А) HupocrateCS и (Б) HupocrateKA в суспензии клеток *E.coli* до и после добавления NaOCl.

Таким образом, позиция Cys355 в Hupocrates (Cys106 в NemR) действительно является ключевой, определяющей взаимодействие биосенсора с гипогалогенными кислотами. Однако по нашим данным образование сульфенамидной связи между Cys355 и Lys424 (Lys175 в NemR) если и происходит в структуре Hupocrates, то не является необходимым условием для флуоресцентного ответа. Возможно, что галогенированный Cys355 в Hupocrates подвергается гидролизу с образованием сульфеновой кислоты и этого достаточно для изменений в микроокружении хромофора srYFP, что и приводит к изменению спектральных свойств. В дальнейшем мы использовали HupocrateCS в качестве контрольной версии биосенсора. Мы убедились, что Hupocrates и HupocrateCS демонстрируют высокую степень сходства по чувствительности к изменениям pH (рис. 57).

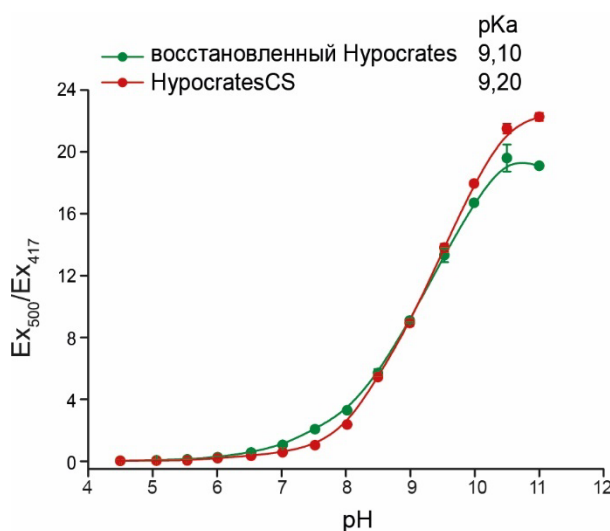


Рисунок 57. Сравнение чувствительности восстановленного Нурократеса и его контрольной версии НурократесСS к изменению pH среды. Концентрация белка в пробе 0,5 мкМ. Представлены средние значения, планки погрешностей обозначают стандартное отклонение среднего, $N \geq 3$.

3.1.2.4. Пространственная структура НурократесСS

Для лучшего понимания механизма функционирования биосенсора Нурократес мы совместно с коллегами из лаборатории под руководством Joris Messens (Бельгия) попытались расшифровать его пространственную структуру. Мы полагаем, что результаты данной работы также будут полезны для дальнейшей оптимизации биосенсора, например, для получения версий с увеличенной амплитудой ответа или помогут выявить особенности структуры, определяющие чувствительность к pH и ONOO⁻.

Мы планировали получить кристаллы для рентгеноструктурного анализа для обеих форм Нурократес (окисленной и восстановленной), а также контрольной версии НурократесСS. Однако лишь НурократесСS 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 Å). Структура НурократесСS (**рис. 58А**) была разрешена с применением подхода молекулярной замены на основе структуры NemR^{C106} (PDB ID:4YZE) и биосенсора Case16 (PDB ID: 3O77) для регистрации Ca²⁺, основанного на том же флуоресцентном ядре cpYFP. При наложении структур исходного белка NemR^{C106} и NemR^{C106S} в составе НурократесСS мы выявили выраженное сходство их пространственных организаций со среднеквадратичным отклонением 0.506 Å для 159 атомов (**рис. 58Б**). Таким образом, интеграция cpYFP оказала минимальный эффект на структуру NemR^{C106} в составе биосенсора Нурократес.

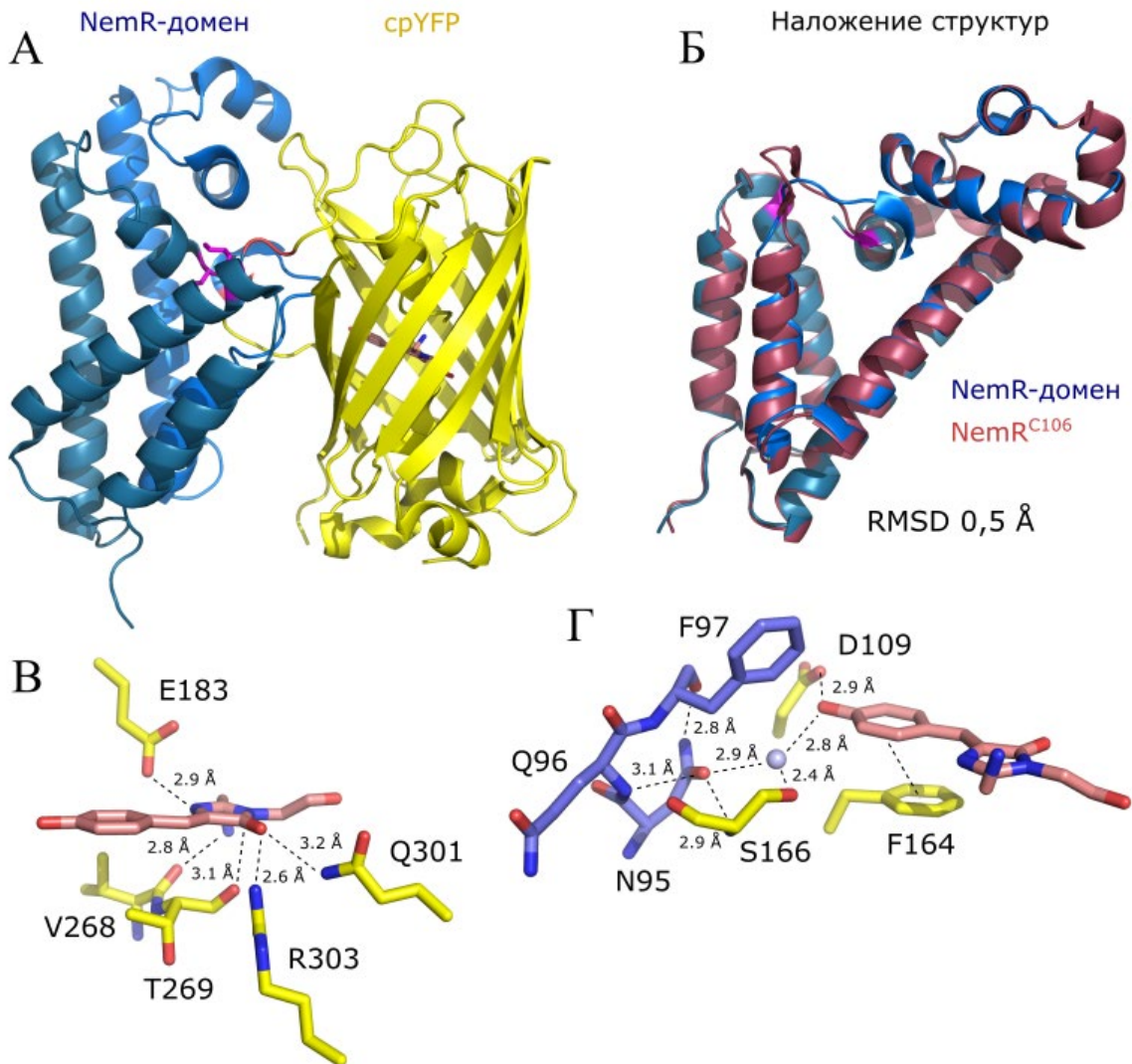


Рисунок 58. Пространственная структура HygrocratesCS. (А) Вид общей структуры HygrocratesCS. Синим цветом отмечена сенсорная часть NemR, в структуре которой розовым отмечены ключевые остатки Ser355 и Lys424; желтым – флуоресцентный домен cpYFP; красным – линкерные части между NemR и cpYFP. (Б) Наложение структуры NemR^{S106} из HygrocratesCS и NemR^{C106} (PDB ID: 4YZE), демонстрирующее высокую степень сходства. RMSD обозначает среднеквадратичное отклонение. (В) Окружение хромофора (розовым) HygrocratesCS. (Г) Сопряжение остатков подвижной петли NemR (синие) с остатками хромофорного окружения cpYFP (желтые). Скоординированная молекула H₂O обозначена голубым шариком.

Хромофор HygrocratesCS находится в цис-конфигурации и состоит из имидазолинового кольца и 4-гидроксibenзильной группы, которая стабилизирована образованием π - π стекинг-взаимодействий с Phe164, расположенном на расстоянии 3.9 Å. Имидазолиновое кольцо также стабилизировано несколькими аминокислотными остатками окружения (рис. 58В). 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. 58Г**). Возможно, окисление Нурocrates приводит к конформационным перестройкам как раз с участием Asn95, расположенном 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.

3.1.2.5. Биосенсор Нурocrates в клетках эукариот

Перед тем, как приступить к тестированию полученного биосенсора Нурocrates в эукариотических клетках, мы проверили *in vitro*, позволяет ли данный инструмент визуализировать НОСІ при тех количествах и динамике, которые может обеспечить фермент миелопероксидаза. Для проверки было достаточно собрать систему, содержащую биосенсор и миелопероксидазу. При добавлении H_2O_2 и при наличии в системе достаточного количества Cl^- мы наблюдали постепенное увеличение флуоресцентного сигнала Нурocrates, в течение 10 мин сигнал достигал максимального изменения в 1,8 раз (**рис. 59**). Это означает, что Нурocrates может отражать плавный прирост НОСІ в системе, начиная с первых моментов после активации фермента. На графике из **рисунка 59А** отчетливо видно, что характер ответа Нурocrates не является линейным. Примерно через 7 минут с момента запуска реакции отмечается увеличение скорости изменения сигнала Нурocrates. Как мы обсуждали ранее, судя по всему, Нурocrates имеет дополнительные мишени для НОСІ в структуре. Можно предположить, что на начальном этапе скорость развития ответа биосенсора снижена, поскольку постепенно образующаяся НОСІ модифицирует белок по нескольким сайтам, которые по мере реакции вытитровываются, и приоритетной остается целевая реакция. Однако это лишь наша гипотеза, причем при условии, что работа самой миелопероксидазы в течение регистрируемого времени остается стабильной. Данные предположения нам еще предстоит доказать экспериментально в будущем. Но на этом этапе мы показали, что Нурocrates способен не только реагировать на разовые добавки АФГ, но и визуализировать работу миелопероксидазы.

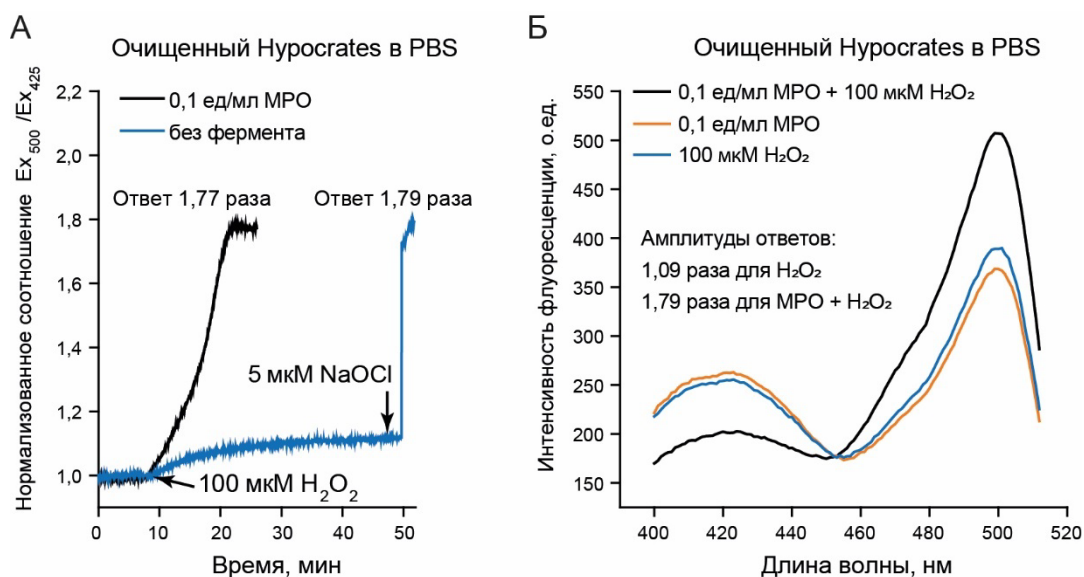


Рисунок 59. Биосенсор Hupocrates в системе *in vitro* с рабочей миелопероксидазой (МРО). (А) Временная динамика сигнала Hupocrates в пробе, содержащей миелопероксидазу и H_2O_2 , а также в пробе с присутствием только H_2O_2 . $HOCl$ образуется в результате работы миелопероксидазы, что приводит к изменению сигнала биосенсора. Инкубация биосенсора с H_2O_2 в тех же условиях приводит лишь к небольшим изменениям сигнала. Важно отметить, что концентрация H_2O_2 является избыточной и не достигает таких значений в биологических условиях. Концентрация Hupocrates в пробе 0,5 мкМ. (Б) Спектры возбуждения флуоресценции Hupocrates (0,5 мкМ в пробе) в присутствии отдельно миелопероксидазы, H_2O_2 и совместно миелопероксидазы+ H_2O_2 . Каждую пробу инкубировали в течение 5 мин.

Далее мы экспрессировали ген Hupocrates в клетках линии HeLa Kyoto, на следующие сутки после трансфекции визуализировали выраженный и равномерно распределенный по клеткам сигнал с помощью флуоресцентной микроскопии. При добавлении в клеточную среду $NaOCl$ биосенсор в клетках демонстрировал радиометрическое изменение Ex_{500}/Ex_{425} с максимальной амплитудой в 1,8 раз (**рис. 60А**). Поскольку АФГ взаимодействуют со многими мишенями, важно учитывать не абсолютную концентрацию $HOCl$ в среде, а считать на количество клеток. Таким образом, минимальная концентрация $HOCl$, которая вызывает максимальное изменение сигнала Hupocrates в клетках HeLa Kyoto, в наших условиях составила $17 \text{ нмоль}/10^5$ клеток. При увеличении концентрации $HOCl$ клетки демонстрировали выгорание флуоресцентного сигнала. Минимально детектируемые изменения сигнала мы наблюдали при $4 \text{ нмоль}/10^5$ клеток (**рис. 60Б**). Важно отметить, что в клетках HeLa Kyoto Hupocrates демонстрирует обратимый ответ (**рис. 60А**), т.е. биосенсор способен восстанавливаться антиоксидантными системами.

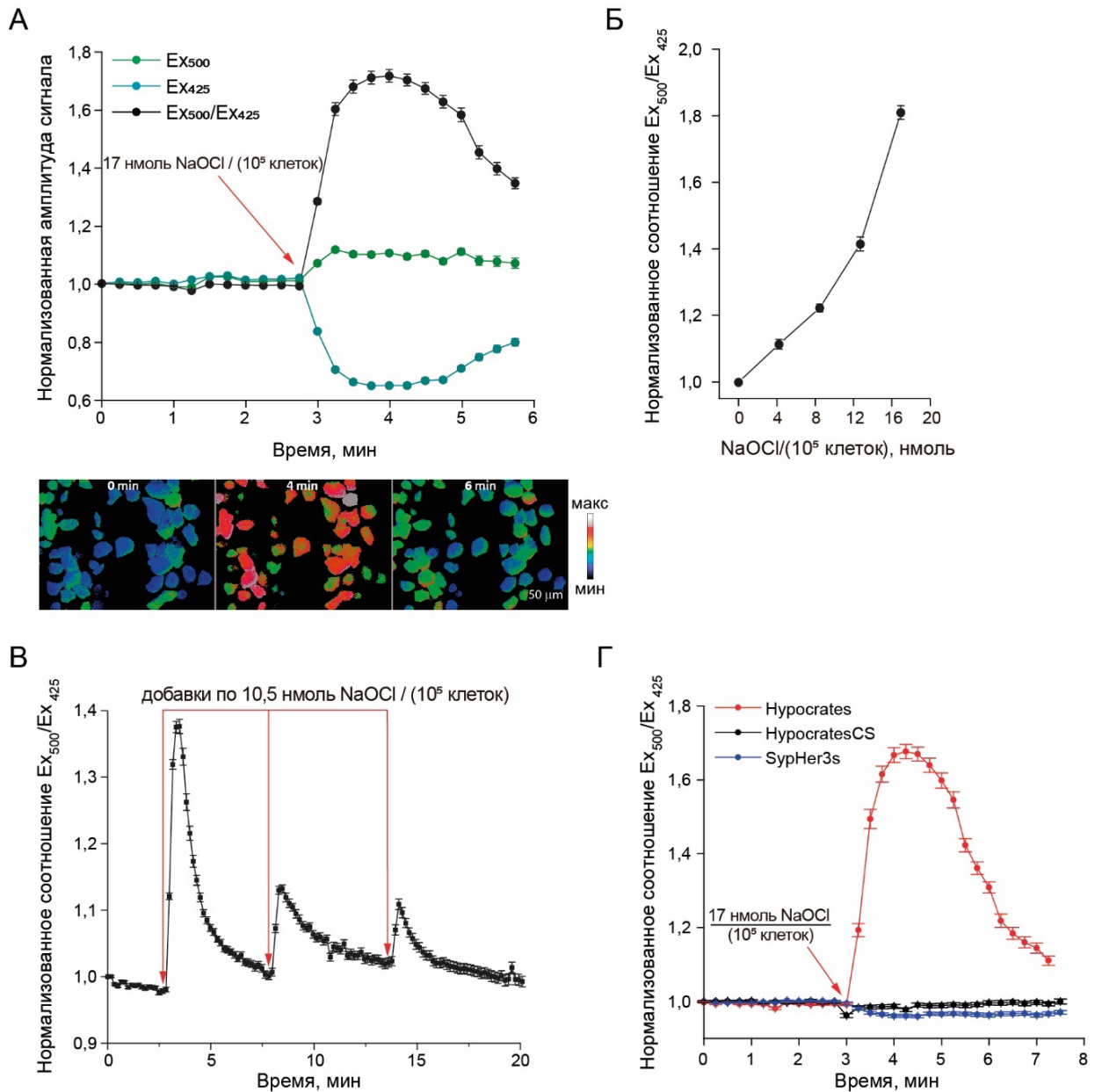


Рисунок 60. Биосенсор Нурократес в эукариотических клетках линии HeLa Kyoto.

(А) Динамика сигнала Нурократес 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 Нурократес, подвергнутых воздействию NaOCl 17 нмоль/ 10^5 клеток. Представлены разные временные точки, которые совпадают со значениями на графиках выше. Псевдоцвета соответствуют значениям сигнала Нурократес: от минимального синего до максимальных красных оттенков. Линейка масштаба 50 мкм. (Б) График кривой титрования Нурократес в клетках HeLa Kyoto при разных концентрациях NaOCl. (В) Обратимое изменение сигнала Нурократес в клетках HeLa Kyoto при повторных добавках NaOCl в концентрации 10,5 нмоль/ 10^5 клеток. (Г) Динамика сигнала биосенсоров Нурократес, контрольной версии НурократесCS и СурНер3s 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.

Мы провели серию нескольких раундов окисления/восстановления, добавляя новую порцию NaOCl в среду после каждого последующего восстановления. При каждой добавке Hupocrates демонстрировал быстрый ответ хоть и с меньшей амплитудой при каждой последующей, что вероятно связано с окислительным повреждением как клеток, так и биосенсора (**рис. 60В**). Мы также провели параллельную серию экспериментов с инактивированной версией HupocratesCS и pH-биосенсором SypHer3s. В аналогичных условиях при максимально возможной концентрации NaOCl мы показали, что в клетках HeLa Kyoto гипогалогенный стресс не вызывает изменений pH в цитозоле. HupocratesCS в этих же условиях также не демонстрировал даже минимальных изменений сигнала (**рис. 60Г**).

Описываемая нами клеточная модель была реализована с экзогенным источником HOCl. Важно проверить, способен ли Hupocrates отражать динамику гипогалогенных кислот, образуемых в клетках эндогенно. Для этой задачи мы выбрали нейтрофилы – клетки с высоким уровнем содержания миелопероксидазы. Клетки получали из крови здоровых добровольцев. К свежевыделенным нейтрофилам мы добавляли суспензию клеток *E.coli*, экспрессирующих ген Hupocrates и предварительно подвергнутых опсонизации человеческой сывороткой. С помощью микроскопа мы визуализировали активный фагоцитоз нейтрофилами, при этом каждая фагоцитируемая бактерия демонстрировала выраженное изменение сигнала Hupocrates (**рис. 61**). Свободные бактерии, которые не были поглощены лейкоцитами, никак не изменяли флуоресцентного сигнала. Для версии HupocratesCS 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 HupocratesCS и ~ в 3,1 раза для Hupocrates. 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 pH изменяется. Причем pH повышается именно в первые несколько минут после интернализации [765,766]. Таким образом, биосенсор Hupocrates с применением контрольной версии HupocratesCS может быть использован в качестве надежного инструмента для визуализации динамики продуктов гипогалогенного стресса в клетках в режиме реального времени.

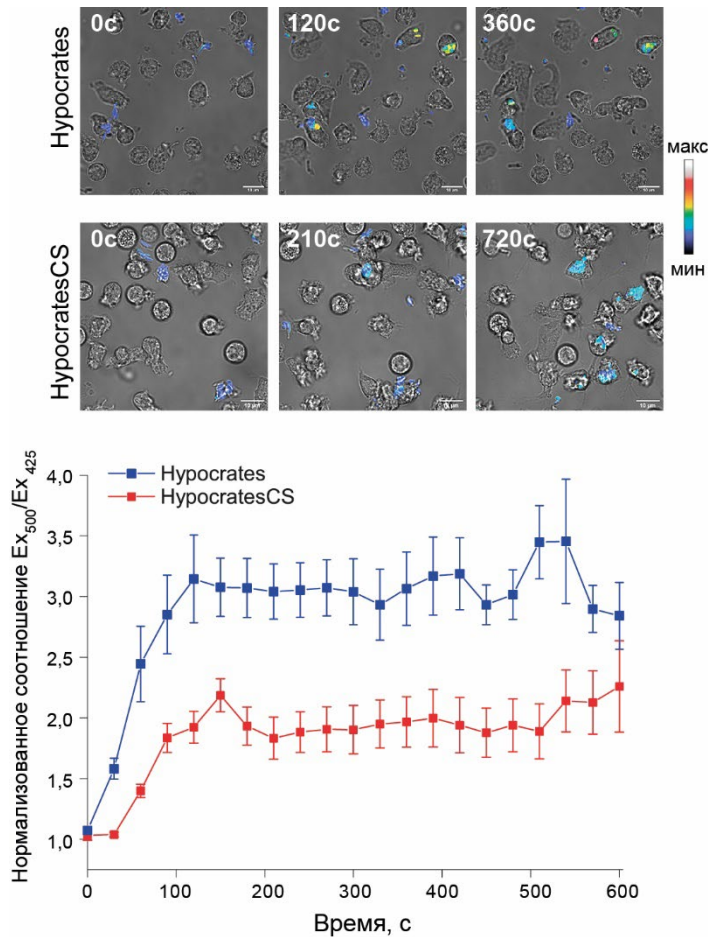


Рисунок 61. Динамика биосенсора Hypocrates в клетках *E.coli*, фагоцитируемых нейтрофилами человека. Сверху изображены человеческие нейтрофилы, фагоцитирующие клетки *E.coli* с экспрессией гена *Hypocrates* или контрольной версии *HypocratesCS*. Псевдоцвета соответствуют значениям сигнала *Hypocrates*: 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 отдельных бактерий. На графике указаны средние значения, планки погрешностей обозначают стандартное отклонение среднего, $N = 3$ при анализе 35 клеток.

3.2. 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. Яркими примерами являются рассматриваемые в данной работе многочисленные реакции с участием редокс-активных соединений, которые очень быстро образуются и также быстро реагируют со своим ближайшим внутриклеточным окружением. Мы сосредоточились на изучении воздействия на ткани модельных организмов (рыбы, грызуны) гипоксии и воспалительных процессов – на примерах острых состояний, при которых наблюдаются наиболее быстрые ответы живых систем на молекулярном и физиологическом уровнях.

O₂ играет ключевую роль в метаболизме аэробных организмов, прежде всего поддерживая энергетический баланс клеток, поскольку выступает конечным акцептором электронов в дыхательной цепи митохондрий. Снижение доступа O₂ к органам и тканям связано с развитием многих хронических заболеваний человека [767], однако острая гипоксия и тем более аноксия мгновенно запускают патологические процессы в клетках, что приводит к нарушению их функций и гибели. Такие процессы лежат в основе патогенеза ишемического инсульта головного мозга и почек, инфаркта миокарда – одних из самых опасных и при этом распространенных по всему миру заболеваний.

Несмотря на то, что уже известны многие особенности биохимических процессов в клетках, вызванных условиями гипоксии, по-прежнему в патогенезе перечисленных заболеваний 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? Если говорить об ишемическом инсульте головного мозга, то в мировом научном сообществе давно устоялась концепция о ключевой роли АФК в качестве повреждающего фактора на ранних этапах патогенеза, роль основных внутриклеточных генераторов АФК при ишемии отведена NADPH-оксидазам и электрон транспортной цепи митохондрий [86,768]. При этом не достигнут консенсус о том, какая из систем все же вносит наибольший вклад в развитие окислительного стресса при инсульте. В связи с этим, представлено сразу несколько терапевтических мишеней, среди которых различные представители NADPH-оксидаз, в частности, NOX1 [769], NOX2 [770–773], NOX4 [774,775], NOX5 [776], разные комплексы дыхательной цепи митохондрий [86,777]. При этом реальная динамика представителей АФК никогда не была измерена напрямую в тканях мозга *in vivo* при развитии ишемического инсульта. Все предположения были выдвинуты на основании обнаруженных маркеров окислительных повреждений внутриклеточных структур и характерных метаболических отклонений. Благодаря генетически кодируемым биосенсорам, которые стремительно пополняют мировую коллекцию новыми версиями, задача отслеживать динамику редокс-активных компонентов в тканях при развитии патологии становится посильной. Мы разработали подход на основе оптоволоконного интерфейса и генетически кодируемых флуоресцентных биосенсоров, которые позволяют регистрировать динамику интересующего процесса в тканях мозга лабораторных грызунов *in vivo* с первых секунд развития ишемического повреждения.

3.2.1. Разработка систем для исследования динамики биохимических параметров в условиях гипоксии/ишемии

Возможно, данный раздел более уместно разместить в Главе 2 «Материалы и методы», но, с другой стороны, создание описываемых здесь исследовательских платформ является результатом продолжительной работы, поэтому кажется логичным привести это описание именно здесь, тем более что данная техническая часть лежит в основе всех последующих результатов в рамках представленной диссертации.

3.2.1.1. Разработка установки для моделирования условий гипоксии/реоксигенации в культурах клеток и тканях рыб *Danio rerio*

Перед тем как приступить к исследованиям динамики некоторых биохимических параметров *in vivo* на модели ишемического инсульта у крыс, мы провели серию экспериментов в культуре нейронов. Мы преследовали две цели: 1) провести тестирование в условиях гипоксии/реоксигенации выбранных нами биосенсоров и 2) провести сравнение данных в культуре клеток *in vitro* и в тканях животных *in vivo*. В дальнейшем созданная нами экспериментальная установка по моделированию условий гипоксии/реоксигенации была использована и для других типов клеток, а также была адаптирована для работы с объектом рыбой *Danio rerio*.

Созданная нами система обеспечивает быстрое и при этом точное изменение уровня O_2 в среде, в котором находится объект исследования: клетки или эмбрионы рыб *D.rerio*. Объект помещается в чашку для микроскопии, что позволяет визуализировать динамику флуоресцентного сигнала при изменении O_2 в режиме реального времени. Изначально мы использовали систему моделирования гипоксии, принцип которой основывался на подаче в камеру инертного газа, вытесняющего O_2 . Однако этот процесс происходил медленно, поскольку ограничен установлением равновесия между фазами жидкости и газа. Кроме того, было затруднительно определить точную концентрацию O_2 в ближайшем окружении исследуемого объекта. Поэтому мы разработали перфузионную систему. Живые объекты мы помещали в чашку для микроскопии, расположенной в инкубаторе (Miniature Incubator TC-MWP, Bioscience Tools). Рядом устанавливали два объемных (1 л) резервуара, один из которых содержал привычную среду для клеток или воду для эмбрионов *D.rerio*, насыщенные O_2 , чего добивались пропусканием через раствор газовой смеси 95% воздух / 5% CO_2 . В другом сосуде с таким же составом мы пропускали газовую смесь 95% N_2 / 5% CO_2 , таким образом, избавляясь от O_2 . Газовые смеси получали с помощью контроллеров CO_2-O_2 -MI, Bioscience Tools и CO_2 Tokai Hit. Два типа жидкостей, насыщенную O_2 и

деоксигенированную, посредством перистальтических насосов подавали в камеру с исследуемым объектом через трубки Tygon, которые не пропускают O_2 . Одновременно с подачей жидкости в камеру подавалась атмосфера, соответствующая условиям гипоксии (95% N_2 / 5% CO_2) или нормоксии (95% воздух / 5% CO_2). Важно контролировать уровень O_2 непосредственно в среде, окружающей клетки или эмбрионы рыб. Для этой цели мы использовали мультиканальный оксиметр Multi-Channel Oxygen Meter OXY-4 SMA (G3), PreSens Precision Sensing GmbH, к которому через оптические волокна подключали сенсоры O_2 FTC-PSi3. Для сбора данных использовали программное обеспечение PreSens Measurement Studio 2. Такие датчики нами были установлены в обоих резервуарах с подаваемыми в камеру жидкостями, а также в самой перфузионной камере на входной и выводной трубках. Таким образом, мы точно контролировали O_2 в жидкой среде на всех этапах ее прохождения через систему. Схема установки представлена на **рисунке 62**. Представленная 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.

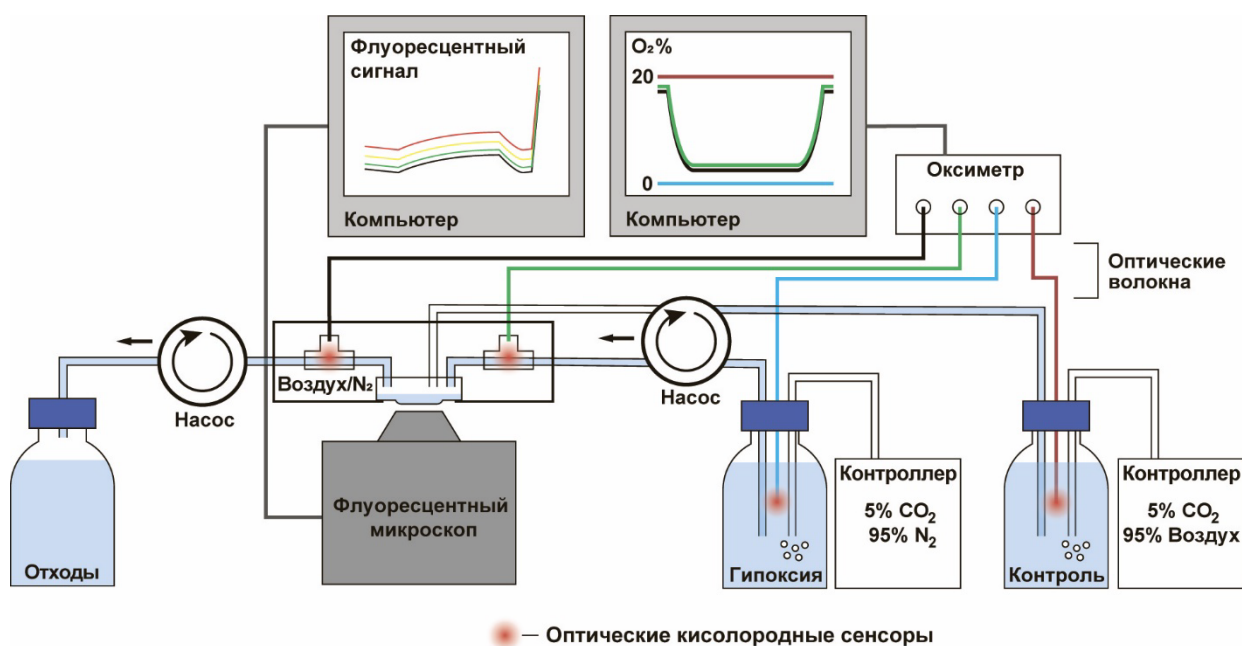


Рисунок 62. Схема установки для моделирования условий гипоксии/реоксигенации. При нормоксии раствор с высоким содержанием O_2 ($pO_2 \sim 150$ мм рт.ст., регистрируется кислородным датчиком и поддерживается газовым контроллером) подается через трубку в камеру, в которой находится чашка с исследуемым 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 выводной 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.

Проточную замкнутую систему для моделирования условий гипоксии, которую мы описали, можно установить на любой микроскоп, что в комбинации с генетически кодируемыми биосенсорами позволяет регистрировать отклик биохимических параметров на изменения уровня O_2 в режиме реального времени. Для тестирования полученной системы мы взяли культуру гиппокампальных нейронов, выделенных из эмбрионов мыши. В качестве биохимического параметра мы выбрали соотношение $NAD^+/NADH$, динамику которого измеряли с помощью биосенсора SoNar [641]. С точки зрения тестирования выбранный нами биохимический параметр наиболее удобен. Регистрацию NADH можно проводить с помощью оптических методов без использования специальных индикаторов, поскольку данная форма кофактора сама демонстрирует флуоресцентные свойства. Параметр $NAD^+/NADH$ довольно стабилен, поэтому его определением давно занимались в различных системах, в том числе в срезах органов и гомогенатах тканей. Большое количество экспериментальных данных демонстрирует увеличение количества NADH в клетках при ишемии [778,779]. Аналогичные результаты мы получили и с использованием нашей системы. При гипоксии сигнал биосенсора SoNar в гиппокампальных нейронах мыши демонстрировал постепенное увеличение NADH в цитозоле, достигая максимального значения ~ через 30 минут с момента начала гипоксии (рис. 63). Реоксигенация приводила к быстрому окислению и увеличению соотношения $NAD^+/NADH$ в клетках, примечательно что данный параметр не достигал первоначальных значений при заданных условиях. На внутриклеточное соотношение $NAD^+/NADH$ можно влиять изменением соотношения пируват/лактат в клеточной среде, что опосредовано через монокарбоксилатные транспортеры и активность лактатдегидрогеназы. Поэтому добавление к клеткам пирувата или лактата в системе приводило к мгновенному окислению или восстановлению пула NAD. При этом амплитуда изменений сигнала SoNar в этих условиях была сопоставима с наблюдаемыми нами изменениями, вызванными гипоксией и последующей реоксигенацией (рис. 63). Этим экспериментом мы проверили эффективность моделирования условий гипоксии собранной нами установки. В дальнейшем на этой установке мы работали не только с клеточными культурами, но и эмбрионами рыб *D.rerio*, фиксируя их в легкоплавкой агарозе на дне чашки для микроскопии и прогоняя через камеру воду с добавлением анестетика трикаина.

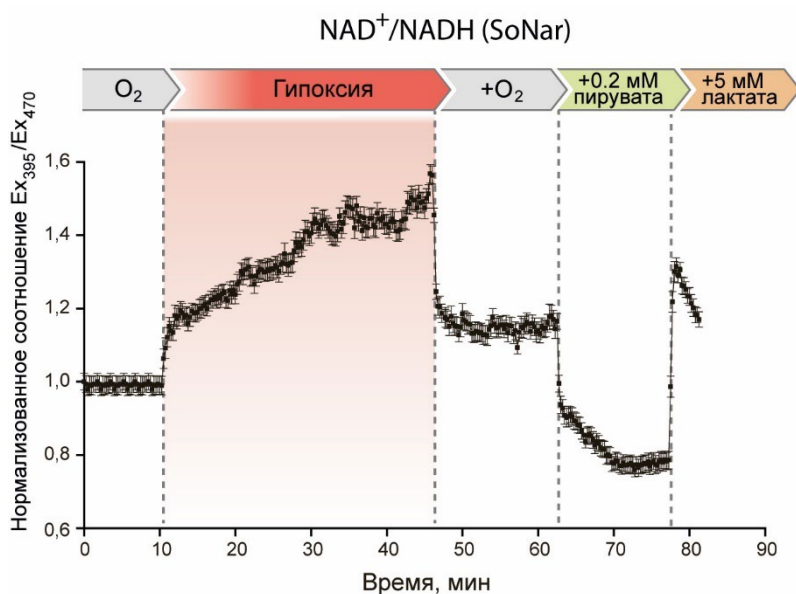


Рисунок 63. Динамика NAD⁺/NADH в культуре гиппокампальных нейронов мыши при гипоксии и реоксигенации. Представлена динамика нормализованного сигнала биосенсора SoNar (F_{395}/F_{470}) в клетках. Более высокий сигнал SoNar соответствует более восстановленному пулу NAD и наоборот. Указаны средние значения, планки погрешностей обозначают стандартное отклонение среднего, $N = 2$, суммарно в анализе 21 нейрон.

3.2.1.2. Разработка платформы для исследований биохимических процессов в тканях мозга лабораторных грызунов с помощью оптоволоконного интерфейса и биосенсоров

Динамика исследуемого биохимического процесса в тканях организма *in vivo* может существенно отличаться от событий в культуре клеток той же ткани. Многие процессы в норме и патологии формируют сложную сеть различных взаимодействий, вовлекая разные типы тканей и клеток. Например, при исследовании воздействия гипоксии на определенный тип клеток в культуре можно определить их базовый ответ на недостаток O₂, однако *in vitro* сложно воспроизвести уровень оксигенации, свойственный данному типу клеток в условиях ткани *in vivo*, как, впрочем, и эффекты взаимодействия с ними других типов клеток. В большинстве лабораториях клетки культивируют по стандартным протоколам в среде с атмосферным уровнем O₂, что, важно признать, значительно отличается от физиологических условий в тканях. Сегодня все чаще поднимают вопрос о том, насколько данные, полученные при таких условиях в культуре клеток, могут отражать реальную картину процессов в организме. Все больше появляется подходов к воспроизведению физиологических уровней O₂ в моделях *in vitro* [780]. Но важно учитывать не только актуальный диапазон O₂ для конкретного типа клеток, но и тот факт, что при недостатке O₂ органы отвечают как на клеточном, так и физиологическом уровнях, что сложно или в большинстве случаев вовсе невозможно воспроизвести на клеточных моделях.

Описанная в предыдущем подразделе созданная нами установка по моделированию условий гипоксии позволяет работать *in vivo* с небольшими лабораторными животными, как, например, рыба *Danio rerio*, что является важным преимуществом и может быть

использовано для поиска биологических эффектов или при разработке терапевтических подходов. Но как полученные сведения проверять на более близких к человеку организмах, например, лабораторных млекопитающих? На следующем этапе нашей работы мы приступили к разработке подхода регистрации биохимических процессов при гипоксии в тканях млекопитающих *in vivo*, выбрав модель ишемического инсульта головного мозга у крыс.

Для регистрации флуоресцентного сигнала биосенсоров в тканях живой крысы в лаборатории фотоники и нелинейной спектроскопии МГУ им. М.В. Ломоносова под руководством Желтикова А.М. была создана платформа волоконных интерфейсов для длительных измерений в глубоких слоях тканей мозга. Конструкция представленной установки основывается на идеях и подходах, которые были реализованы ранее в области волоконно-оптических интерфейсов [781–784]. Однако поставленная нами цель регистрации быстроизменяющегося флуоресцентного сигнала в определенных координатах мозга в режиме реального времени развития ишемического повреждения потребовала новых технических решений. Во-первых, сигнал необходимо регистрировать одновременно в нескольких координатах мозга, что позволит, например, сравнивать динамику интересующих процессов в ишемизированном и здоровом полушариях. Во-вторых, в данном исследовании мы применяли радиометрические биосенсоры на основе *срYFP*, это означает, что по каждой координате мозга необходимо было наладить два независимых флуоресцентных канала, в которых происходит возбуждение и детекция флуоресценции.

Для возбуждения флуоресценции биосенсоров на основе ядра *срYFP* в системе использовали LED диоды с подходящими длинами волн 405 и 490 нм (M405F1 и M490F, Thorlabs). Свет подавали по оптоволоконным кабелям и коллимировали с помощью оптоволоконных коллиматоров с фокусным расстоянием 10,9 мм (Thorlabs, F220SMA-A). Для спектрального разделения излучения использовали полосовой фильтр ET480/20 (Chroma) и коротковолновой FESH450 (Thorlabs). Комбинированный луч фокусировался в сегмент оптического волокна длиной ~ 1,5 м (FG105UCA, Thorlabs) с помощью линзы с фокусным расстоянием 150 мм и объектива микроскопа (10x, Olympus). Волокно было пропущено через фуркационную трубку. В ходе эксперимента эти сегменты волокна подключались к волоконным зондам, предварительно имплантированным по заданным координатам в мозг крысы, таким образом, в ткани мозга доставлялся свет, возбуждающий флуоресценцию биосенсоров по двум каналам $E_{\lambda 405}$ и $E_{\lambda 490}$. Одно из волокон было подключено к эталонному флуоресцентному источнику (Ref), чтобы компенсировать помехи при юстировке системы. Флуоресцентный сигнал от биосенсоров доставлялся на

детектор (CCD камера, 4070C-GE-TE, Thorlabs) по этому же оптоволоконному пути. Встречаемое от ткани излучение проходило через дополнительный полосовой фильтр FELH0500 (Thorlabs) или в другой модификации установки 525/50 (Chroma). Чтобы избежать неправильной интерпретации сигнала биосенсора и отличать его от автофлуоресценции ткани, использовали самодельный спектрометр.

Мы использовали многомодовые оптические волокна со стеклянной облицовкой с соотношением диаметров сердцевина/оболочка 105 мкм/125 мкм (FG105UCA, Thorlabs). Для подсоединения имплантируемых в мозг животного волокон с волокнами, которые ведут в оптическую установку, использовали адаптер, в качестве которого хорошо подходил керамический наконечник для LC разъемов, используемый в телекоммуникациях. Внутри адаптера волокно приклеивалось с помощью оптического клея, затвердевающего при обработке ультрафиолетом (NOA61, Thorlabs). Выступающий из адаптера кончик волокна скалывали до нужной длины. Керамический наконечник полировали вручную. Чтобы кончики двух волокон находились в одной фокальной плоскости, волокна сначала склеивали тем же клеем NOA61, а затем скалывали. Имплантируемое в мозг животного волокно подготавливалось схожим образом, один из концов был приклеен аналогичным образом к керамическому адаптеру со стандартным LC разъемом. Длина выступающего из адаптера кончика волокна зависела от глубины выбранной области мозга крысы, в которую необходимо было попасть имплантируемым волокном. Для получения нужной длины использовали специальный скалыватель (Thorlabs, XL411) с точностью 20 мкм. Перед имплантацией качество каждого волокна по передаче сигнала проверяли с помощью измерителя мощности PM100D с датчиком мощности S120VC (Thorlabs). При сопоставлении разъемов керамических адаптеров оптический путь имплантируемого волокна и кабеля, ведущего в систему, замыкался, что и позволяло регистрировать флуоресцентный сигнал в тканях мозга животного.

В наших исследованиях 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. Этот подход признан «золотым стандартом» в моделировании ишемии головного мозга и подробно описан во многих работах [716]. Примерно за месяц до эксперимента животным инъецировали в ткань мозга суспензию AAV вирусных частиц (не более 1 мкл), 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. 64). 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.

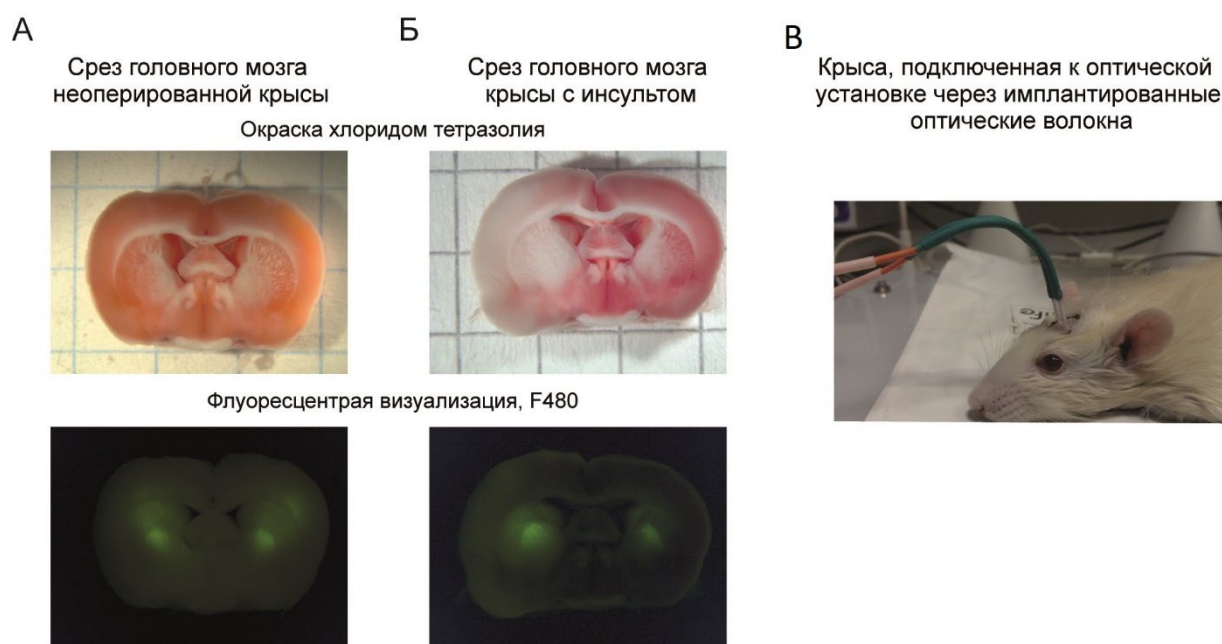


Рисунок 64. Регистрация флуоресцентного сигнала биосенсора в тканях мозга крыс с помощью оптоволоконного интерфейса. Представлены срезы мозга (А) ложнооперированной крысы (выполнены все хирургические манипуляции за исключением окклюзии средней мозговой артерии) и (Б) крысы с ишемическим инсультом через 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 оптическим кабелями, ведущими в установку для измерения флуоресцентного сигнала.

Динамика флуоресцентного сигнала биосенсора с временным разрешением (от 300 мс в острой фазе событий до 5 мин) записывалась с помощью CCD камеры, стробоскопический сигнал которой считывался с помощью многофункционального устройства ввода-вывода I/O (плата ввода-вывода, NI USB-6356) для управления режимом

работы LED. Таким образом, камера синхронизирована с работой LED. Светодиодные источники включались по очереди в импульсном режиме, частота следования импульсов составляла 111 Гц. Для каждой координаты мозга крысы, куда были имплантированы оптические волокна, в каждой временной точке получали по три кадра, два из которых соответствовали флуоресцентному сигналу биосенсора на основе *srYFP* при соответствующем возбуждении (405 нм и 490 нм), а третий позволял записывать фоновый сигнал ткани для последующего анализа данных. Для предотвращения фотообесцвечивания биосенсоров в течение длительной регистрации сигнала (более 2 часов) средняя мощность светодиодов поддерживалась на уровне не более 1 мкВт. На **рисунке 65** представлена схема установки.

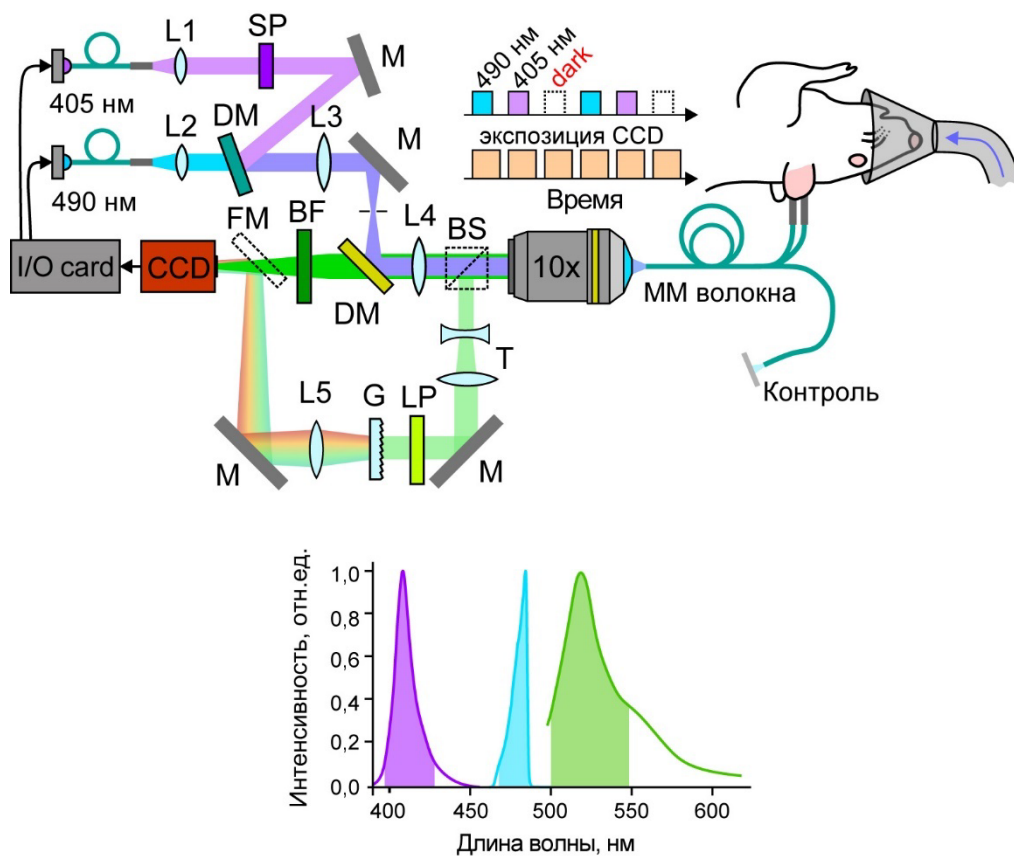


Рисунок 65. Схема оптоволоконной оптической установки для регистрации ратиометрического флуоресцентного сигнала биосенсора в тканях мозга крысы *in vivo* по двум координатам. Обозначения: *M* (dielectric mirrors) – диэлектрические зеркала; *DM* (dichroic mirrors) – дихроичные зеркала; *I/O card* – многофункциональное 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*.

Таким образом, созданная оптическая система позволяет проводить регистрацию временной динамики флуоресцентного радиометрического сигнала биосенсора на основе *cpYFP* в тканях мозга животного одновременно по нескольким координатам непосредственно в процессе развития патологического состояния.

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

При ишемии ткани испытывают развитие ацидоза [785–787]. В условиях недостатка O_2 клетки переключаются с окислительного фосфорилирования преимущественно на анаэробный гликолиз, это сопровождается накоплением лактата, также накапливается H^+ в результате гидролиза АТФ [788]. Изменения этих биохимических параметров неоднократно подтверждались экспериментальными данными [789,790]. В настоящей работе мы исследовали динамику внутриклеточного рН в центральной области инсульта головного мозга крыс при окклюзии средней мозговой артерии в режиме реального времени с помощью рН-биосенсора *SypHer3s* [566], флуоресцентный сигнал которого регистрировали *in vivo* через имплантированные в мозг оптические волокна, подключаемые к созданной оптической схеме. Отчасти, мы выбрали параметр рН и потому, что ожидали значительных его изменений при ишемии, что представляло для нас интерес при тестировании работы экспериментальной установки.

Прежде, чем приступить к экспериментам *in vivo* на животной модели патогенеза, мы исследовали, как изменятся рН в цитозоле и матриксе митохондрий гиппокампаальных 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, представленной в разделе 3.2.1.1. При резком снижении O_2 в среде с первых же секунд мы наблюдали в клетках развитие ацидоза, который затрагивал оба исследуемых компартмента. Примерно через 5 минут с момента наступления гипоксии все клетки демонстрировали максимальное изменение сигнала *SypHer3s*. Общая продолжительность гипоксии для клеток составляла 35 минут, мы подбирали этот временной период экспериментально. Важно было не допустить гибели клеток, но при этом подобрать наиболее сильное стресс-воздействие. Примечательно, что при одинаковых условиях в цитозоле *SypHer3s* демонстрировал гораздо больший диапазон ответа по сравнению с сигналом биосенсора, локализованном в митохондриальном матриксе (рис.

66). При восстановлении уровня O_2 к норме мы наблюдали возвращение сигнала SypHer3s к исходным значениям в обоих компартментах примерно за 5 минут.

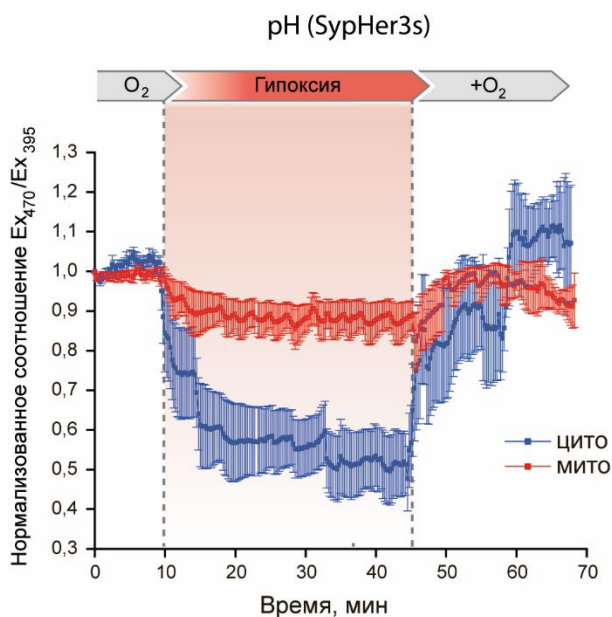


Рисунок 66. Динамика pH в культуре гиппокампальных нейронов в условиях гипоксии/реоксигенации. Сигнал SypHer3s (F_{470}/F_{395}) нормализован и усреднен суммарно по 184 нейронам с локализацией в цитозоле и 94 нейронам с локализацией в митохондриях. Планки погрешностей обозначают стандартное отклонение среднего, проведено не менее 6 независимых экспериментов для каждой локализации. Снижение флуоресцентного сигнала соответствует снижению pH.

Учитывая, что в клеточной модели гипоксии наиболее выраженные изменения мы обнаружили в цитозоле, в исследованиях *in vivo* мы сосредоточились на этом же компартменте. Крысам линии SHR в структуру хвостатое ядро обоих полушарий мы инъецировали суспензию вирусных частиц AVV, несущих ген биосенсора SypHer3s под нейрональным промотором hSyn1. В эти же координаты мозга для последующего считывания флуоресцентного сигнала биосенсора нами были имплантированы оптические волокна, как описано в разделе 3.2.1.2. Через 3-4 недели, когда в тканях мозга появлялся выраженный сигнал биосенсора, животных подвергали хирургическим манипуляциям для моделирования ишемического инсульта головного мозга путем окклюзии средней мозговой артерии. Мы регистрировали сигнал SypHer3s в тканях мозга обоих полушарий на протяжении всей хирургической операции, в течение ишемии продолжительностью 60 минут, а также в течение последующих 60 минут реперфузии (извлекали окклюдер и восстанавливали кровоток). После первых нескольких секунд с момента перекрытия артерии в нейронах области хвостатого ядра происходило резкое снижение сигнала SypHer3s.

Сигнал SypHer3s можно откалибровать в системе *in vitro* и перевести его значения в конкретные величины pH в исследуемой системе. Чтобы установить, насколько сильные изменения pH происходят в нейронах центральной зоны ишемического инсульта, мы получили очищенный белковый препарат SypHer3s. Далее белок переводили в буферные растворы с разными значениями pH. Стандартный буферный ряд находился в диапазоне pH

5,0 – 11,0 с шагом 0,5. С помощью этой же оптической установки мы измеряли сигнал биосенсора в каждой такой пробе. Для этого волокно опускали в раствор с белком (0,5 мкМ) при заданном значении рН и регистрировали флуоресценцию. В результате была построена кривая зависимости сигнала SypHer3s от значений рН (**рис. 67А**). Это позволило нам определить, что в центральной зоне инсульта головного мозга у крыс внутриклеточное значение рН 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. 67В**). На протяжении всего периода ишемии рН остается пониженным, повышаясь не более чем на $\sim 0,1$ единицу от минимальных значений, достигнутых в первые минуты острой фазы. При реперфузии мы наблюдали тенденцию медленного восстановления рН. Непосредственно в момент реперфузии у некоторых животных наблюдался небольшой, но резкий скачок рН в сторону повышения (в пределах 0,1-0,2 единиц). Всех животных после регистрации острой фазы инсульта (60 мин. ишемии + 60 мин. реперфузии) выводили из наркоза, помещали в клетку со свободным доступом к воде и пище. Мы также анализировали, как изменялось значение рН в цитозоле нейронов центральной области инсульта на следующие сутки. У некоторых животных рН возвращался к норме, однако были выявлены и те, у которых рН в клетках так и оставался пониженным (**рис. 67В**). По завершении эксперимента анализировали повреждение мозга животных, получая срезы тканей и прокрашивая их красителем 2,3,5-трифенилтетразолием хлористым.

Таким образом, ишемическое состояние тканей мозга сопровождается мощным и продолжительным внутриклеточным закислением. Мы не обнаружили выраженных изменений рН в контралатеральном здоровом полушарии, а также в тканях ложнооперированных животных, которым проводили все те же хирургические манипуляции за исключением окклюзии средней мозговой артерии (**рис. 67Б,Г**). В некоторых контрольных измерениях небольшое увеличение рН к моменту завершения операции, вероятнее всего, обусловлено индивидуальными особенностями животных в условиях длительного воздействия анестезии.

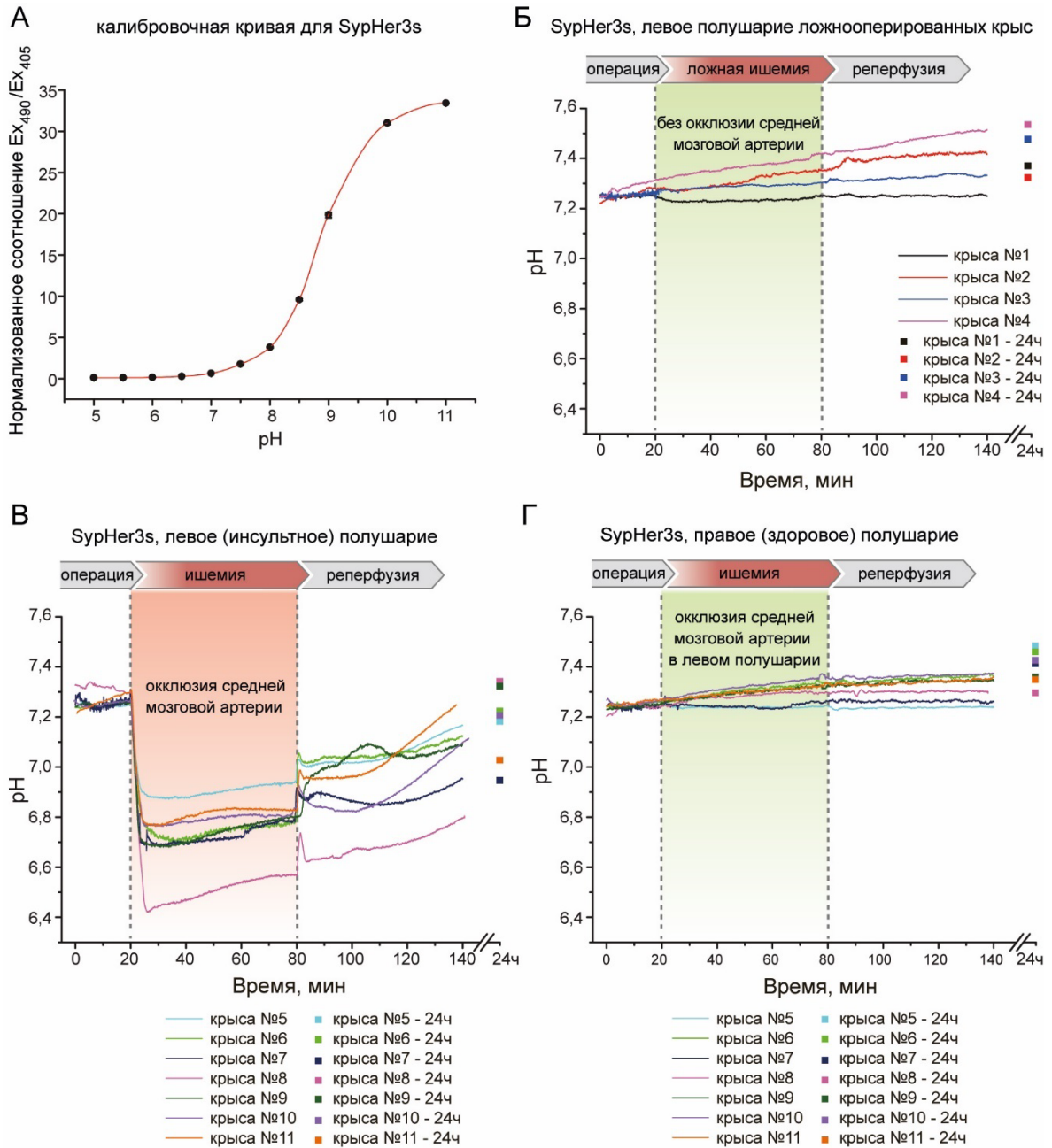


Рисунок 67. Динамика pH (по сигналу биосенсора *SypHer3s*) в тканях мозга крыс *in vivo* в острой фазе развития ишемического инсульта. **(А)** График зависимости флуоресцентного сигнала *SypHer3s* (F_{490}/F_{405}) от значения pH, график получен на очищенном препарате белка *SypHer3s* *in vitro*. Для 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 левосторонней средней мозговой 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 *SypHer3s* 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.

3.2.3. 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 [791]. Однако до сих пор ведутся дискуссии, в какой именно момент происходит образование АФК: на стадии гипоксии или при реоксигенации [792,793]. Напомним, что саму динамику АФК ранее никогда не визуализировали прямыми методами, их попросту не существовало.

Задача по исследованиям продукции и последующей динамики различных соединений с высокой реакционной способностью в живых системах стала выглядеть возможной с появлением генетически кодируемых флуоресцентных биосенсоров, стремительно приобретающих все бóльшую популярность. В 2006 году был разработан биосенсор *HyPer* [555] для визуализации динамики H_2O_2 – биологически значимого представителя АФК. Биосенсор *HyPer* приобрел мировую популярность и к этому времени был применен в сотнях различных моделей в клеточных культурах и *in vivo*. Несмотря на то, что в последующие годы появились улучшенные версии биосенсора *HyPer-2* [560] и *HyPer-3* [561], а также версия на основе красного белка *HyPer-Red* [563], ряд недостатков этих инструментов по-прежнему ограничивал их применение в некоторых сложных моделях. Выраженная чувствительность биосенсоров семейства *HyPer* к изменению рН в физиологическом диапазоне является главной сложностью при работе с моделями, которые характеризуются выраженными колебаниями рН. В таких системах зачастую сложно отличить изменения целевого сигнала, вызванного окислением биосенсора, от рН-опосредованной динамики. В моделях с использованием культур клеток отличить целевую динамику сигнала от прочих воздействий можно с помощью постановки соответствующих контролей. По этому принципу в предыдущей главе мы оценивали динамику гипогалогенного стресса в фагоцитируемых нейтрофилами бактериях с помощью биосенсора *Nurocrates* и его рН-контрольной версии *NurocratesCS*. Оценить вклад рН в изменение сигнала *HyPer* можно с помощью биосенсоров *SypHer* [565,566]. Биосенсоры *SypHer* отличаются от *HyPer* заменой ключевого остатка Cys, что предотвращает взаимодействие биосенсора с H_2O_2 , но при этом остальные свойства, в том числе рН-чувствительность, у *SypHer* схожи с *HyPer*. Таким образом, если получить усредненную динамику *HyPer* по нескольким клеткам, а потом сравнить ее с динамикой для *SypHer*, полученной в аналогичных условиях эксперимента, то можно вычислить динамику H_2O_2 . В клеточных моделях мы можем легко набирать данные по сотням и тысячам индивидуальных клеток, однако в экспериментах *in vivo*, особенно на моделях

млекопитающих, такой подход чаще не представляется возможным. Работа на млекопитающих всегда сложна и требует вложения значительных ресурсов. Кроме того, каждое животное демонстрирует индивидуальные пространственно-временные особенности биохимических реакций при развитии патологии. Даже развитие ацидоза ткани при ишемии у разных животных может иметь отличия, что и было нами показано (рис. 67). Оценить вклад компонент H_2O_2 и pH в сигнал биосенсоров типа HyPer в моделях *in vivo* в тканях млекопитающих всегда представлялось сложной задачей. Поэтому для исследований *in vivo* с применением этих и других подобных биосенсоров чаще выбирали модельные организмы, которые просты в манипуляциях и поэтому позволяли набирать большое количество данных, например, рыбы *D. rerio*, нематоды *C. elegans* и другие.

Идея регистрации динамики H_2O_2 в тканях лабораторных грызунов в режиме реального времени при развитии ишемического инсульта всегда выглядела перспективной с момента появления биосенсоров HyPer. На протяжении нескольких лет нашим коллективом предпринимались попытки ее реализации. В частности, мы пробовали регистрировать динамику редокс-параметров в тканях мозга крыс при ишемии с помощью биосенсоров HyPer-3 [561], а также SoNar [641]. Применение SypHer3s в этой модели наглядно продемонстрировало, насколько быстро и значительно изменятся внутриклеточное значение pH при ишемии (рис. 67). Уже через несколько минут с момента перекрытия артерии в клетках ишемизированной области pH в среднем снижается от значений $7,25 \pm 0,08$ (s.d.) до $6,7 \pm 0,15$. В некоторых животных изменения могут быть еще более выраженными. Поэтому динамика ацидоза в данной системе полностью перекрывала целевой сигнал HyPer-3 и SoNar, даже несмотря на то, что SoNar позиционируется авторами достаточно устойчивым биосенсором к pH изменениям [641]. Поэтому идею исследовать динамику H_2O_2 в тканях мозга млекопитающих *in vivo* при ишемическом инсульте после нескольких неудачных попыток пришлось отложить. В каждой группе животных с экспрессией HyPer-3, SypHer3s, SoNar, мы наблюдали слишком большой разброс в динамике флуоресценции, что характеризуется индивидуальными особенностями. Поэтому даже увеличение количества животных в выборках не способствовало разрешению отличий в динамике используемых биосенсоров.

При моем, авторе настоящей диссертации, личном участии создавались все улучшенные версии биосенсора HyPer. В частности, работа по разработке версии HyPer-3 является одним из результатов кандидатской диссертации. В 2020 году совместными усилиями нескольких коллективов из разных стран был разработан биосенсор нового поколения HyPer7, который по всем параметрам превосходит все предыдущие версии. HyPer7 в 30 раз чувствительнее к H_2O_2 , а также демонстрирует увеличенную \sim в 100 раз

скорость реакции и увеличенную \sim в 15 раз яркость. HyPer7 отличается от всех предыдущих версий еще и тем, что его радиометрический сигнал стабилен в диапазоне pH 6,0 – 8,0. Мы сравнили динамику сигналов HyPer-3 и HyPer7 в живых клетках в условиях физиологических колебаний pH. Для этого к клеткам HeLa Kyoto, которые по отдельности экспрессировали гены указанных биосенсоров, мы добавляли избыток лактата. Лактат попадает внутрь клеток благодаря монокарбоксилатным транспортерам в симпорте с H^+ [794]. Поэтому транспорт лактата всегда сопровождается закислением цитозоля. Это самая простая модель физиологического снижения pH в клетках. При добавлении лактата к клеткам с HyPer-3 заметно существенное снижение флуоресцентного сигнала, поскольку биосенсор реагирует на снижение pH, на фоне этого изменения целевой ответ на H_2O_2 оказывается заниженным. В аналогичных условиях HyPer7 не реагирует на изменение pH и демонстрирует высокоамплитудный ответ на H_2O_2 (рис. 68). Таким образом, HyPer7 можно использовать в системах со значительным сдвигом pH от нормальных значений.

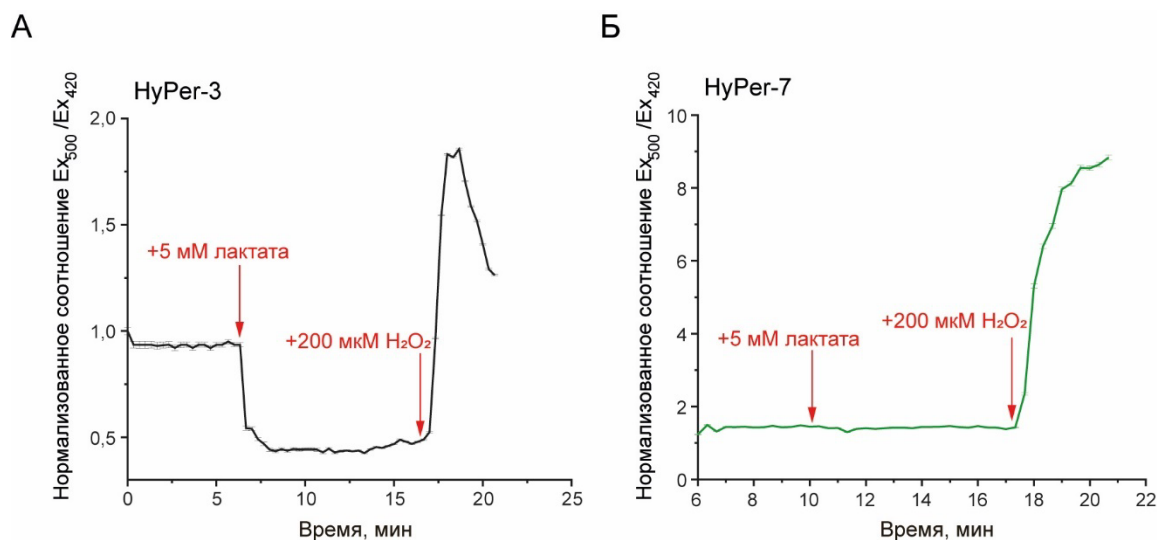


Рисунок 68. Динамика флуоресцентных сигналов HyPer-3 и HyPer7 в клетках HeLa Kyoto при добавлении лактата и последующей добавки H_2O_2 . Планки погрешностей соответствуют стандартной ошибке среднего, сигнал усреднен по не менее 40 клеткам для каждого биосенсора.

Сначала мы провели тесты на гиппокампальной нейрональной культуре по аналогии с предыдущими экспериментами по регистрации динамики pH в условиях гипоксии/реоксигенации. Нейроны экспрессировали ген HyPer7, мы также использовали цитозольную и митохондриальную локализации биосенсора. При гипоксии в течение 35 минут и последующей реоксигенации в обоих компартментах нейронов мы не обнаружили выраженного изменения сигнала HyPer7, который можно было бы сопоставить с изменением, вызванным добавлением в среду H_2O_2 (рис. 69А). При более внимательном анализе можно обнаружить, что сигнал HyPer7 при гипоксии все же изменяется. Причем

сигнал снижается, более выраженное изменение характерно для митохондриального матрикса (**рис. 69Б**). Падение сигнала соответствует восстановлению биосенсора и, следовательно, уменьшению H_2O_2 в системе. HyPer7 демонстрирует высокую чувствительность к H_2O_2 , минимальные и детектируемые изменения флуоресцентного сигнала наблюдаются уже при соотношении биосенсора в концентрации 1 мкМ к 10 нМ H_2O_2 . Судя по всему, при гипоксии мы наблюдаем медленное снижение физиологического уровня H_2O_2 . Последующая реоксигенация приводит к окислению биосенсора, в обоих компартментах сигнал достигает своих первоначальных значений (**рис. 69Б**). Таким образом, мы не обнаружили ожидаемого эффекта увеличенной продукции H_2O_2 в модели гипоксии/реоксигенации культивируемых нейронов, наоборот, зафиксировали снижение базовых уровней, что было особенно выражено в матриксе митохондрий.

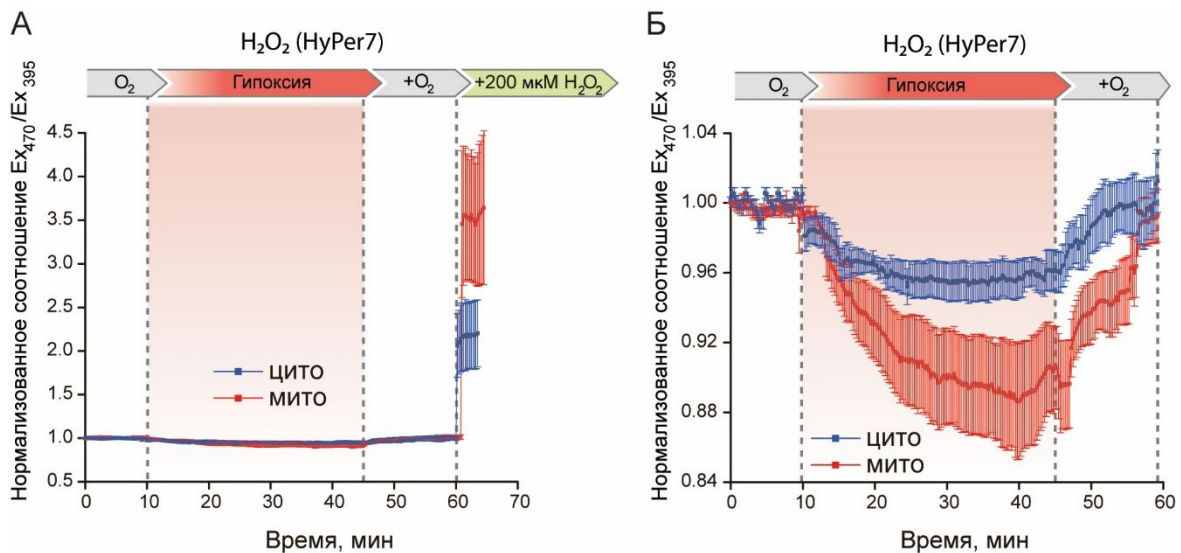


Рисунок 69. Динамика H_2O_2 в культуре гиппокампальных нейронов в условиях гипоксии/реоксигенации. (А) Динамика сигнала HyPer7 в нейронах при гипоксии/реоксигенации на фоне экзогенной добавки H_2O_2 для определения максимального диапазона ответа биосенсора в системе. Сигнал HyPer7 (F_{470}/F_{395}) нормализован и усреднен по 68 нейронам с митохондриальной локализацией биосенсора, 120 нейронам с локализацией в цитозоле, в обоих случаях проведено 4 независимых эксперимента. (Б) Аналогичный эксперимент без добавления H_2O_2 в среду. Сигнал усреднен по 203 нейронам с митохондриальной локализацией биосенсора в 13 независимых экспериментах, 216 нейронам с локализацией в цитозоле в 7 независимых экспериментах. Увеличение сигнала HyPer7 соответствует увеличению уровня H_2O_2 . На всех графиках планки погрешностей обозначают стандартное отклонение среднего.

В экспериментах *in vivo* на модели ишемического инсульта мозга у крыс мы сосредоточились на биосенсоре HyPer7, локализованном в митохондриях. Во-первых, наши данные *in vitro* на культуре клеток показывают, что в условиях гипоксии наибольшие изменения флуоресцентного сигнала характерны именно для матрикса митохондрий (**рис.**

69Б). Во-вторых, в оригинальной статье, посвященной биосенсору НуPer7 [562], было показано, что образуемый в цитозоле H_2O_2 быстро диффундирует в матрикс митохондрий, при этом в обратном направлении, т.е. из матрикса в цитозоль, диффузия ограничена. Это также согласуется с другими нашими данными, полученными с помощью редокс-биосенсоров Grx1-roGFP2 и Grx1-roCherry, где мы показали, что в некоторых типах клеток образуемый в матриксе митохондрий H_2O_2 действительно не вызывает окисления за пределами данного компартмента. Мы также установили, что за этот эффект ответственна Ttx-зависимая система. Таким образом, локализованный в митохондриях НуPer7 позволит обнаружить H_2O_2 в клетке независимо от источника его происхождения. Эта информация позволила нам снизить количество животных в эксперименте по этическим соображениям.

Как мы уже отметили, НуPer7 является высокочувствительным к H_2O_2 биосенсором. Поэтому перед экспериментами по моделированию инсульта мы проверили, в каком состоянии находится биосенсор в клетках мозга крыс до развития патологии. Это важно, поскольку даже небольшое повышение уровня H_2O_2 относительно базовых физиологических значений может перевести биосенсор в максимально окисленное состояние, что не позволит выявить возможное увеличение H_2O_2 в ходе развития патологии. Для проверки состояния биосенсора мы выделили мозг животного и с помощью оптического волокна, подведенного вплотную к флуоресцентной области среза ткани, регистрировали сигнал до и после добавления в физиологический раствор высоких концентраций H_2O_2 . В этой системе мы визуализировали выраженное ратиометрическое изменение сигнала с максимальной амплитудой ответа \sim в 2,5 раза (**рис. 70А**). Таким образом, НуPer7 в тканях мозга крыс демонстрирует потенциал к окислению. НуPer7 невозможно использовать для количественной оценки H_2O_2 в тканях *in vivo*, как это было реализовано для определения рН с помощью SypHer3s. Для получения калибровочной кривой необходимо провести серию измерений с выделенным белковым препаратом биосенсора при разных концентрациях H_2O_2 . Но белок быстро окисляется при контакте с окружающей средой, поэтому для поддержания восстановленного состояния необходимы высокие концентрации восстанавливающих агентов. Калибровку, полученную в таких условиях, сложно применять для получения абсолютных значений H_2O_2 при расчете флуоресцентного сигнала *in vivo*. Использование для калибровочной кривой клеток с нарушенной мембранной или свежeweделенных тканей *ex vivo* также затруднительно для реализации этой задачи, поскольку невозможно учесть диффузию H_2O_2 в биологическом образце и его взаимодействие с другими мишенями помимо биосенсора. Поэтому НуPer7 предназначен для регистрации качественной пространственно-временной динамики H_2O_2 .

Крысам линии SHR с экспрессией гена *HyPer7-мито* в нейронах хвостатого ядра головного мозга мы моделировали левосторонний ишемический инсульт путем окклюзии средней мозговой артерии. Как и в прошлой серии экспериментов по исследованию динамики ацидоза, мы непрерывно регистрировали сигнал биосенсора в обоих полушариях в течение 60 минут ишемии и последующих 60 минут реперфузии. Как при ишемии, так и на ранней стадии реперфузии мы обнаружили небольшое повышение H_2O_2 в центральной зоне инсульта (**рис. 70В**). 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*, представленным на **рисунке 70А**, соответствует практически максимальному окислению биосенсора (**рис. 70В**). Подобных изменений мы не обнаружили в тканях контралатерального здорового полушария, а также в контрольной группе ложнооперированных животных (**рис. 70Б,Г**).

Наши данные свидетельствуют, что H_2O_2 действительно образуется в тканях мозга крыс при ишемическом инсульте, однако основная генерация происходит не в острой фазе патогенеза. Чтобы найти временной диапазон увеличения H_2O_2 в центральной зоне инсульта, мы провели серию экспериментов, где сигнал биосенсора в тканях мозга животных регистрировали через разные интервалы времени на более поздних стадиях патогенеза. Для этого животным моделировали инсульт, после чего выводили из наркоза и регистрировали сигнал через 5, 12,5, 20, 25 и 40 часов с момента окклюзии артерии. Кроме того, мы сравнили отличается ли динамика H_2O_2 в нейронах от динамики в астроцитах. Для этого мы подготовили две группы крыс, у одной из которых в ткань хвостатого ядра мозга инъецировали вирус с конструкцией *hSyn1-HyPer7-мито* для экспрессии биосенсора в нейронах, другим – *GFAP-HyPer7-мито* для экспрессии в астроцитах. 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 между нейронами и астроцитами, по мере развития патологии эта разница становилась все более выраженной (**рис. 71**).

По завершении экспериментов у всех животных подтверждали наличие инсульта окрашиванием ткани 2,3,5-трифенилтетразолием хлористым, оценивали объем повреждения и перекрытие флуоресцентной области с поврежденной. Также визуализировали отсутствие повреждений в контралатеральном здоровом правом полушарии и обоих полушариях у животных из контрольных ложнооперированных групп.

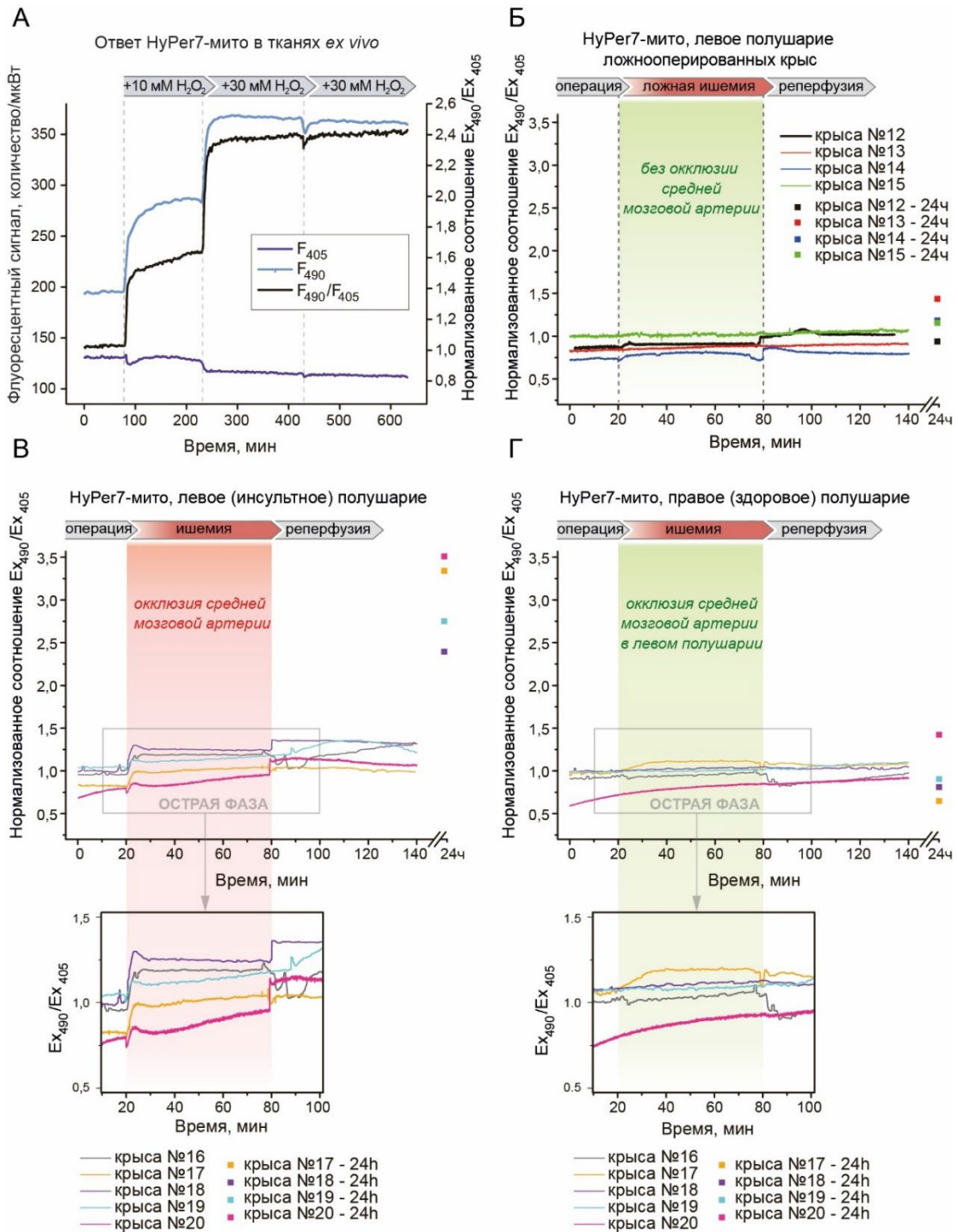


Рисунок 70. Динамика H_2O_2 (по сигналу биосенсора HyPer7) в тканях мозга крыс *in vivo* в острой фазе развития ишемического инсульта. (А) Ответ HyPer7 (по каждому из каналов в отдельности и в виде соотношения F_{490}/F_{405}) *ex vivo* в свежесыведенных тканях мозга крыс на добавки H_2O_2 в среду. (Б) *In vivo* динамика H_2O_2 в нейронах хвостатого ядра головного мозга в левом полушарии ложнооперированных крыс, которым не проводилась окклюзия левосторонней средней мозговой артерии. (В,Г) *In vivo* динамика H_2O_2 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.

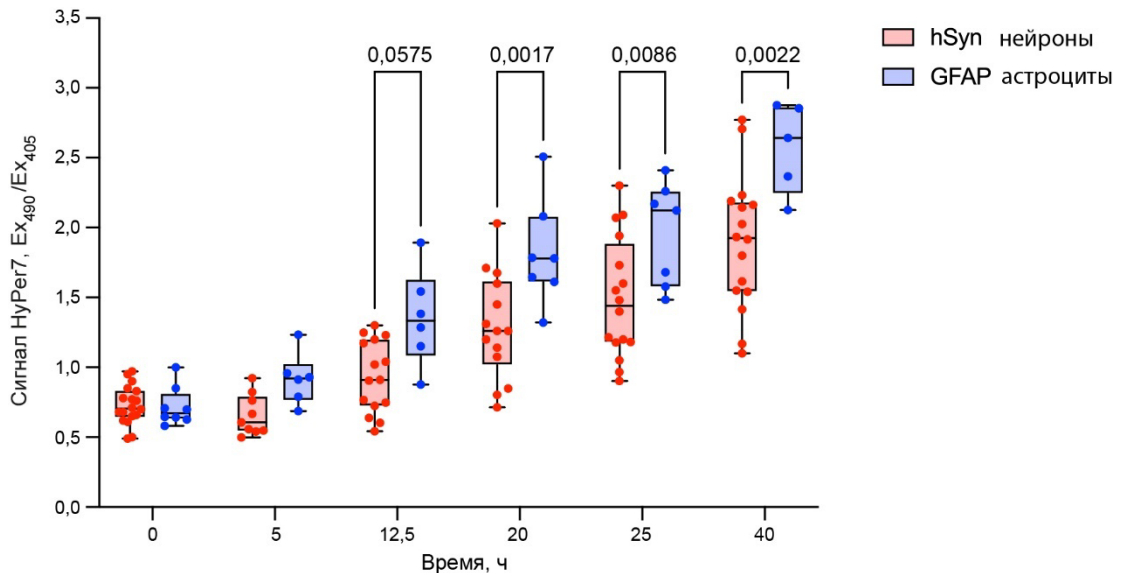


Рисунок 71. Динамика H_2O_2 (по сигналу биосенсора hSyn1) в тканях мозга крыс в нейронах (hSyn1 промотор) и астроцитах (GFAP промотор) *in vivo* при развитии ишемического инсульта. Проведен двухфакторный дисперсионный анализ (*two-way ANOVA*) с поправкой Бонферони. Сигнал биосенсора достоверно выше в 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.

Таким образом, в клетках центральной зоны ишемического инсульта на модели крыс выраженная продукция H_2O_2 начинается ~ от полусуток и достигает максимального уровня лишь на 1-2 сутки с момента начала ишемии. Остается открытым вопрос о происхождении H_2O_2 в клетках на этой стадии патогенеза. Не обязательно, что H_2O_2 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 H_2O_2 на поздних стадиях патогенеза может быть результатом работы именно клеток, выполняющих иммунные функции. Мы продолжаем исследования в этой области. Что касается острой фазы патогенеза, то важно отметить следующее: мы подчеркиваем, что термин «окислительный стресс» не приравнивается обязательно к усиленной продукции H_2O_2 . Ткань может испытывать окислительный стресс, но при этом H_2O_2 может и не быть его основным участником. Наши данные показывают, что в острой фазе ишемии головного мозга H_2O_2 действительно не является ключевым участником редокс-изменений, учитывая высокую чувствительность hSyn1, но это, конечно же, не означает, что отклонений в редокс-статусе поврежденной области не происходит вовсе. Предложены альтернативные механизмы окислительного повреждения. Например, в острой фазе ишемии может происходить перекисное окисление липидов, что выражается каскадами реакций по

радикальному механизму, вызывающих повреждения мембран. Появление специфичных продуктов перекисного окисления липидов при ишемии/реперфузии описано в некоторых работах [795]. Кроме того, образующийся $O_2^{\cdot-}$ в результате утечек электронов также не обязательно конвертируется в H_2O_2 , например, при активности индуцибельных $^{\cdot}NO$ -синтаз может происходить образование $ONOO^-$. Эти редокс-события, как перекисное окисление липидов, так и образование $ONOO^-$, не могут быть обнаружены биосенсором $HuPer7$. 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*. Очевидно, что описанный нами подход получит свое развитие в дальнейших работах. Разработка новых биосенсоров и их применение в описываемой модели инсульта позволят установить основных участников редокс-реакций и последовательность всех событий при данном патогенезе.

Большая продукция H_2O_2 в астроцитах по сравнению с нейронами при развитии ишемического инсульта является еще одной особенностью, которую мы обнаружили в наших исследованиях. Примечательно, что астроциты обладают более эффективной глутатионовой системой, это выражается и в общем содержании GSH, и в активности ферментов, участвующих в метаболизме этого соединения [796]. По этому параметру следовало бы ожидать, что астроциты наоборот должны обладать более выраженными антиоксидантными свойствами и более восстанавливающей внутриклеточной средой. Но также известно, что именно астроциты на ранних стадиях патогенеза претерпевают некоторые морфологические и биохимические изменения [797]. Взаимодействия разных типов клеток в реальных условиях развития патогенеза *in vivo* представляет отдельную интересную тему для размышлений. Предполагают, что астроциты участвуют в поддержании метаболизма нейронов в условиях окислительного стресса посредством различных механизмов [798–803]. И в то же время хорошо известна роль астроцитов в развитии нейровоспаления [804–807]. В свете данной информации более выраженная предрасположенность астроцитов к окислению по сравнению с нейронами при ишемическом повреждении выглядит закономерной.

3.2.4. Гипергликемия усугубляет последствия инсульта не через генерацию H_2O_2

В острой фазе ишемического инсульта у крыс в тканях мозга мы обнаружили лишь небольшие изменения концентрации H_2O_2 . Об этом можно судить, учитывая высокую чувствительность биосенсора $HuPer7$. Максимальное изменение сигнала было нами зафиксировано в центральной зоне ишемического повреждения лишь на следующие сутки.

Мы задались вопросом, коррелирует ли тяжесть инсульта с продукцией H_2O_2 ? Т.е. если повреждение более обширное и последствия более тяжелые, отразится ли это на динамике H_2O_2 ? Действительно, пациенты различаются по тяжести инсульта, во многом это зависит от возраста и сопутствующих заболеваний. Сахарный диабет является одним из наиболее важных и распространенных факторов риска инсульта. 30 – 40 % пациентов, поступающих в больницы с острым инсультом, имеют высокий гликемический статус крови. Гипергликемия существенно усугубляет последствия инсульта, что выражается увеличением объема повреждений головного мозга [808–811]. Эти два заболевания, сахарный диабет и ишемический инсульт, настолько часто сопутствуют друг другу, что разработаны животные модели, позволяющие исследовать влияние гипергликемии на патогенез инсульта [812]. Однако молекулярные механизмы, посредством которых гипергликемия усугубляет повреждения головного мозга, до сих пор подробно не выявлены. Предполагают, что в основе может быть усиление окислительного стресса. Повышенная концентрация глюкозы в крови оказывает влияние на метаболизм и, вероятно, на редокс-статус митохондрий, от этого зависит загрузка и эффективность работы электрон-транспортной цепи. Это может действительно способствовать большей выработке АФК при ишемии/реперфузии. Поскольку нам все же удалось зафиксировать прирост H_2O_2 в острой фазе инсульта, хоть и не такой выраженный, как мы ожидали и обсуждается в мировом научном сообществе в целом, нам показалось крайне интересным исследовать динамику H_2O_2 в этой же модели патогенеза, но на фоне глобальных метаболических нарушений у животных.

Для моделирования диабета у крыс мы применили распространенный в мировой практике подход стрептозотоцин-индуцируемой гибели β -клеток поджелудочной железы [717,813]. Крысам SHR за неделю до моделирования инсульта мы разово инъецировали стрептозотоцин в дозе 65 мг/кг, контрольной группе животных инъецировали растворитель без вещества также в объеме из расчета на вес животного. Животных содержали в одинаковых условиях, периодически измеряя уровень глюкозы в крови. Животные в опытной группе после введения стрептозотоцина демонстрировали стабильный гипергликемический статус (концентрация глюкозы в крови $31,74 \pm 2,2$ мМ, среднее \pm SD). Далее животным опытной и контрольной групп моделировали инсульт по стандартному протоколу окклюзии средней мозговой артерии, через 48 часов оценивали объемы повреждения головного мозга с помощью прокраски полученных 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. 72**). 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).

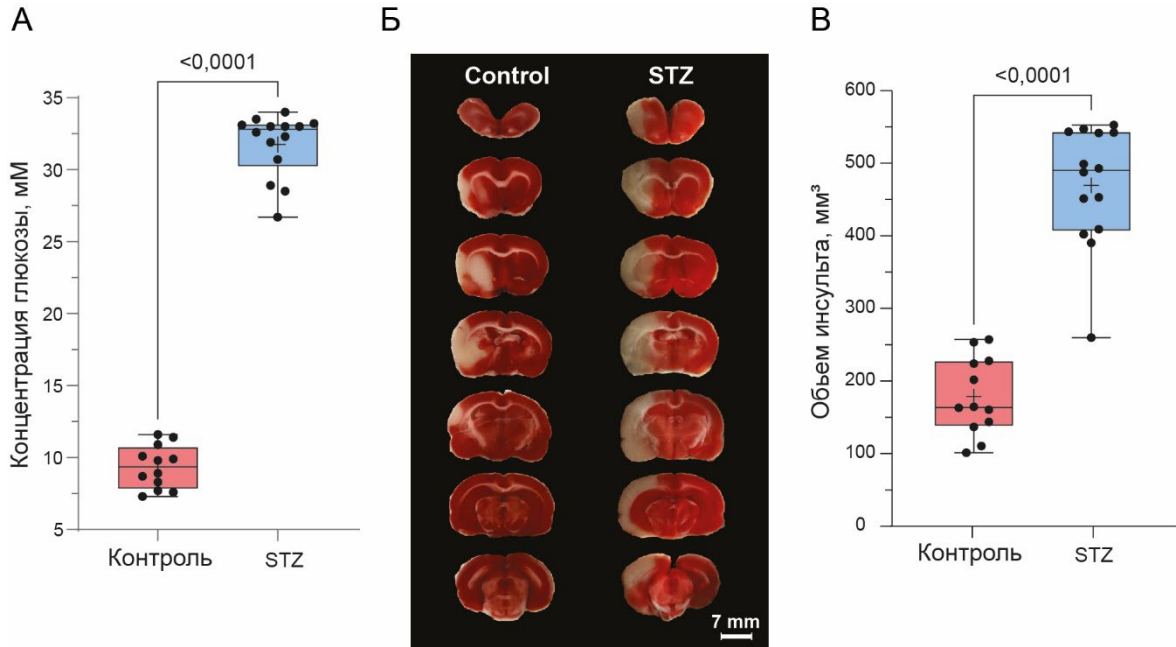


Рисунок 72. Эффект гипергликемии на объем ишемического повреждения головного мозга крыс. (А) Сравнение уровня глюкозы в крови у животных опытной группы (с инъекцией стрептозотоцина (STZ) в дозе 65 мг/кг) и контрольной (инъекция растворителя в том же объеме). Среднее значение обозначено значком «+», линией – медиана, планки погрешностей обозначают минимальные и максимальные значения. Применен непарный t-критерий. (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. Фотографии наглядно демонстрируют разницу в объеме инсульта у крыс, принадлежащих разным группам. (В) Объем ишемического инсульта у крыс контрольной и опытной групп. Среднее значение обозначено значком «+», линией – медиана, планки погрешностей обозначают минимальные и максимальные значения. 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.

Прежде, чем регистрировать динамику H_2O_2 *in vivo* на отработанной животной модели, мы проверили, как концентрация глюкозы влияет на динамику H_2O_2 в культивируемых нейронах *in vitro* при гипоксии и последующей реоксигенации. Для этого, как было описано ранее, смешанную нейрональную культуру, полученную из гиппокампов эмбрионов мыши, заразили вирусными частицами AAV9, несущими

конструкцию hSyn1-HyPer7-митохондрий. Через несколько дней выраженный сигнал наблюдали в матриксе митохондрий нейронов. Перед экспериментом клетки предварительно инкубировали в течение 5 суток в среде с обычным содержанием глюкозы (5 мМ) и при повышенных концентрациях (30 и 60 мМ), т.е. в общей сложности мы получили 3 группы клеток. Как и в предыдущем эксперименте (**рис. 69**), при нормальных условиях культивации клеток гипоксия и полная депривация глюкозы в течение 35 минут вызывали в нейронах снижение сигнала HyPer7, что свидетельствует о базовом снижении внутриклеточного уровня H_2O_2 (**рис. 73А**). При культивации клеток в среде с 30 мМ глюкозы мы также наблюдали снижение H_2O_2 , однако оно было менее выраженным, чем для клеток в нормальных условиях. При реоксигенации сигнал HyPer7 в этих клетках менее чем за 15 минут возвращался к исходному значению (**рис. 73А**). При увеличении глюкозы в среде до 60 мМ клетки при гипоксии вовсе не демонстрировали изменений сигнала HyPer7 (**рис. 73А**). Таким образом, содержание глюкозы в среде влияет на редокс-состояние нейронов. Но изменения H_2O_2 в этой системе оказались по-прежнему выражены слабо в сравнении с максимально возможным изменением сигнала HyPer7 при экзогенной добавке H_2O_2 в среду (**рис. 73Б**). Мы также оценивали выживаемость клеток в этих условиях, для этого использовали красители Hoechst 33342 и йодид пропидия. Оба красителя окрашивают ядра клеток, но йодид пропидия не проникает в живые клетки. Окрашивание происходит, если мембрана клетки повреждена. Результаты этих тестов показали, что повышение концентрации глюкозы в среде увеличивает долю погибших клеток (**рис. 73В**).

Важно отметить, что бóльший эффект на гибель клеток в данном эксперименте оказывала именно изначальная разница в концентрации глюкозы в среде, при этом воздействие гипоксии/реоксигенации не влияло на показатель выживаемости клеток при разных уровнях глюкозы. Мы также увеличивали концентрацию глюкозы до 120 мМ, однако при этих условиях бóльшая часть клеток погибала в ходе инкубации в течение 5 суток еще до проведения экспериментов по моделированию условий гипоксии. В клеточной культуре мы, как и прежде, не обнаружили продукции H_2O_2 при гипоксии.

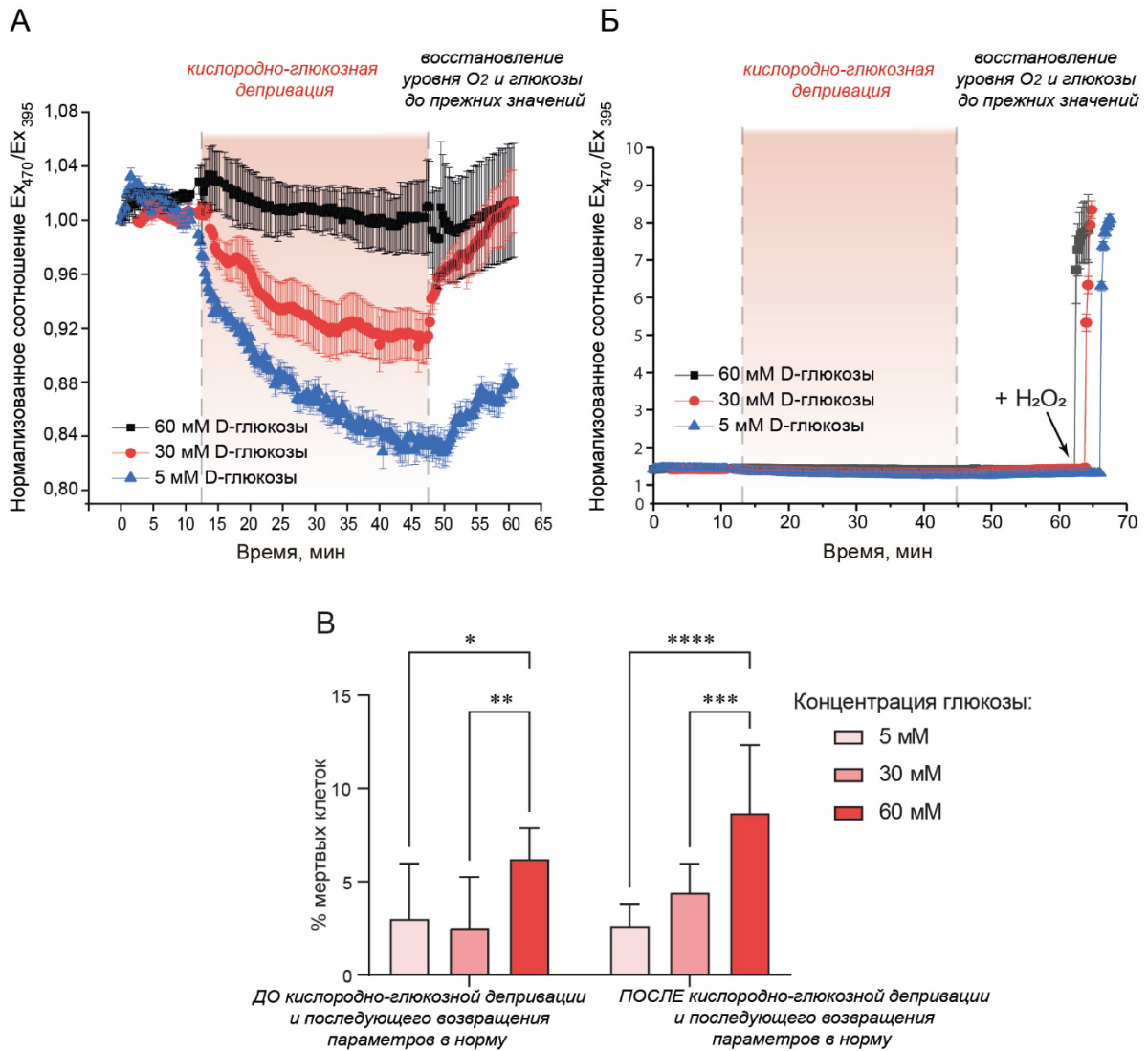


Рисунок 73. Эффект гипергликемии на динамику H_2O_2 в культуре нейронов. (А) Регистрация сигнала биосенсора *HuPer7* (F_{470}/F_{395}) в матрице митохондрий культивируемых гиппокампальных нейронов, полученных из эмбрионов мыши, в условиях гипоксии/реоксигенации. При гипоксии осуществляли депривацию глюкозы, при реоксигенации уровень глюкозы восстанавливали до прежнего. Синей линией отмечена динамика *HuPer7* в клетках, которые культивировали в среде с 5 мМ глюкозы (данные усреднены по 58 нейронам в 3 экспериментах). Красной линией отмечена динамика *HuPer7* в клетках, которые культивировали в среде с 30 мМ глюкозы (данные усреднены по 89 нейронам в 3 экспериментах). Черной линией отмечена динамика *HuPer7* в клетках, которые культивировали в среде с 60 мМ глюкозы (данные усреднены по 137 нейронам в 5 экспериментах). Значения нормализованы, планки погрешностей обозначают стандартную ошибку среднего. (Б) Представлена та же динамика, что и на графике (А), но на фоне максимальной амплитуды ответа *HuPer7* при добавлении в клеточную среду 200 мкМ H_2O_2 . (В) Процент окрашенных йодидом пропидия клеток, культивируемых в 5, 30 и 60 мМ глюкозы до и после гипоксии/реоксигенации. * = 0,0193, ** = 0,0051, *** = 0,0008, **** - <0,0001, применен двухфакторный дисперсионный анализ (two-way ANOVA) с использованием критерия множественного сравнения Тьюки.

По отработанному протоколу мы инъекцировали суспензию AAV9, несущих ген *HyPer7-мито* под промотором *hSyn1*, в хвостатое ядро головного мозга крыс линии SHR в оба полушария. Сразу после инъекции вируса в эту же область имплантировали оптические волокна, которые закрепили на черепе с помощью керамических адаптеров. За неделю до эксперимента животных случайным образом поделили на две группы. Опытной группе инъекцировали разово стрептозотонин в дозе 65 мг/кг, контрольной – буфер-растворитель в том же объеме. Непосредственно перед хирургическим вмешательством мы подтверждали, что каждое животное из опытной группы демонстрирует высокий гликемический статус крови (**рис. 72А**). Далее животным моделировали ишемический инсульт и непрерывно регистрировали динамику флуоресцентного сигнала биосенсора в течение 60 минут ишемии и последующих 60 мин реперфузии через имплантированные волокна с помощью описанной системы фотометрии. Мы не обнаружили каких-либо отличий в динамике сигнала *HyPer7-мито* в острой фазе инсульта у животных опытной и контрольной групп (**рис. 74А**). Как и прежде, при ишемии в течение 1 часа и последующей реперфузии в тканях животных обеих групп мы наблюдали небольшое увеличение сигнала *HyPer7*, что свидетельствует об увеличении H_2O_2 в системе. При регистрации сигнала на следующие сутки после окклюзии артерии у большинства животных мы наблюдали выраженное увеличение сигнала в центральной области инсульта. Однако разницы в сигнале биосенсора между животными с нормальным уровнем глюкозы и повышенным мы вновь не обнаружили (**рис. 74**). Интересно отметить на полученном графике, что по какой-то причине в правом здоровом полушарии *HyPer7* на следующие сутки оказался более восстановленным по сравнению с исходным значением у животных с высоким уровнем глюкозы в крови.

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.

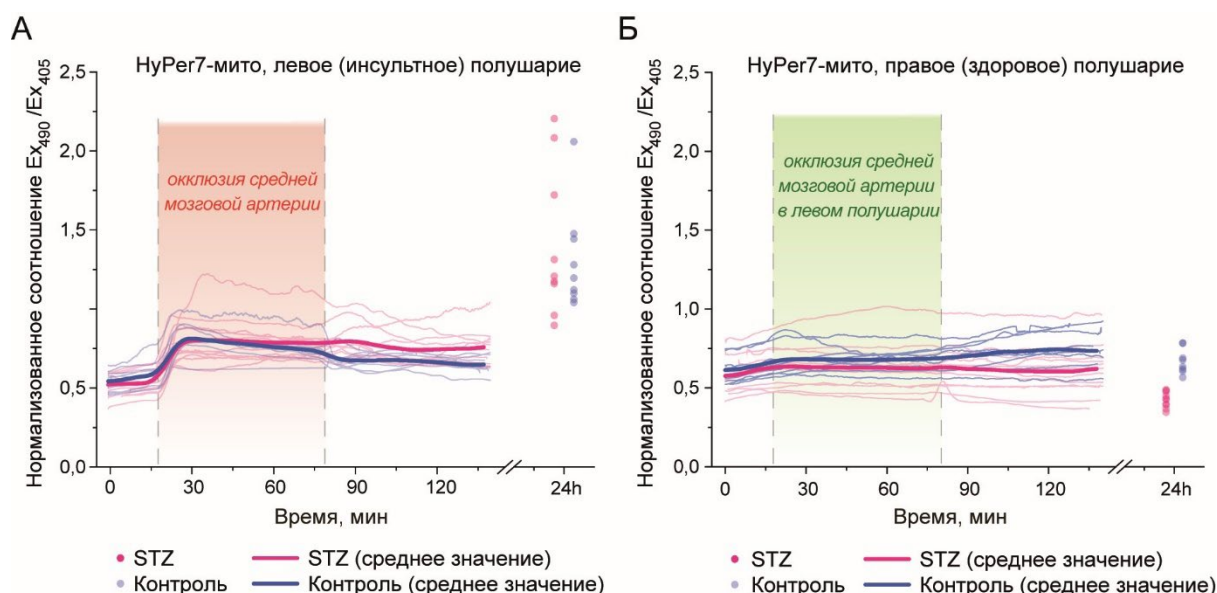


Рисунок 74. Динамика H_2O_2 (по сигналу биосенсора НуPer7) в тканях мозга крыс *in vivo* с нормальным и высоким уровнем глюкозы в крови в острой фазе развития ишемического инсульта. *In vivo* динамика H_2O_2 в нейронах хвостатого ядра головного мозга крыс в левом полушарии с ишемическим повреждением (**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.

3.2.5. Биосенсоры на основе сpYFP в мультифотонном режиме возбуждения флуоресценции

Альтернативой подхода оптоволоконного интерфейса может выступать мультифотонная микроскопия, приобретающая все большую популярность. 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. В рамках представленной работы мы неоднократно обсуждали преимущества смещения в более длинноволновую область при использовании оптических методов в биологических системах. Это позволяет снизить фототоксичность, уменьшить уровень автофлуоресценции. За счет уменьшения светорассеяния увеличивается глубина проникновения, что несет важное преимущество при микроскопии высокого разрешения толстых слоев тканей, в том числе в условиях *in*

in vivo. Флуоресцентные белки также не являются исключением и применяются в таком режиме микроскопии. Флуоресцентные биосенсоры на их основе при взаимодействии с целевым аналитом также должны изменять флуоресцентный сигнал, возбуждаемый несколькими фотонами. Однако важно учитывать, что мультифотонный спектр возбуждения флуоресценции молекулы трудно предсказать по однофотонному, кроме того, 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. Для примера мы охарактеризовали свойства очищенного белкового препарата рН-биосенсора *SypHer3s* на основе *srYFP*. Как уже отмечалось ранее, в спектре возбуждения флуоресценции этого белка представлены классические пики для *srYFP* с максимумами при 410 нм и 495 нм, которые соответствуют протонированной и депротонированной формам хромофора. При изменении рН в среде *SypHer3s* демонстрирует ратиометрическое изменение сигнала (E_{x495}/E_{x410}) (**рис. 75А**). При двухфотонном возбуждении *SypHer3s* в нейтральной среде демонстрирует лишь один пик в области 850 нм на спектре эффективности двухфотонного возбуждения флуоресценции ϕ_2 , эта величина определяется квантовым выходом ϕ и сечением двухфотонного поглощения хромофора σ_2 для конкретного белка. Данная величина позволяет сравнивать яркости различных флуоресцентных маркеров при двухфотонном возбуждении. Определение ϕ_2 представляет более точный спектральный анализ, хотя подход определения этого параметра трудоемок, поскольку двухфотонное возбуждение является нелинейным процессом. Несмотря на выраженное отличие в форме спектра, в двухфотонном спектре возбуждения флуоресценции *SypHer3s* наблюдается ратиометрический ответ при изменении рН в сторону как защелачивания, так и закисления. Защелачивание приводит к появлению выраженного пика в области 940 нм, что, судя по всему, соответствует депротонированной форме хромофора. Подход определения двухфотонного спектра возбуждения используемого биосенсора, таким образом, позволяет подобрать максимально подходящие параметры регистрации сигнала в данном режиме микроскопии. В частности, несмотря на выраженные пики обеих форм хромофора *SypHer3s*, соотношения длин волн, соответствующих их максимумам, не являются оптимальными для достижения максимального диапазона ответа. Так, например, в спектре максимальные изменения для протонированной формы наблюдаются в области 775 нм (**рис. 75Б**).

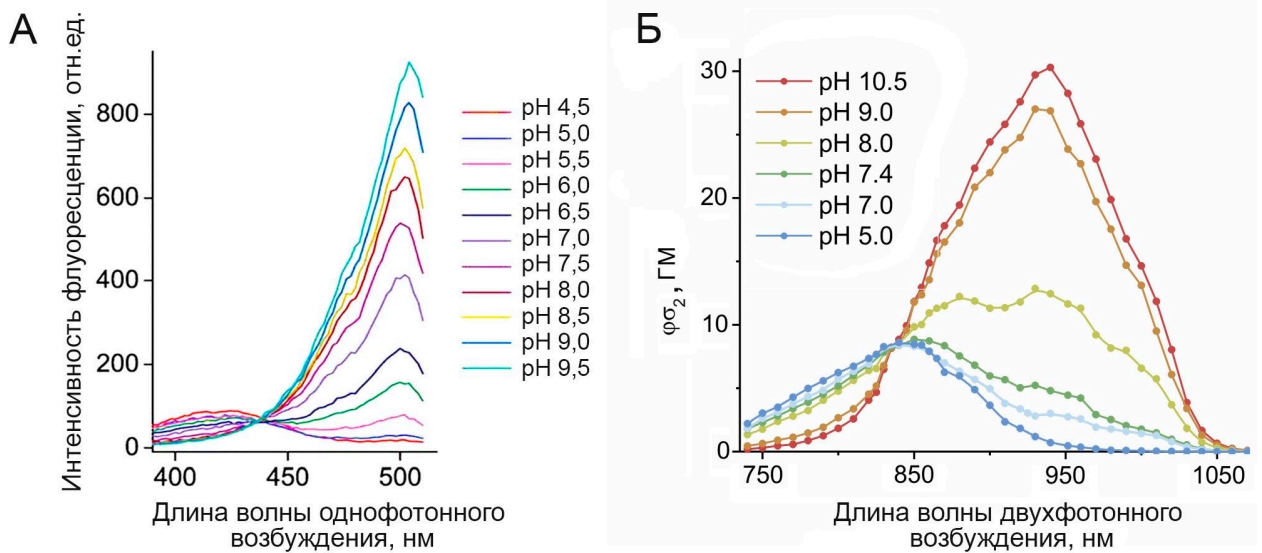


Рисунок 75. Спектры однофотонного и двухфотонного возбуждения флуоресценции биосенсора SyHer3s при разных значениях pH. Концентрация белка в пробе 20 нМ для однофотонного спектра и 500 нМ для двухфотонного.

На спектральные характеристики белка может влиять его окружение, поэтому при описании новых свойств инструмента важно проводить тесты не только на выделенных препаратах *in vitro*, но в условиях внутриклеточной среды. Мы провели двухфотонную микроскопию клеток линии HeLa Kyoto и нейронов первичной гиппокампальной культуры с экспрессией биосенсора SyHer3s в условиях изменений pH, вызванных увеличением в среде лактата (**рис. 76**).

В режиме двухфотонного возбуждения флуоресценции мы охарактеризовали биосенсоры HyPer7 для визуализации динамики H₂O₂ и HyProcates для визуализации продуктов гипогалогенного стресса. На **рисунке 77** приведено сравнение спектров возбуждения флуоресценции указанных биосенсоров в восстановленном и окисленном состояниях при однофотонном и двухфотонном режиме возбуждения флуоресценции. Измерения проведены в растворах белков *in vitro*. Как и для биосенсора SyHer3s, мы обнаружили существенные отличия в форме двухфотонных спектров возбуждения от однофотонных. В спектре ф σ_2 для HyPer7 два выраженных пика. При этом для HyProcates, несмотря на наличие двух пиков в однофотонном спектре, пик соответствующий депротонированной форме выражен гораздо в меньшей степени.

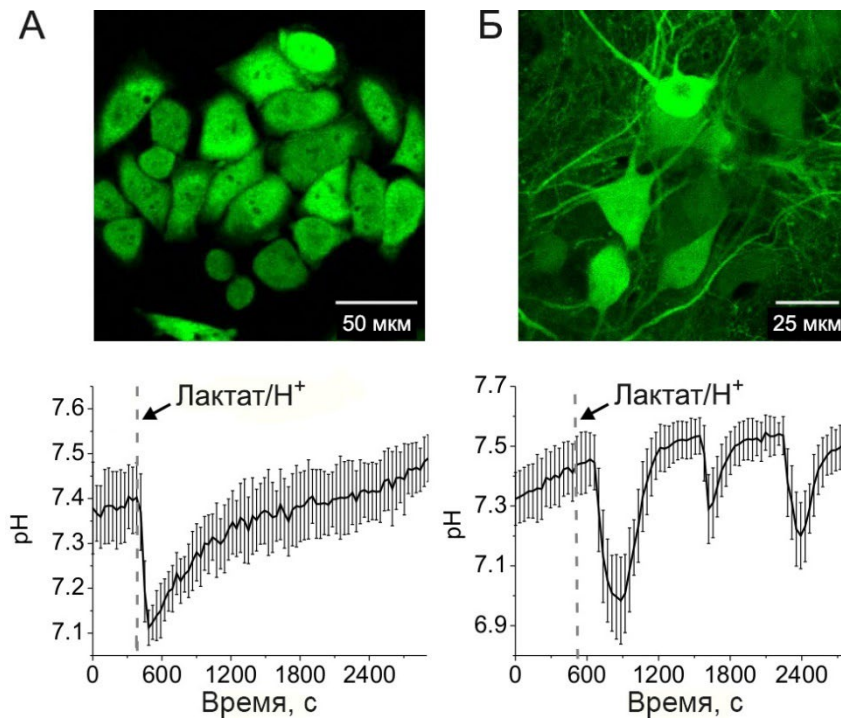


Рисунок 76. Динамика рН в культивируемых клетках в мультифотонном режиме регистрации сигнала *SypHer3s*. (А) Фотография клеток (канал возбуждения флуоресценции 775 нм), ниже представлена динамика рН в этих клетках при добавлении 20 мМ лактата (представлено среднее значение, планки погрешностей обозначают среднеквадратичное отклонение, 20 клеток при обсчете). (Б) Фотография нейронов в культуре, выделенных из гиппокампов мыши (канал возбуждения флуоресценции 775 нм), ниже представлена динамика рН в этих клетках при добавлении 20 мМ лактата (представлено среднее значение, планки погрешностей обозначают среднеквадратичное отклонение, 7 нейронов при обсчете). Рациометрический сигнал *SypHer3s* переведен в конкретные значения рН по калибровочной кривой, предварительно полученной также в мультифотонном режиме.

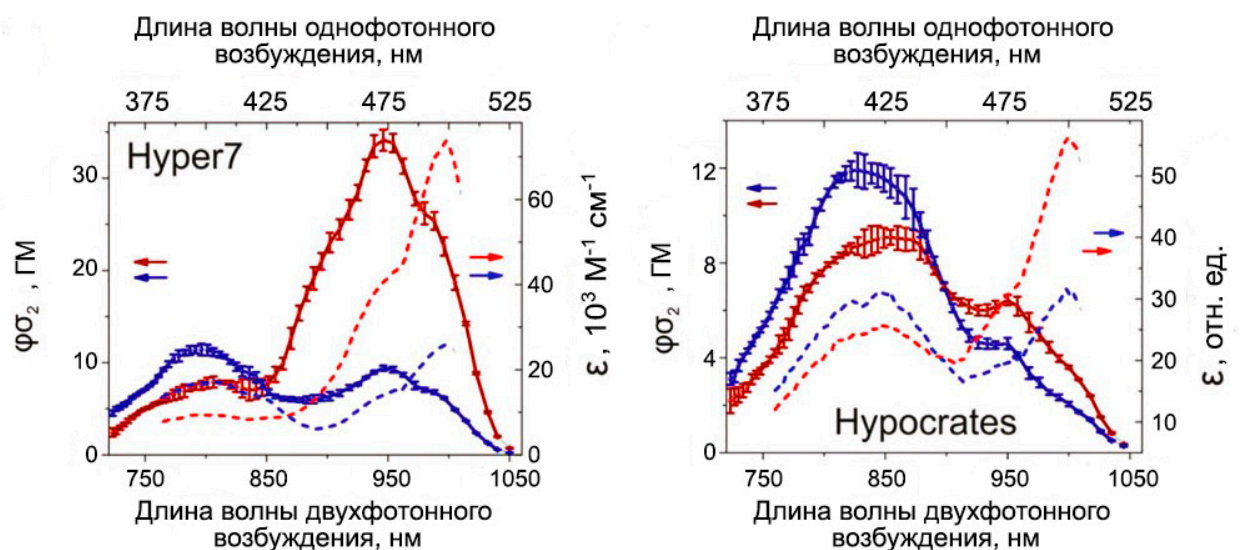


Рисунок 77. Спектры однофотонного (пунктирные линии) и двухфотонного (сплошные линии) возбуждения флуоресценции биосенсоров *Hyper7* (А) и *Hypocrates* (Б) в окисленном (красные линии) и восстановленном (синие линии) состояниях. Концентрация белка в пробе 500 нМ.

Выбранные нами биосенсоры на основе *сrYFP* демонстрируют выраженное сходство спектральных характеристик, в том числе по форме спектров при однофотонном возбуждении флуоресценции, однако в двухфотонном режиме мы наблюдаем существенные различия. Полученные результаты представляют интерес для будущих исследований, например, в настоящий момент при сотрудничестве с коллективом под руководством с.н.с Ланина А.А. (МГУ) мы продолжаем исследовать популярные биосенсоры на основе флуоресцентных белков. Мы надеемся, что сбор данных по многим биосенсорам, отличающимся структурой, позволит выявить интересные закономерности, объясняющие отличия в спектрах схожих белковых биосенсоров.

С практической точки зрения преимущество двухфотонной микроскопии заключается в возможности получать изображения объектов исследования в высоком пространственном разрешении и при этом с большой проникающей способностью, в том числе в тканях *in vivo*. Мы неоднократно тестировали разные типы биосенсоров, созданных нашей командой, в режиме мультифотонной микроскопии как в тканях *ex vivo*, так и *in vivo*. В качестве примера, на **рисунке 78** представлены изображения нейронов с экспрессией митохондриальной версии *HyPer7* в тканях мыши *in vivo* через краниальное окно в мультифотонном режиме регистрации сигнала. Первые ~70 мкм ткани от поверхности покровного стекла образует твердая мозговая оболочка, состоящая из соединительной ткани и кровеносных сосудов (**рис. 78В,Г**). Эти структуры хорошо визуализируются при подходах микроскопии, основанных на явлении генерации гармоник (в данном случае сигнал от эритроцитов и коллагена при 1250 нм). Предел глубины для визуализации нейронов с экспрессией *HyPer7*-мито в трехфотонном режиме составил ~170 мкм от поверхности мозга из-за исчерпания мощности лазера на длине волны 1250 нм (**рис. 78Д**). При этом на этой же глубине оказалось достаточно сигнала от биосенсора в двухфотонном режиме, но выражен вклад фонового освещения (**рис. 78Е,Ж**). На глубине ткани ~330 мкм значение фонового сигнала становится соизмеримо с целевым сигналом от биосенсора в канале возбуждения при 790 нм (**рис. 78З,И**). Максимальная глубина достигнутого изображения составила ~600 мкм при длине волны 980 нм, на этом уровне располагаются пирамидальные нейроны (**рис. 78К,Л**). Используемые мощности лазера для определения предельной глубины проникновения в ткань составили: ~150 мВт для 790 нм; ~200 мВт для 980 нм и ~190 мВт для 1250 нм. Таким образом, определение точных спектральных характеристик используемых флуоресцентных инструментов позволяет подбирать оптимальные параметры регистрации сигнала, что влияет на пространственное разрешение.

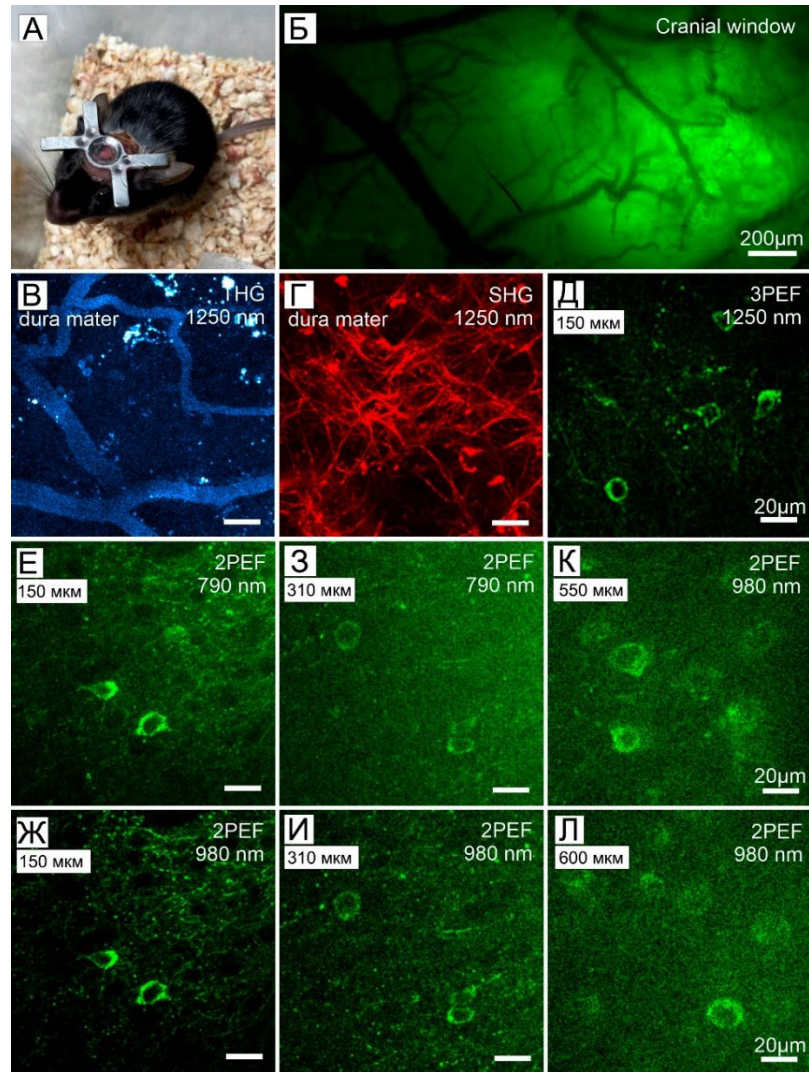


Рисунок 78. Мультифотонная *in vivo* микроскопия тканей мозга мыши с экспрессией в нейронах HuPer7-мито. (А) Фотография мыши с краниальным окном и адаптером для подсоединения к объективу микроскопа. (Б) Широкопольная флуоресцентная микроскопия поверхностного слоя мозга мыши через краниальное окно, сигнал от HuPer7-мито, который 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 HuPer7-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.

3.2.6. Редокс-параметры в кардиомиоцитах при гипоксии/реоксигенации

Не только клетки нервной ткани уязвимы к гипоксии. Метаболически активные клетки сердца также остро реагируют на ишемические состояния. Как и в случае нервных тканей, роль основного повреждающего фактора при инфаркте миокарда и последующей реперфузии сердца приписывают окислительному стрессу [814–816]. Однако и для кардиомиоцитов также пока остается не выяснено, какая из внутриклеточных систем вносит наибольший вклад в развитие окислительного стресса при патологии, какие из представителей АФК и/или других редокс-

активных компонентов преимущественно участвуют. Мы также использовали HyPer7 для выявления динамики H_2O_2 в клетках сердца в условиях гипоксии. Для этого мы использовали разработанную нами установку для моделирования условий гипоксии и глюкозной депривации. В экспериментах с кардиомиоцитами биосенсор HyPer7 был локализован в матриксе митохондрий. Напомним, что H_2O_2 хорошо проникает в митохондрии из цитозоля, но не наоборот, поэтому регистрация H_2O_2 в матриксе позволяет оценить общий пул окислителя в клетке [562]. Из эмбрионов крыс линии SHR нами была получена культура кардиомиоцитов, ген биосенсора был доставлен с помощью вирусных частиц AAV. При гипоксии и глюкозной депривации в течение 35 минут мы наблюдали снижение сигнала биосенсора HyPer7 на $8,3 \pm 1,5$ %, что свидетельствует о базовом снижении внутриклеточного H_2O_2 . При последующей реоксигенации и возвращении глюкозы в среде к нормальным значениям сигнал HyPer7 полностью восстанавливался до исходных значений (рис. 79). Представленная динамика H_2O_2 в культуре неонатальных кардиомиоцитов мало чем отличается от наблюдаемой нами ранее динамики в культивируемых нейронах (рис. 69).

При работе с клетками сердца в лабораторной практике по всему миру чаще используют именно культуру неонатальных кардиомиоцитов в основном из-за простоты выделения клеток и их жизнеспособности. Но в исследованиях редокс-процессов с использованием данной культуры важно иметь в виду, что неонатальные кардиомиоциты демонстрируют большую устойчивость к условиям гипоксии по сравнению со зрелыми кардиомиоцитами, при этом механизмы, определяющие эту устойчивость, до конца не изучены [817]. Очевидно, что это обусловлено отличиями метаболических особенностей неонатальных и зрелых типов клеток. Клетки сердца претерпевают существенные метаболические изменения в ходе развития организма. Например, на эмбриональной и ранней постнатальной стадии ключевую роль в поддержании энергетического баланса клеток сердца выполняет гликолиз [818–820]. По мере взросления организма созревающие кардиомиоциты преимущественно переходят на окислительное фосфорилирование, и их функционирование уже зависит в большей степени от работы митохондрий [818,819,821].

Мы провели сравнение динамики H_2O_2 при гипоксии и глюкозной депривации неонатальных кардиомиоцитов со зрелыми клетками сердца, выделенных из взрослых животных. Оказалось, что динамика H_2O_2 в матриксе митохондрий зрелых клеток кардинально отличается от наблюдаемой в неонатальных при одинаковых условиях. Впервые в клеточной культуре нам удалось зафиксировать выраженный рост концентрации H_2O_2 , вызванный снижением уровня O_2 . При гипоксии и снижении глюкозы в среде сигнал биосенсора HyPer7 в зрелых кардиомиоцитах крыс увеличивался на $15,2 \pm 6,9$ % и возвращался к исходному состоянию при восстановлении параметров среды к первоначальным (рис. 79).

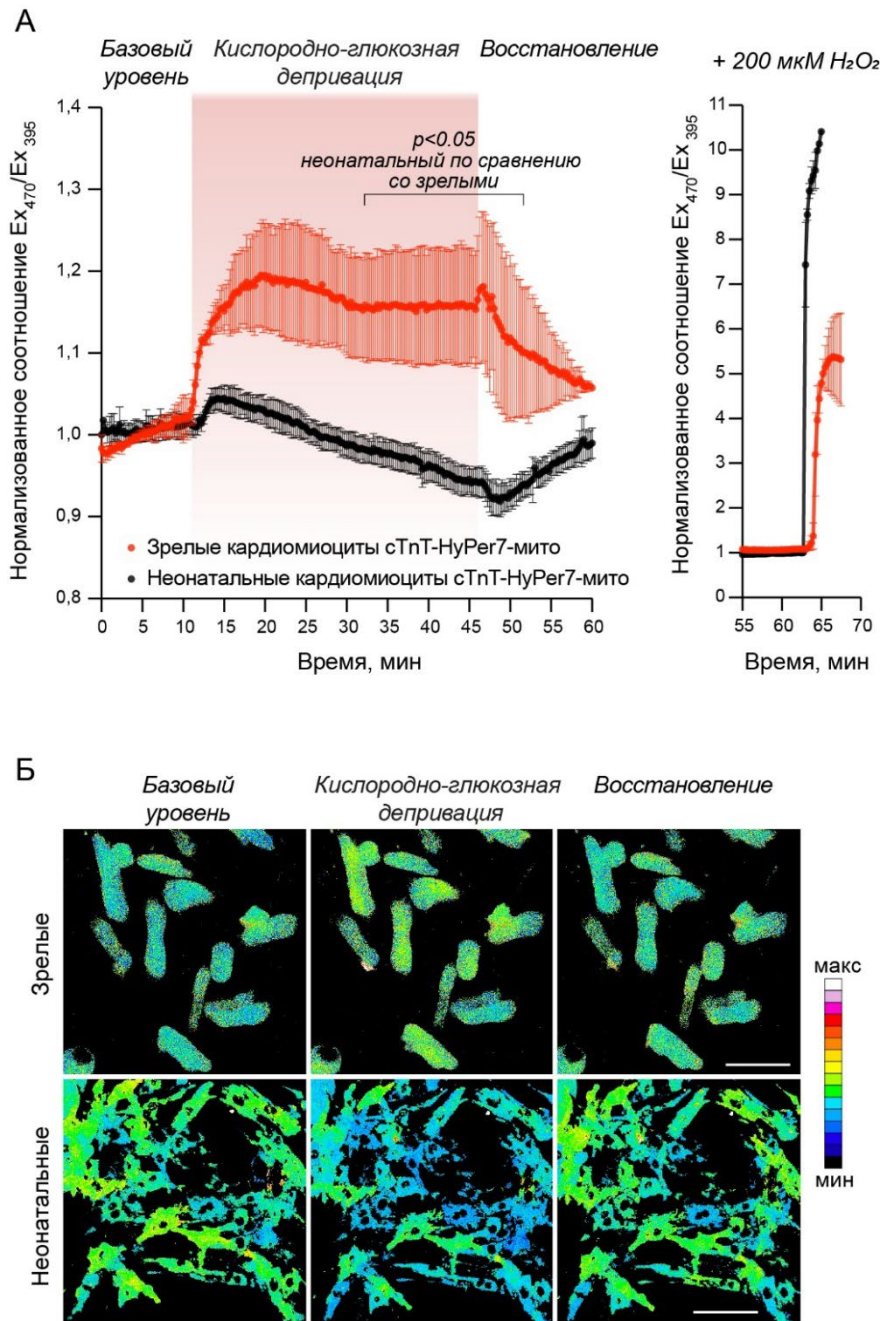


Рисунок 79. Динамика H_2O_2 в культуре неонатальных и зрелых кардиомиоцитов крыс в условиях гипоксии/реоксигенации. (А) Динамика H_2O_2 в матрице митохондрий неонатальных (черная линия) и зрелых (красная линия) кардиомиоцитов крыс в культуре в условиях гипоксии и глюкозной депривации в течение 35 минут с последующим возвращением параметров в норму, регистрация с помощью биосенсора Нупер7 (F_{470}/F_{395}). Сигнал биосенсора нормализован и усреднен по 40 клеткам в 2 экспериментах в случае зрелых кардиомиоцитов и по 86 клеткам в 3 экспериментах для неонатальных. На отдельном графике представлен ответ Нупер7 на добавление в среду 200 мкМ H_2O_2 . Указаны средние значения, планки погрешностей обозначают стандартное отклонение среднего. $P < 0,05$ – сравнение сигнала Нупер7 между рассматриваемыми типами клеток, применен тест Сидака на множественные сравнения (*Sidak's multiple comparisons test*). (Б) Представлены фотографии культивируемых зрелых (верхний ряд) и неонатальных (нижний ряд) кардиомиоцитов, раскрашенных в псевдоцвета, которые соответствуют значению сигнала биосенсора Нупер7. Приведены фотографии клеток в основном базовом состоянии, на 35-й минуте гипоксии и глюкозной депривации, на 15-й минуте после восстановления O_2 и глюкозы в среде в норму. Линейка масштаба 100 мкм.

При этом как неонатальные, так и зрелые кардиомиоциты демонстрировали выраженное однонаправленное изменение сигнала HuPer7 при добавлении в среду избытка H_2O_2 , что подтверждает правильное функционирование биосенсора в обоих типах клеток. Таким образом, неонатальные и зрелые кардиомиоциты существенно различаются по редокс-статусу, по крайней мере, в условиях недостатка O_2 .

Гипоксия воздействует на редокс-состояние дыхательной цепи митохондрий. С помощью метода Рамановской микроспектроскопии мы провели сравнение влияния недостатка O_2 на редокс-состояние цитохромов *c*- и *b*-типа у неонатальных и зрелых кардиомиоцитов. Анализ данного параметра позволит оценить загрузку электрон-транспортной цепи, что коррелирует с продукцией $\text{O}_2^{\cdot-}$ на уровне комплекса III и, возможно, поможет объяснить обнаруженную нами разницу в этих клетках по динамике H_2O_2 в условиях гипоксии. Ранее с помощью такого подхода было продемонстрировано, что гипоксия вызывает перегрузку дыхательной цепи в кардиомиоцитах изолированного сердца [822].

Эксперименты с применением Рамановской спектроскопии были выполнены в лаборатории Браже Надежды Александровны (МГУ им. М.В. Ломоносова, ИБХ РАН). С использованием лазера с длиной волны 532 нм были получены спектры комбинационного рассеяния света для зрелых и неонатальных кардиомиоцитов в культуре. Клетки демонстрировали схожие наборы пиков (**рис. 80А,Б**). На приведенных спектрах представлены пики, соответствующие колебаниям связей в гемовой части восстановленных цитохромов *c*- и *b*-типа (максимумы 750, 1126, 1587 cm^{-1}), а также уникальные пики для восстановленных *b* (1338 cm^{-1}) и *c* (570, 604, 1313 cm^{-1}). Пик с максимумом 1450 cm^{-1} соответствует колебаниям C-C связи в липидах, с максимумом 1660 cm^{-1} – C-N связи в белках. Наблюдаются пики, соответствующие колебаниям гема *b* в оксимиоглобине (1367-1370 cm^{-1}) и дезоксимиоглобине (1363-1365 cm^{-1}) [822–825]. Пик при 640 cm^{-1} соответствует колебанию связи C-S в цитохромах *c*-типа (связь между остатком Cys и гемом *c*), кластерам Fe-S и не окисленным Cys в белках [826].

По интенсивности пиков на спектрах комбинационного рассеяния мы обнаружили, что даже в базовом состоянии относительное количество цитохромов *c*- и *b*-типов у зрелых кардиомиоцитов значительно выше по сравнению с неонатальными. Мы добавляли к клеткам дитионит натрия, который имитирует состояние гипоксии, поскольку восстанавливает все доступные переносчики электронов в дыхательной цепи. Это позволяет увидеть на спектре все цитохром-содержащие комплексы (**рис. 80А,Б**). Обнаруженная нами разница в спектрах позволяет нам заключить, что общее количество таких цитохром-содержащих комплексов электрон-транспортной цепи, следовательно,

и количество самих митохондрий в зрелых кардиомиоцитах выше, чем в неонатальных. Кроме того, при нормальных условиях в зрелых кардиомиоцитах относительное количество восстановленных цитохромов *c*- и *b*-типа значительно ниже (в 6–7 раз), чем при гипоксии (**рис. 80В,Г**), т.е. при нормоксии в этих клетках электрон-транспортная цепь лишь частично загружена. В отличие от неонатальных кардиомиоцитов, где относительное количество восстановленных цитохромов практически одинаково в базовом состоянии и после обработки дитионитом натрия (**рис. 80В,Г**). 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 . Т.е. электрон-транспортная цепь неонатальных клеток находится в максимально возможном для них загруженном состоянии. В зрелых кардиомиоцитах гипоксия, наоборот, вызывает накопление электронов в дыхательной цепи. Вероятно, именно это отличие обуславливает разницу в динамике H_2O_2 в сравниваемых типах клеток в условиях гипоксии.

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 [827,828]. Оказалось, что неонатальные кардиомиоциты по сравнению со зрелыми демонстрируют более высокую вероятность образования такой скрученной конформации гема цитохрома *c* (**рис. 80Д**).

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.

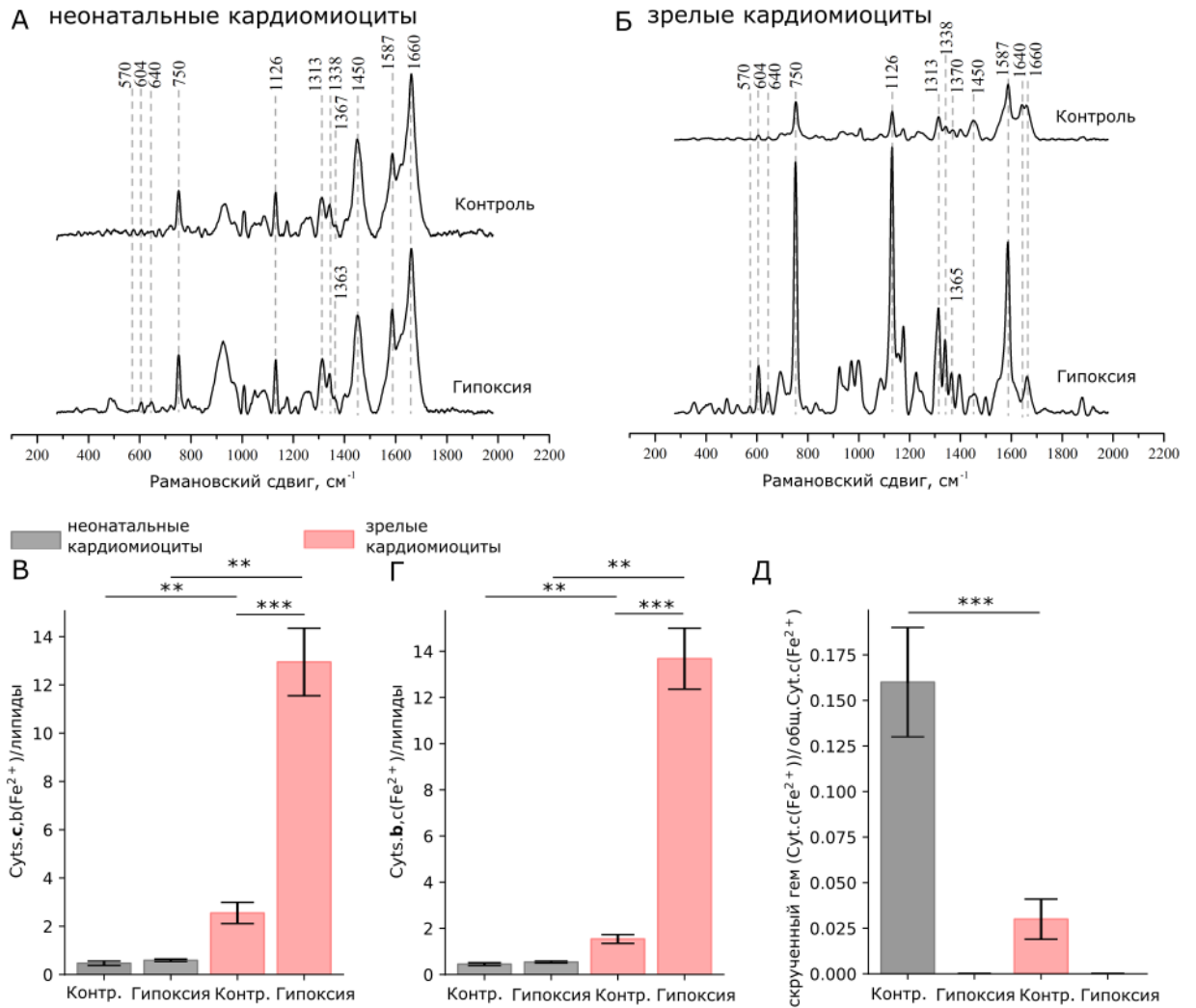


Рисунок 80. Сравнение редокс-состояния и относительного количества цитохромов в митохондриях зрелых и неонатальных кардиомиоцитов крыс в культуре. Спектры комбинационного рассеяния (Рамановские спектры) для **(А)** неонатальных и **(Б)** зрелых кардиомиоцитов в культуре при нормальных условиях (верхние спектры) и в условиях гипоксии (нижние спектры). Для лучшей презентации данных спектры соотнесены по вертикале и нормированы на интенсивность пика при 1450 cm^{-1} (соответствует С-С липидам). Числами отмечены максимумы пиков. **(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.

В клетках нервной системы как в условиях культуры при гипоксии, так и в тканях мозга крыс *in vivo* при ишемии мы наблюдали выраженное развитие внутриклеточного ацидоза. Т.е. в отличие от динамики концентрации H_2O_2 мы не наблюдали существенной разницы в динамике рН в нейронах между клеточной культурой и тканями *in vivo*. С помощью рН-биосенсора SynHer3s мы также сравнили, как развивается ацидоз в цитозоле неонатальных и зрелых кардиомиоцитов крыс при гипоксии. В обоих типах клеток мы

обнаружили резкое снижение сигнала SypHer3s, что соответствует закислению. Неонатальные кардиомиоциты демонстрировали бóльшее изменение сигнала (на $41,7 \pm 10,3$ %) по сравнению со зрелыми (на $29,2 \pm 8,9$ %) (рис. 81). Согласно нашим предыдущим данным, такое изменение нормализованного сигнала SypHer3s соответствует снижению pH в системе ~ на 0,5 единиц. Возвращение уровня O_2 к норме приводило к восстановлению pH к исходному состоянию в обоих типах клеток. По завершении эксперимента в качестве контроля мы добавляли в среду 20 мМ лактата для того, чтобы закислить цитозоль, поскольку, как мы обсуждали ранее, лактат транспортируется в клетку в симпорте с H^+ . Для обоих типов клеток лактат вызывал выраженное снижение pH, причем эффект оказался соизмерим с воздействием гипоксии. Таким образом, гипоксия при используемых нами параметрах вызывает максимально возможное физиологическое снижение pH, при котором клетки выживают и продолжают функционировать. Примечательно, что pH является более универсальным метаболическим ответом при гипоксии, поскольку изменения для неонатальных и зрелых кардиомиоцитов незначительны в отличие от редокс-параметров этих клеток.

3.2.7. 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. Такие же отличия могут наблюдаться и для других типов клеток в культуре и тканях *in vivo*. Поэтому возник вопрос о реальной динамике исследуемых параметров в кардиомиоцитах в работающем сердце *in vivo* в условиях недостатка O_2 . С помощью доступных на сегодняшний день AAV серотипов и при выборе нужного промотора ген интересующего биосенсора можно экспрессировать локально в сердце. Однако главный вопрос в том, как регистрировать флуоресцентный сигнал *in vivo* в тканях млекопитающих? Оптическая система, которую мы применяли для исследования патогенеза инсульта, не подходит для работы с сердцем. Мы имплантировали оптические волокна в ткани мозга, прочно фиксируя их на поверхности черепа. Сердце сокращается, поэтому имплантация световода в ткани этого органа невозможна. Кроме того, сама операция по ишемии сердца инвазивна, ее проводят на открытом органе, что отличает от процедур при моделировании инсульта головного мозга, где не проводится хирургических манипуляций непосредственно в исследуемой ткани.

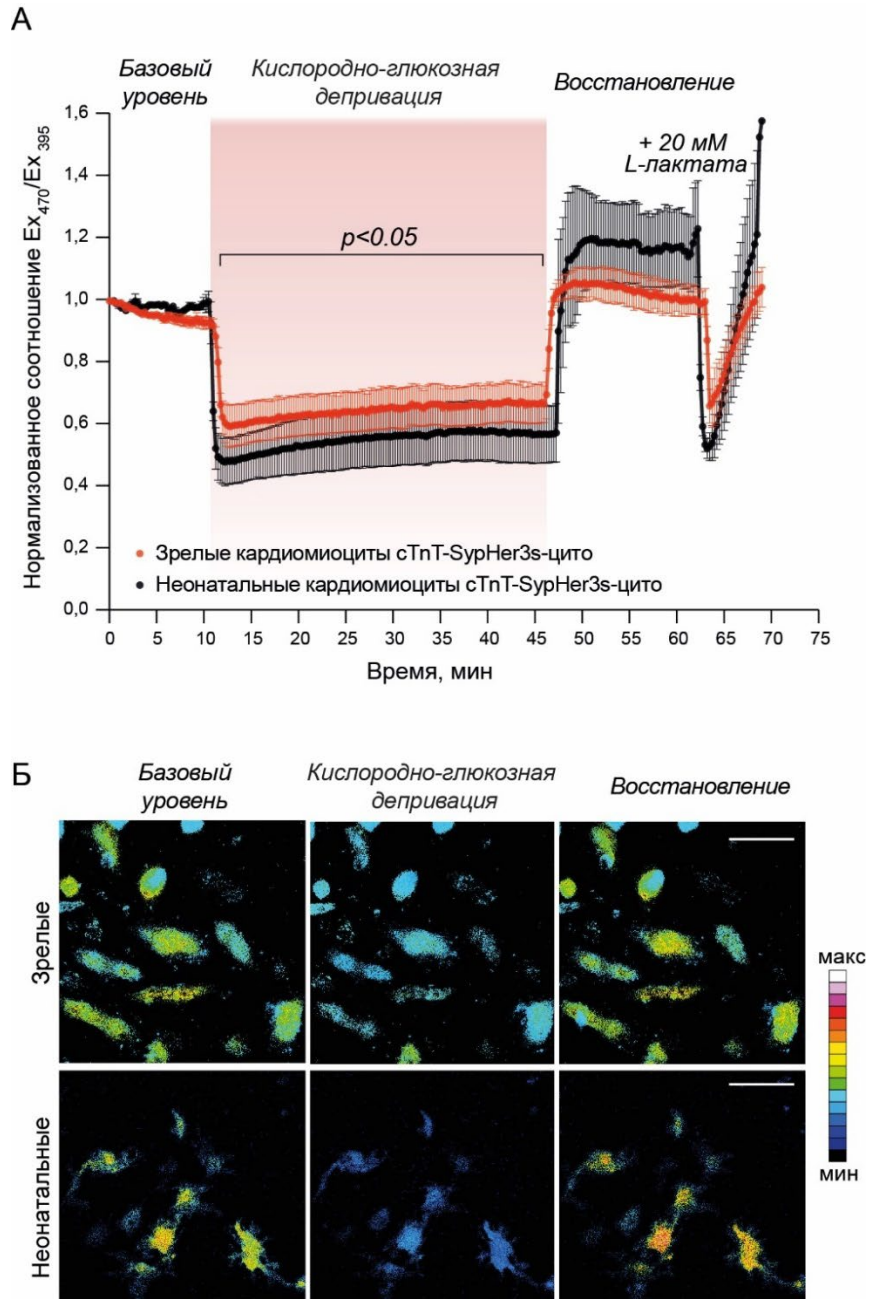


Рисунок 81. Динамика рН в культуре неонатальных и зрелых кардиомиоцитов крысы в условиях гипоксии/реоксигенации. (А) Динамика H_2O_2 в цитозоле неонатальных (черная линия) и зрелых (красная линия) кардиомиоцитов крысы в культуре в условиях гипоксии и глюкозной депривации в течение 35 минут с последующим возвращением параметров в норму. Регистрация с помощью биосенсора SupHer3s (F_{470}/F_{395}), сигнал биосенсора нормализован и усреднен по 18 клеткам в 4 экспериментах в случае зрелых кардиомиоцитов и по 40 клеткам в 3 экспериментах для неонатальных. На графике также представлен ответ SupHer3s на добавку в среду 20 mM лактата. Указаны средние значения, планки погрешностей обозначают стандартное отклонение среднего. $P < 0,05$ – сравнение сигнала SupHer3s в рассматриваемых типах клеток при нормоксии и гипоксии, применен тест Сидака на множественные сравнения ('Sidak's multiple comparisons test'). (Б) Представлены фотографии культивируемых зрелых (верхний ряд) и неонатальных (нижний ряд) кардиомиоцитов, раскрашенных в псевдоцвета, которые соответствуют значениям сигнала биосенсора SupHer3s. Приведены фотографии клеток в основном состоянии, на 35-й минуте гипоксии и глюкозной депривации, на 15-й минуте после восстановления O_2 и глюкозы в среде в норму. Линейка масштаба 100 мкм.

Альтернативой может служить выбор подходящего для реализации этой задачи модельного организма. Мы выбрали рыбу *Danio rerio*. Эта небольшая пресноводная рыба стала популярным объектом в современных медико-биологических исследованиях, включая моделирование различных заболеваний человека и поиск лекарственных средств [829–832]. Как и любые другие позвоночные животные, *D. rerio* чувствительны к гипоксии. В условиях обитания они сталкиваются с естественными изменениями концентрации растворенного в воде O_2 , поэтому их клетки в ходе эволюции также выработали механизмы, позволяющие адаптироваться к умеренной и плавно развивающейся гипоксии. Устойчивость этих рыб к умеренной гипоксии, что в принципе характерно для многих пресноводных видов, хорошо исследована для эмбриональной и личиночной стадий, однако редокс-процессы при острой гипоксии/реоксигенации для *D. rerio* описаны гораздо в меньших количествах работ. Острая гипоксия, как и у других позвоночных, вызывает у *D. rerio* повреждение различных тканей, в том числе сердца и головного мозга, что также приводит к поведенческим отклонениям [833,834]. На *D. rerio* исследовали вызванные гипоксией развитие ретинопатии, патологический ангиогенез, дисфункцию сердца [835–837].

Наш выбор данного объекта был обусловлен тем, что ткани *D. rerio* на ранних стадиях развития прозрачны, что позволяет проводить микроскопию внутренних органов *in vivo*. Также рыбы имеют небольшие размеры, что позволяет применять те же системы, что и для микроскопии клеточных культур. Стандартный микроскоп позволяет визуализировать в одной серии экспериментов сразу несколько особей, что облегчает набор данных.

Мы адаптировали нашу установку, позволяющую быстро и точно контролировать уровень O_2 в среде, для работы с двухдневными мальками *D. rerio*. Группу анестезированных трикаином мальков помещали в камеру, через которую пропускали оксигенированную или деоксигенированную воду. Такой подход оказался эффективен, поскольку на ранних стадиях развития *D. rerio* демонстрируют активное кожное дыхание [838]. Ген биосенсора может быть легко доставлен в ткани рыбы с помощью инъекции в оплодотворенную икринку соответствующей мРНК. На выбранной нами стадии развития у рыб хорошо визуализируются органы, позволяя регистрировать флуоресцентный сигнал в различных тканях.

Для оценки динамики H_2O_2 в тканях *D. rerio* при гипоксии мы, как и прежде, использовали биосенсор HyPer7. Поскольку одно из преимуществ объекта *D. rerio* заключается в простоте манипуляции с ним на всех этапах исследования (доставка гена биосенсора, микроскопия) мы решили локализовать биосенсор по отдельности в

матрикс митохондрий и цитозоле, чтобы напрямую сравнить *in vivo* динамику концентрации H_2O_2 в этих компартментах при гипоксии. Версии биосенсора HyPer7 доставляли с помощью микроинъекции мРНК в икринки рыб на стадии зиготы. На 2-е сутки развития мы получили рыб с выраженным флуоресцентным сигналом в тканях в нужной локализации (**рис. 82**).

Рыб с экспрессией HyPer7 или HyPer7-мито мы подвергали условиям гипоксии в течение 60 минут. Данный временной интервал мы подбирали экспериментально, добиваясь максимального эффекта воздействия при выживаемости рыб. Напомним, что в модели ишемии мозга крыс мы также перекрывали среднюю мозговую артерию на 60 минут. Флуоресцентный сигнал биосенсора регистрировали в области сердца в центральной его части, чтобы не учитывать смещений от сердцебиения, а также в области головы *D. rerio*. Повсеместно при заданных условиях гипоксии мы регистрировали медленное падение флуоресцентного сигнала HyPer7 в цитозоле ~ на 10%. При последующей реоксигенации сигнал биосенсора возвращался к прежним значениям. Таким образом, в цитозоле клеток *D. rerio* мы обнаружили падение базового уровня H_2O_2 при недостатке O_2 . Совершенно иную динамику мы наблюдали при заданных условиях и в тех же тканях для биосенсора, локализованного в матриксе митохондрий. В митохондриях в выбранных областях исследования мы наблюдали выраженное увеличение сигнала HyPer7, причем наиболее выраженный сигнал оказался характерен для нервной ткани (увеличение сигнала ~ на 25-30% в области головы и ~ на 10% в сердце при сравнении с исходными значениями до гипоксии в тех же тканях) (**рис. 82Г,Д**). При реоксигенации сигнал HyPer7 в митохондриях возвращался к исходному состоянию.

Важно подытожить, 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.

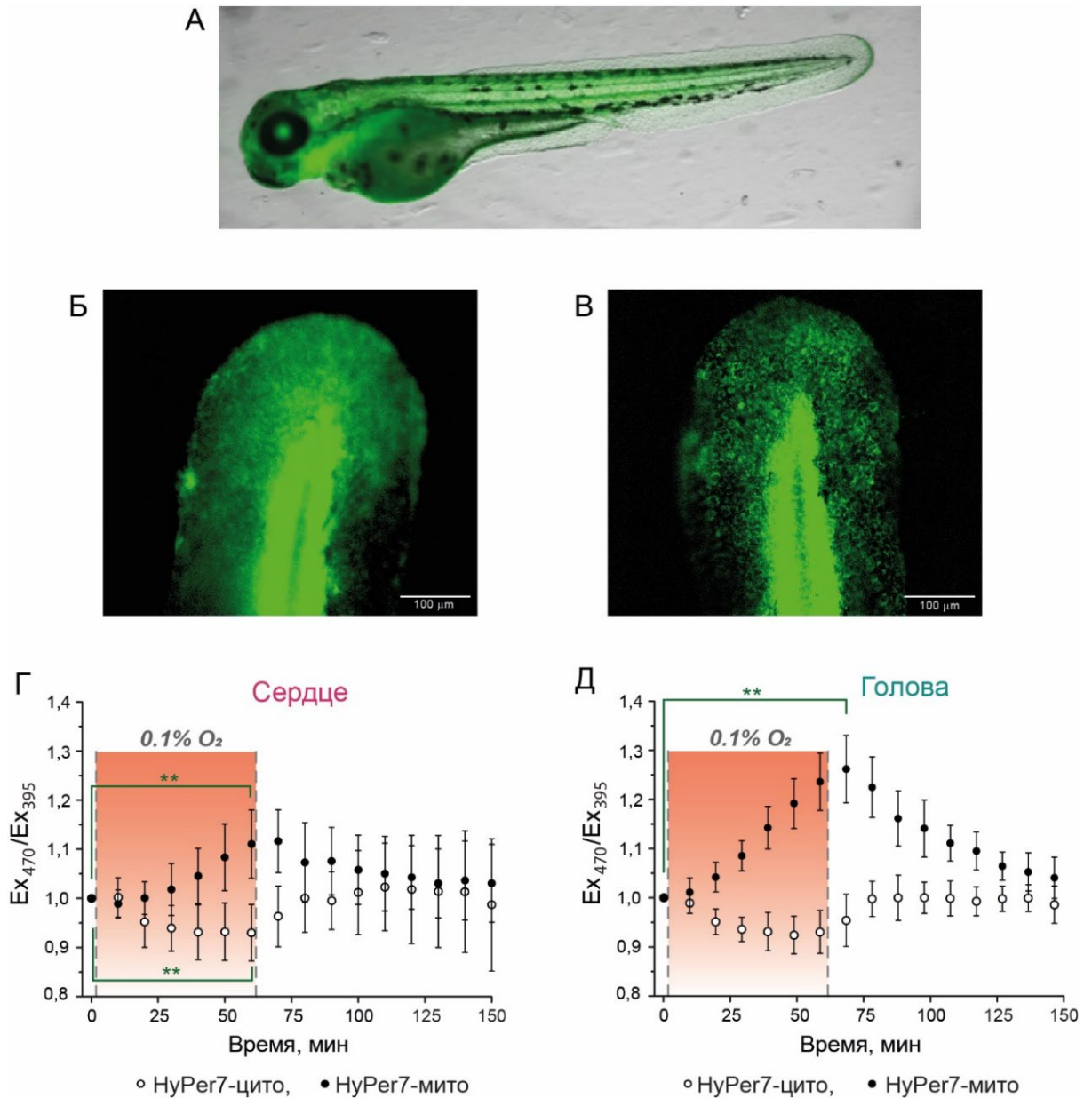


Рисунок 82. Динамика H_2O_2 (по сигналу биосенсора HuPer7) в тканях рыбы *D. rerio* в условиях гипоксии/реоксигенации. (А) Фотография двухдневного малька *D. rerio* с экспрессией гена HuPer7. (Б,В) Фотография хвостового плавника двухдневного малька с экспрессией (Б) цитозольной и (В) митохондриальной версий HuPer7 (Ex. 395 нм). (Г) Динамика сигнала HuPer7 и HuPer7-мито (Ex_{470}/Ex_{395}) 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 (Ex_{470}/Ex_{395}) 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.

Мы также исследовали динамику ацидоза в тканях *D. rerio* в используемой модели гипоксии с помощью рН-биосенсора SypHer3s. При 60 минутной гипоксии в рассматриваемых тканях мальков флуоресцентный сигнал биосенсора снижался на 60%. Биосенсор не содержал сигнальных последовательностей, поэтому регистрируемый сигнал соответствует цитозоллю клеток. Для того, чтобы перевести значения флуоресцентного сигнала SypHer3s в конкретные величины рН, мы применили ранее используемый нами подход на основе калибровочной кривой зависимости сигнала от величины рН, которую можно получить *in vitro* на белке или на культуре клеток. Поскольку в данной модели мы использовали микроскоп, а не оптическое волокно, то проще было получить кривую для клеточной культуры. Для этого мы снимали клетки HeLa Kyoto с экспрессией SypHer3s при тех же настройках микроскопа, что и для мальков *D. rerio* в эксперименте с гипоксией. Клетками заменяли среду на буфер с точным значением рН и содержанием смеси ионофоров нигерицина и монензина, что позволяет добиться быстрого баланса между внешним и внутриклеточным рН. По полученному графику на клетках (**рис. 83А,Б**) мы определили, что в нашей модели гипоксии внутриклеточный рН тканей мальков *in vivo* снижается с базового нормального значения ~ 7,2 до рН 6,6 в тканях области головы, рН 6,7 – в сердце; рН 6,8 – скелетных мышцах. Т.е. наиболее выраженный ацидоз характерен для нервной ткани. При последующей реоксигенации рН возвращался к исходному состоянию во всех регистрируемых областях (**рис. 83**).

Таким образом, как и у млекопитающих, ткани *D. rerio* испытывают развитие выраженного ацидоза при гипоксии. Примечательно, что внутриклеточная динамика рН у рыб при гипоксии более медленная по сравнению с динамикой рН в тканях мозга крыс при ишемии. В тканях крыс максимальное снижение рН мы наблюдали уже через несколько минут с момента окклюзии сосуда, в то время как в тканях рыб при практически полном отсутствии O_2 во внешней среде рН медленно снижался на протяжении всего часа воздействия. Это может объясняться особенностями используемых нами моделей, которые значительно различаются технически. Для рыб мы снижали O_2 в окружающей среде и регистрировали сигнал с поверхности объекта, для крыс ишемии тканей достигали перекрытием артерии и сигнал регистрировали непосредственно в клетках ткани, расположенной в бассейне этой артерии. Отличия могут быть обусловлены и биологическими свойствами самих объектов. И все же в острой фазе гипоксии в столь различающихся моделях *in vivo* мы обнаружили высокую степень сходства в динамике ацидоза и H_2O_2 .

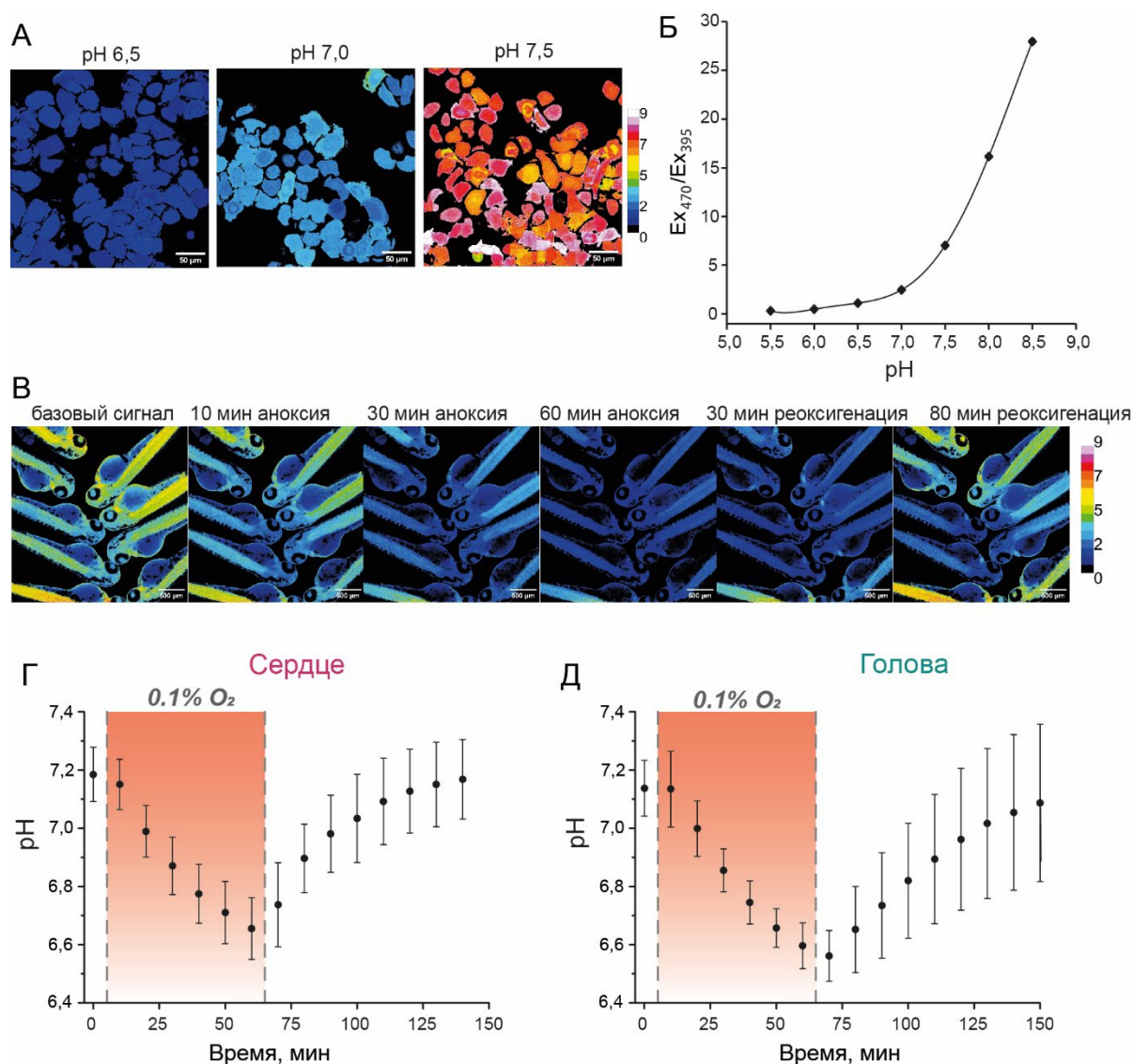


Рисунок 83. Динамика pH (по сигналу биосенсора *SypHer3s*) в тканях рыбы *D.rerio* в условиях гипоксии/реоксигенации. **(А)** Фотографии клеток *HeLa Kyoto* с экспрессией биосенсора *SypHer3s* в условиях разных значений pH окружающей среды. Псевдоцвета окраски клеток соответствуют значениям сигнала биосенсора (Ex_{470}/Ex_{395}). Линейка масштаба 50 мкм. **(Б)** График зависимости сигнала *SypHer3s* от значения pH, полученный на культуре клеток *HeLa Kyoto*. **(В)** Фотографии двухдневных мальков *D.rerio* с экспрессией биосенсора *SypHer3s* в условиях гипоксии; показаны кадры мальков до гипоксии и через 10, 30, 60 мин с момента начала гипоксии и через 30, 80 мин после реоксигенации. Псевдоцвета соответствуют значениям сигнала биосенсора, по которым затем определяли значения pH. Линейка масштаба 500 мкм. **(Г)** Динамика сигнала *SypHer3s* (Ex_{470}/Ex_{395}) в области сердца *D.rerio* в условиях гипоксии в течение 60 минут и последующей реоксигенации. Сигнал биосенсора нормализован и усреднен по 17 особям. Планки погрешностей обозначают стандартное отклонение среднего. **(Д)** Динамика *SypHer3s* (Ex_{470}/Ex_{395}) в аналогичных условиях в области головы *D.rerio*. Сигнал биосенсора нормализован и усреднен по 16 особям. Планки погрешностей обозначают стандартное отклонение среднего.

3.2.8. *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 эмбриона *D.rerio*. Для этого анестезированных мальков помещают под микроскоп и делают ампутацию кончиков хвостовых плавников. Генетически кодируемые биосенсоры позволяют в этой модели регистрировать события в тканях уже с первых секунд повреждения. Впервые Niethammer и коллеги применили в этой модели биосенсор HyPer [555] для регистрации H_2O_2 [682]. Они доставили ген биосенсора с помощью РНК, которую инъецировали в эмбрионы рыб. Локальное механическое повреждение в области хвостового плавника 3-х дневных мальков приводило к быстрому и значительному увеличению концентрации H_2O_2 в области раны. Примерно через 20 минут с момента повреждения сигнал биосенсора достигал максимальных значений. Биосенсор визуализировал распространяющийся градиент H_2O_2 ~ на 100-200 мкм вглубь ткани от области раны [682]. В этой модели также оценивали миграцию лейкоцитов с использованием флуоресцентных белков. Впервые было показано, что продукция H_2O_2 в области воспаления осуществляется эпителиальными клетками, и это событие предшествует появлению иммунных клеток в ране. Это изменило концепцию о том, что в области воспаления основными продуцентами АФК являются лейкоциты [839]. Авторы данного исследования с помощью фармакологических ингибиторов и генетических подходов выявили, что NADPH-оксидаза DUOX отвечает за образование H_2O_2 в клетках эпителия плавника *D.rerio* при его повреждении. Более того, ингибирование DUOX или нокдаун не только вызывают существенное снижение H_2O_2 в ране, но и значительно ослабляют приток лейкоцитов в область воспаления. Таким образом, H_2O_2 действует как хемоаттрактант для привлечения лейкоцитов в область воспаления. Данное исследование было опубликовано в журнале Nature [682].

С момента публикации описанного исследования десятки лабораторий по всему миру начали применять данную модель с использованием генетически кодируемых инструментов. В своем исследовании команда под руководством Yang визуализировала одновременно динамику H_2O_2 и NADPH с помощью биосенсоров HyPer-Red и iNap, продемонстрировав, что работа DUOX в тканях *D.rerio* приводит к увеличению H_2O_2 , но одновременно с этим DUOX расходует NADPH [647]. Команда под руководством Lieschke в данной модели продемонстрировала, что лейкоциты не только не выступают в качестве генераторов H_2O_2 , но наоборот участвуют в ее деградации, снижая градиент в области раны за счет миелопероксидазной реакции. Авторы использовали мутантные линии рыб, у которых либо вовсе отсутствовали лейкоциты, либо был характерен выраженный дефицит

миелопероксидазы. У таких животных в области раны также образовывался H_2O_2 , однако он сохранялся гораздо дольше по времени, при этом градиент распространялся гораздо дальше от края раны в ткани. Таким образом, миелопероксидаза участвует в устранении H_2O_2 в области воспаления и также ограничивает распространение градиента H_2O_2 [683]. На **рисунке 84** представлена схема известных на данный момент редокс-событий в области раны на модели *D.rerio*.

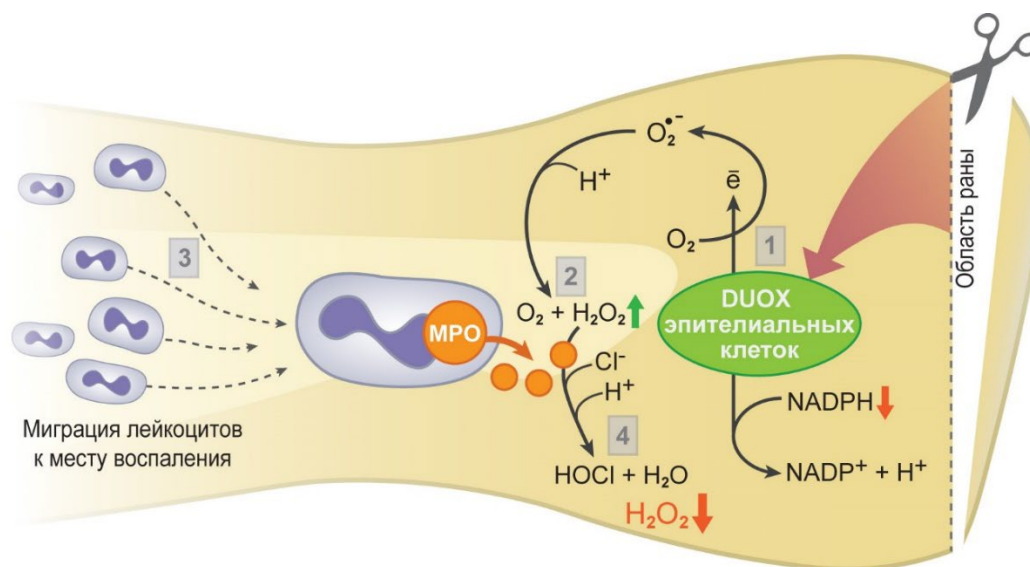


Рисунок 84. Схема редокс-событий в области воспаления в тканях хвостового плавника эмбриона *D.rerio*, вызванного механическим повреждением. 1 – ранение вызывает активацию DUOX в клетках эпителия. 2 – Образующийся O_2^- дисмутирует в H_2O_2 . 3 – в тканях формируется градиент H_2O_2 , привлекающий в область воспаления лейкоциты. 4 – в конечном итоге лейкоциты участвуют в деградации H_2O_2 , понижая градиент за счет миелопероксидазной (MPO) реакции.

Мы создали новый молекулярный инструмент Hupocrates, позволяющий визуализировать динамику продуктов миелопероксидазы. Динамика гипогалогенного стресса никогда 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: Hupocrates для регистрации гипогалогенных кислот и Huper-Red для регистрации H_2O_2 . Huper-Red представляет собой первый редокс-биосенсор с красной эмиссией флуоресценции (на основе пермутанта *srApple*). По своей чувствительности, селективности и кинетическим свойствам Huper-Red демонстрирует высокую степень сходства с версиями Huper на основе флуоресцентного ядра *srYFP* (версии Huper 1-3).

Данную серию экспериментов мы провели в сотрудничестве с лабораторией Sophie Vrız (Франция). Мы наработали мРНК с генами биосенсоров Hupocrates, контрольной версии HupocratesCS и Huper-Red. Смесь РНК в комбинациях Hupocrates+Huper-Red и

НурocratesCS+HyPer-Red инъецировали в оплодотворенные икринки *D. rerio*, визуализировав флуоресцентные сигналы обоих биосенсоров в тканях рыб на 2-е сутки. Перед микроскопией мальков анестезировали с помощью трикаина и зафиксировали в легкоплавкой агарозе. После этого проводили ампутацию кончика хвостовых плавников, сразу же регистрируя ответ биосенсоров. Оба биосенсора демонстрировали увеличение значений сигнала, достигая максимальных значений через 15 минут с момента повреждения. Однако затем флуоресценция HyPer-Red снижалась, отражая снижение H_2O_2 в системе, при этом сигнал Нурocrates изменялся в меньшей степени (рис. 85).

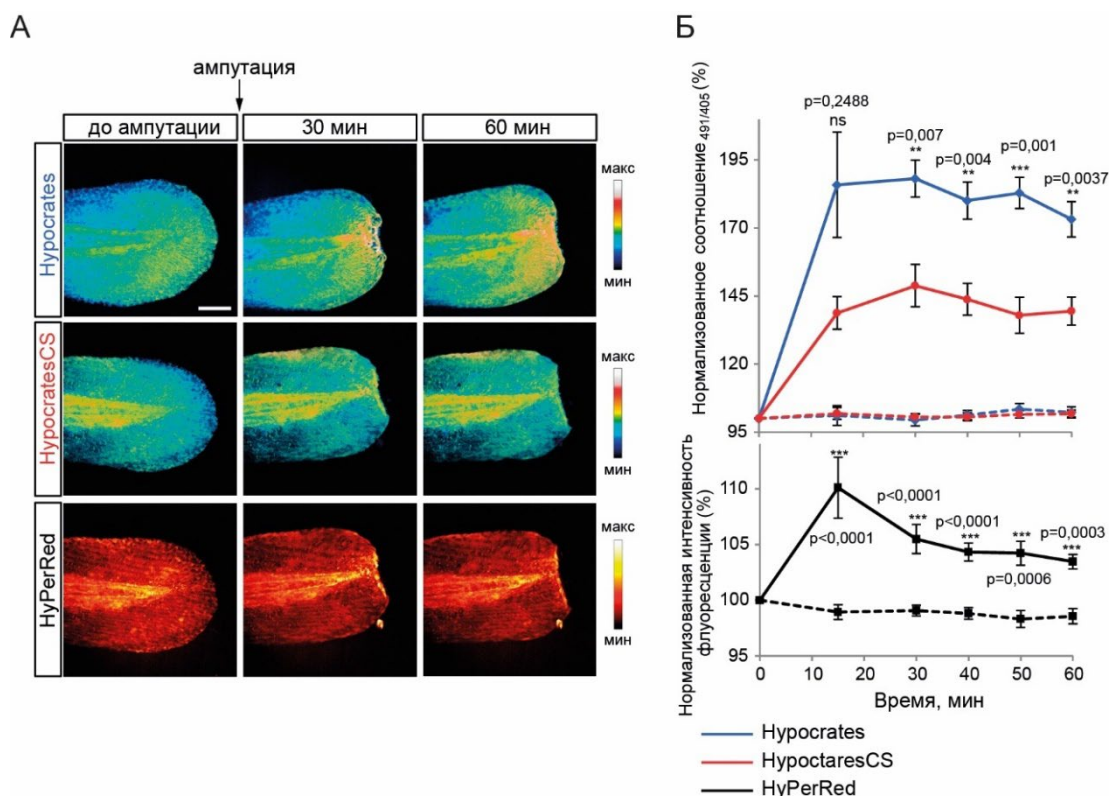


Рисунок 85. Динамика H_2O_2 и гипогалогенных кислот в очаге воспаления тканей *D. rerio*, вызванного механическим повреждением. **(А)** Визуализация хвостов *D. rerio* с помощью флуоресцентной микроскопии. Гены биосенсоров Нурocrates, НурocratesCS и HyPer-Red были доставлены в эмбрионы *D. rerio* с помощью мРНК. Моделировали воспаление на 2-е сутки с момента оплодотворения. Псевдоцвета отражают значения сигналов биосенсоров. Линейка масштаба 100 мкм. **(Б)** Динамика Нурocrates (синие линии), НурocratesCS (красные линии) и HyPer-Red (черные линии) в тканях *D. rerio* после ампутации кончика плавника. Значения нормализованы к исходным (до ампутации) значениям для каждого биосенсора. Сплошными линиями представлена временная динамика биосенсоров в поврежденных тканях, пунктирными – динамика биосенсоров в контрольных экспериментах без ампутации. Для обсчета значимости регистрируемых различий применяли двухфакторный дисперсионный анализ и тест Тьюки. На графике указаны средние значения, планки погрешностей обозначают стандартное отклонение среднего, $N = 4$ при $n \geq 3$ эмбрионов для Нурocrates и НурocratesCS, $N = 3$ при $n \geq 7$ эмбрионов для HyPer-Red. Для биосенсора Нурocrates статистическую значимость проверяли при сравнении со значениями НурocratesCS, для HyPer-Red – относительно значений в тканях контрольных неповрежденных эмбрионов. ** соответствует $P < 0,01$, *** соответствует $P < 0,001$, ns – отсутствует статистическая значимость.

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

ГЛАВА 4

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Редокс-биология – стремительно развивающееся направление современной биологии, которое охватывает изучение механизмов внутриклеточной редокс-регуляции. Изучение редокс-реакций с применением классических подходов аналитической химии всегда было сложной задачей для исследователей. Большинство редокс-активных низкомолекулярных компонентов клетки, образующихся в норме и патологии, демонстрируют чрезвычайно высокую реакционную способность и зачастую не могут быть выделены из клеток или тканей доступными для биохимиков методами. Более того, процесс получения экстрактов клеток или гомогенатов тканей сам по себе вызывает глобальные изменения редокс-параметров. Определение вторичных более стабильных продуктов редокс-реакций кажется очевидным решением проблемы. Загвоздка в том, что разные окислители, отличающиеся по происхождению в клетке, кинетическим параметрам, взаимодействиям с антиоксидантными системами могут приводить к образованию одинаковых модификаций для одних и тех же мишеней. Например, что отражает обнаруженная исследователем S-S связь в интересующем белке? Данная модификация образуется в результате окисления, но это слишком широкое понятие, поскольку такая модификация может произойти в результате гипогалогенного стресса с участием HOCl , NOBr или HOscN , или это может быть результат взаимодействия -SH группы белка с представителями активных форм кислорода или азота. Поэтому поиск подходов регистрации конкретных участников редокс-реакций с пространственно-временным разрешением всегда было актуальной задачей.

Появление методов оптической спектроскопии во многом способствовало развитию редокс-биологии. Первым примером регистрации редокс-параметра в живой системе можно считать работы Otto Warburg, который с коллегами описал структуры NAD^+ и NADH и обнаружил, что поглощение при 340 нм является характерной особенностью восстановленной формы [840]. Это свойство NADH , а также способность этой молекулы к флуоресценции, что впервые применили в качестве сигнала и описали как подход в 1957 году [841], легли в основу многочисленных работ по изучению метаболизма. В 1962 году группа Britton Chance впервые визуализировала флуоресценцию NADH для описания редокс-процессов *in vivo* в тканях мозга и почек анестезированной крысы [842]. Методы, основанные на собственной флуоресценции NADH и NADPH , в том числе с применением регистрации времени жизни флуоресценции остаются широко популярными и в наши дни [843]. Однако большинство химических участников редокс-процессов не обладают

флуоресцентными свойствами. В конце XX-го века началась активная работа по созданию флуоресцентных меток и красителей, позволяющих визуализировать редокс-реакции. В результате был получен обширный набор синтетических красок, которые при взаимодействии с окислителем изменяют спектральные характеристики. Такие красители можно применять в системах *in vitro* и некоторые из них в живых клетках в культуре. Главная трудность заключается в доставке таких красителей в живые клетки и особенно их направленной локализации в интересующем внутриклеточном компартменте. Еще более сложной и в большинстве случаев вовсе невыполнимой представляется задача по их доставке в ткани модельных организмов *in vivo*.

Открытие зеленого флуоресцентного белка (GFP) с последующей расшифровкой его гена совершили революцию в медико-биологических исследованиях – флуоресцентную метку стало возможным доставить практически в любые типы клеток и их органеллы. Для этого необходимо доставить ген белка в исследуемую систему, подобрав нужный промотор и сигнальную последовательность на N- или C-конце белка. Подходы трансгеноза позволили получить различные организмы с экспрессией генов GFP-подобных белков в интересующих исследователя тканях. Идея модифицировать FP была настолько очевидна, что за короткое время с момента открытия этих белков независимыми авторами со всего мира была создана обширная коллекция самых различных вариантов, отличающихся по свойствам. Среди идей было и создание FP, который бы чувствовал редокс-состояние внутриклеточной среды путем внесения в его структуру пары Cys, вовлеченных в тиол-дисульфидный обмен клетки. Редокс-чувствительный желтый белок, rxYFP [517], был опубликован лишь четырьмя годами позднее биосенсора Cameleon [535] – официально признанного первого генетически кодируемого биосенсора на основе FP для регистрации Ca^{2+} .

В настоящий момент коллекция генетически кодируемых редокс-биосенсоров на базе FP насчитывает несколько десятков различных вариантов (**таблица 3**). Однако существующие биосенсоры закрывают далеко не весь перечень внутриклеточных участников редокс-регуляции. Некоторые существующие молекулярные инструменты требуют оптимизации или получения версий с новыми свойствами под конкретные задачи исследований. Настоящая диссертационная работа посвящена разработке новых генетически кодируемых биосенсоров на основе FP, а также созданию новых подходов исследования биологических процессов в моделях *in vivo* с участием таких биосенсоров.

В частности, мы дополнили мировую коллекцию редокс-чувствительных флуоресцентных белков, создав первую версию с красной эмиссией флуоресценции. И хотя ранее уже был получен биосенсор rxRFP [616], разработанная нами версия красного

биосенсора представляет каноническую структуру, характерную для молекулярных инструментов данного типа, т.е. пара редокс-активных Cys интегрирована в структуру белка на соседние β -листы бочонка FP. В структуре gxRFP [616] пара Cys была добавлена на N- и C-концы пермутанта smApple, что, во-первых, делает gxRFP чувствительным ко многим воздействиям окружающей среды из-за структурных особенностей пермутированного белка с более открытым хромофором по сравнению с нативной структурой β -бочонка, а, во-вторых, такая организация структуры не позволяет добавить на N- или C-конец белка Grx, облегчающего тиол-дисульфидный обмен. В одной из работ показано, что окисление Grx1-roGFP2 в реакции с GSSG протекает минимум в 100 000 раз быстрее по сравнению с реакцией с участием одиночного roGFP2 [523].

В своей работе мы интегрировали пару редокс-активных Cys в структуру цельных RFP. За основы мы взяли mRuby2 [718], mKate2 [480] и mCherry [471], однако рабочая версия биосенсора получилась только на основе mCherry, которую мы назвали Grx1-roCherry, поскольку к FP через полипептидный линкер добавили Grx1. Помимо пары Cys в последовательность mCherry пришлось внести дополнительные мутации для получения оптимальных для работы характеристик. В частности, мы внесли дополнительный аминокислотный остаток после Cys150, провели случайный мутагенез по позиции 151, а также подобрали оптимальную последовательность линкера между FP и Grx, что позволило нам в итоге повысить яркость биосенсора и увеличить его максимальный диапазон ответа при окислении до 2 раз. Мы успешно протестировали Grx1-roCherry в различных клеточных моделях в комбинации с другими спектрально различающимися биосенсорами. Мы также получили версию на основе белка mKate2, Grx1-roKate, однако она по какой-то причине не восстанавливается в эукариотической системе, из-за необратимого ответа в клетках этот инструмент гораздо в меньшей степени представляет интерес по сравнению с Grx1-roCherry.

Независимо от нашей лаборатории другой научный коллектив чуть позднее нашей работы опубликовал еще одну версию редокс-чувствительного белка с эмиссией в красном диапазоне – gxRuby2 (Ex. 560 нм / Em. 600 нм), созданный на основе mRuby2 [656]. Как и Grx1-roCherry, gxRuby2 демонстрирует интенсифицированный тип сигнала с максимальной амплитудой ответа $\sim 30\%$. Наличие в среде Grx увеличивает скорость реакции gxRuby2 с GSSG, при этом Grx не влияет на скорость восстановления сигнала окисленной пробы. Но по какой-то причине авторы не соединили в единой белковой конструкции полученный редокс-чувствительный белок с Grx, поэтому он уступает по кинетическим параметрам другим версиями данного семейства биосенсоров, которые

связаны с Grx напрямую через линкер. Прямое сравнение gxmRuby2 с gxYFP также демонстрирует более низкую чувствительность красной версии [656].

Таким образом, в настоящий момент коллекция редокс-чувствительных белков представлена двумя красными версиями: Grx1-roCherry и gxmRuby2. Редокс-потенциал этих двух белков отличается. Биосенсор gxmRuby2 демонстрирует более высокий потенциал со значением - 265 мВ [656] по сравнению с созданным нами Grx1-roCherry, для которого значение этого параметра составляет - 310 мВ. Таким образом, gxmRuby2 по этому параметру ближе к gxYFP (- 261 мВ) [517], что также ограничивает использование этой версии в условиях с выраженной окисляющей средой, например, люмене эндоплазматического ретикулума. E_{GSH} в этом компартменте составляет примерно -208 мВ [610]. Поэтому получение красной версии roFP с более высоким значением потенциала по-прежнему является актуальной задачей.

В заключении хотелось бы еще раз обсудить селективность редокс-чувствительных FP. Несмотря на то, что изначально подобные инструменты рассматривались в качестве индикаторов редокс-состояния пула глутатиона, с которым они вступают в реакции тиол-дисульфидного обмена, все же наличие поверхностных редокс-активных Cys делает такие белки хорошими мишенями для многих высокореактивных компонентов клетки. Например, мы показали, что Grx1-roCherry и Grx1-roGFP2 чувствительны к производным гипогалогенных кислот, это также подтверждается независимыми работами других авторов [624,654]. При избыточных и в большинстве случаев нерелевантных для биологических систем концентрациях H_2O_2 (500 мкМ на 40 нМ белка) и $O_2^{\bullet-}$ (в продуцируемой системе 50 мкМ ксантина + 0,25 U/мл ксантиноксидазы на 40 нМ белка) Grx1-roGFP2 демонстрирует ответ, который, однако, даже при указанных концентрациях не достигает даже половины от максимального диапазона ответа. Grx1-roCherry к тому же демонстрирует ответ при избыточных концентрациях $\cdot NO$ (100 мкМ донора МАНМА NONOate на 40 нМ белка). Биосенсор gxmRuby2 окисляется при избыточных концентрациях H_2O_2 (250 мкМ на 5 мкМ белка) и $ONOO^-$ (100 мкМ на 5 мкМ белка) [656]. Основанный на пермутанте FP биосенсор gxRFP демонстрирует высокую чувствительность к $O_2^{\bullet-}$ (1 мкМ на 1 мкМ белка) и $ONOO^-$ (10 мкМ на 1 мкМ белка) [616]. Однако следует отметить, что появление в системе всех перечисленных редокс-активных компонентов сказывается и на редокс-состоянии пула глутатиона. Поэтому при исследовании долгосрочных эффектов roFP вероятнее отражают именно редокс-состояние глутатиона. Однако при применении этих инструментов для исследования динамики острых процессов, например, воспалительных, при которых производится большое количество активных форм галогенов и кислорода, необходимо

иметь ввиду, что такие высокореактивные соединения могут окислять roGFP напрямую, что важно учитывать при интерпретации результатов.

Красная версия биосенсора позволяет его комбинировать с другими биосенсорами, коллекция которых в настоящий момент в основном представлена зелеными белками. В настоящей работе мы комбинировали разработанный нами Grx1-roCherry с зеленым аналогом Grx1-roGFP2. Такой подход исследования более информативен, поскольку позволяет отслеживать динамику редокс-процессов одновременно в разных компартментах клетки. В частности, мы показали, что именно митохондриальный пул глутатиона чувствителен к добавлению к клеткам диметилфумарата. Интересные результаты мы получили с применением молекулярного инструмента DAAO (оксидаза D-аминокислот), позволяющего направленно производить H_2O_2 в исследуемой системе. При локализации DAAO в ядре клетки и образовании в этом компартменте H_2O_2 происходит окисление как в цитозоле, так и в митохондриальном матриксе клеток, т.е. окислительный стресс развивается повсеместно при окислении ядра. Если этот же генератор H_2O_2 локализовать в митохондриях, например, в культивируемых нейронах, выделенных из эмбрионов мыши, окисление детектируется как в самом матриксе, так и цитозоле. Но для онкоклеток на примере линии HeLa Kyoto распространения H_2O_2 из митохондрий в цитозоль не наблюдается. Мы установили, что ограничивающим окисление фактором в этих клетках является Trx-зависимая система, поскольку при ингибировании TrxR ауранофином наблюдаемый эффект снимается. Эти результаты наглядно показывают, как отличается редокс-регуляция онкоклеток от здоровых. В другой серии экспериментов с помощью биосенсоров мы показали, как активация пируватдегидрогеназного комплекса с помощью дихлорацетата вызывает существенные изменения в редокс-статусе онкоклеток HeLa Kyoto, использующих преимущественно аэробный гликолиз. Важно, что воздействие дихлорацетата не оказывало эффекта на клетки эмбрионального происхождения HEK293, поддерживающие свой метаболизм в большей степени благодаря окислительному фосфорилированию. Мы применяли соединения с уже известными свойствами, поскольку перед нами стояла первостепенная задача в проведении тестирования нового биосенсора Grx1-roCherry, в том числе в режиме мультипараметрической регистрации в комбинации с уже известными биосенсорами. Однако, описываемые подходы могут быть успешно применены и для поиска новых лекарственных средств, влияющих на метаболизм и редокс-сигналинг клеток.

Еще один биосенсор, который мы разработали, позволяет визуализировать динамику гипогалогенных кислот и их производных. Идея создания такого биосенсора родилась в свете увеличивающегося количества открываемых белковых доменов в природе, для

которых была показана их специфическая модификация продуктами гипогалогенного стресса. Мы взяли один из таких белков NemR из *E.coli* и интегрировали в его структуру *cpYFP*. Принцип биосенсора основан на том, что NemR модифицируется в условиях гипогалогенного стресса, это вызывает конформационные изменения в его структуре, которые, в свою очередь, передаются на флуоресцентную часть. Новый биосенсор, который мы назвали Hurocrates, демонстрирует радиометрическое изменение сигнала в 1,8 раз в присутствии различных (псевдо)гипогалогенных кислот HOCl, HOBr, HO SCN, а также производных, например, хлораминов. Поэтому Hurocrates является первым генетически кодируемым биосенсором для регистрации (псевдо)гипогалогенных кислот и их производных. Судя по всему, в реальных биологических условиях также образуется смесь различных продуктов активных форм галогенов, которые конвертируются друг в друга. Hurocrates демонстрирует изменение ответа в присутствии аналитов в диапазоне концентраций 0,1-0,3 мкМ (при концентрации биосенсора 0,5 мкМ), такой чувствительности хватает для использования инструмента в клеточных культурах и *in vivo*. В биологических системах сложно оценить концентрацию таких реакционноспособных соединений, которые быстро реагируют со своим окружением. Но, по некоторым оценкам, в локальных сайтах воспаления концентрация HOCl может достигать нескольких единиц мМ [844]. Получив константы скорости реакций Hurocrates с различными аналитами, можно сделать вывод, что биосенсор предпочтительнее взаимодействует с более стабильными и селективными производными гипогалогенных кислот, например, хлораминами, как N-хлоротаурин, который в больших концентрациях содержится в нейтрофилах.

Мы протестировали Hurocrates по отношению к широкой панели биологически значимых окислителей. Лишь ONOO⁻ вызывает значимый радиометрический ответ, поэтому в некоторых системах в качестве контроля следует использовать ингибиторы NO-синтаз. Другим недостатком Hurocrates является его чувствительность к изменениям pH в физиологическом диапазоне, что свойственно многим биосенсорам на основе *cpYFP*. Поэтому в качестве контроля мы разработали версию HurocratesCS, у которой редокс-активный Cys355, ответственный за взаимодействие с окислителем, заменен на Ser. Таким образом, HurocratesCS не чувствителен к продуктам гипогалогенного стресса, но в остальном демонстрирует аналогичные свойства, в том числе pH-чувствительность.

Нам удалось расшифровать пространственную структуру HurocratesCS – это первый в истории успешный случай для редокс-биосенсора на основе *cpYFP*. Благодаря данным, полученным нами в ходе рентгеноструктурного анализа, удалось выявить интересные особенности работы биосенсора. В частности, Asn95 играет важнейшую роль в сопряжении

сенсорного домена NemR и флуоресцентного *srYFP*, этот остаток формирует контакты как с аминокислотными остатками хромофорного окружения, так и с остатками подвижной петли NemR, куда как раз был интегрирован FP. Мы считаем, что знания об этих структурных особенностях позволят в дальнейшем получить версии *Hyocrates* с улучшенными свойствами, например, увеличенной амплитудой ответа, стабильностью сигнала к изменениям pH или концентрации ONOO^- . Эти результаты могут представлять интерес при разработках подходов оптимизации и других редокс-биосенсоров, основанных на *srYFP*.

Впервые с помощью биосенсоров *Hyocrates* и *HyPer-Red* мы визуализировали одновременно динамику гипогалогенного стресса и H_2O_2 в тканях *D.rerio* в модели воспаления, вызванного ампутацией кончика хвостового плавника. Сразу же с момента повреждения мы наблюдали в тканях увеличение H_2O_2 и продуктов миелопероксидазной реакции, максимальных изменений сигнала оба биосенсора достигали ~ через 15 минут с момента образования раны. Однако затем концентрация H_2O_2 постепенно снижалась, а уровень гипогалогенных кислот изменялся в меньшей степени. В дальнейшем мы будем проводить исследования на этой модели уже с трансгенными линиями рыб, у которых биосенсоры будут локализованы в нейтрофилах, что позволит нам соотнести динамику АФК и АФГ как в самих нейтрофилах, так и в тканях их окружения по мере миграции к воспалительному очагу.

Большой блок работ мы посвятили исследованиям воздействия гипоксии на динамику H_2O_2 и pH в разных биологических моделях. Жизнь всех аэробных организмов зависит от содержания O_2 в окружающей среде. O_2 выступает в роли конечного акцептора электронов в процессе дыхания, поэтому снижение его уровня, что характеризуется состоянием гипоксии или аноксии при полном прекращении доступа, приводит к тяжелым для клеток последствиям, что и лежит в основе многих заболеваний. При некоторых заболеваниях гипоксия может быть умеренной, но с длительным воздействием, например, при хронической болезни почек. При остановке сердца, развитии дыхательной недостаточности, нарушении местного кровотока в результате сужения или закупорки сосуда возникает острая гипоксия, которая приводит к повреждению тканей за считанные минуты. Ишемический инсульт головного мозга и инфаркт миокарда – наиболее известные примеры тяжелых заболеваний, в основе которых острая недостаточность O_2 . Несмотря на то, что современной науке и медицине известны многие аспекты механизмов ишемического повреждения тканей, по-прежнему в этой области остается достаточное количество «белых пятен», затрудняющих разработку эффективных подходов лечения. Так, например, обстоит дело с представлением о реальной картине событий, происходящих в ишемизированных

тканях с участием редокс-активных соединений. До сих пор нет единого мнения о роли АФК в патогенезе таких заболеваний. Научным сообществом признается, что окислительный стресс, основными маркерами которого являются АФК, является главным повреждающим фактором. Но и по сей день ведутся дискуссии по поводу временных периодов образования АФК и времени их жизни в клетках, главных АФК-продуцирующих систем и, в целом, остается неизвестным, какие из представителей АФК или других редокс-активных соединений вносят наибольший вклад в повреждение внутриклеточных структур при ишемии [86,768–777,791–793,845–850].

Стремительное развитие в области разработок генетически кодируемых биосенсоров открывает новые возможности для исследователей редокс-процессов в норме и патологии, поскольку некоторые из существующих биосенсоров без преувеличения представляют собой безальтернативный подход исследований роли некоторых короткоживущих соединений с высокой реакционной способностью в биологических процессах *in vivo*. Среди таких биосенсоров – представители обширного семейства НuPer, позволяющие визуализировать динамику концентрации H_2O_2 . H_2O_2 является биологически значимым и самым стабильным представителем АФК, который выполняет как функцию важной сигнальной молекулы, так и является маркером окислительного стресса при избыточных неконтролируемых в клетке концентрациях. С помощью биосенсоров данного класса мы решили ответить на вопрос: какова динамика H_2O_2 в различных клетках при гипоксии и последующей реоксигенации? Мы сосредоточились на патогенезе ишемического повреждения, выбрав для исследований ткани мозга и сердца среди наиболее чувствительных к снижению концентрации O_2 .

Мы моделировали условия гипоксии культивируемым нейронам, полученным из эмбрионов мыши. Для этого мы создали установку, которая позволяет очень быстро и точно контролировать уровень O_2 . Совмещение установки с флуоресцентным микроскопом и использование высокочувствительного биосенсора НuPer7 позволило нам регистрировать динамику H_2O_2 в клетках в режиме реального времени в ходе изменений концентрации O_2 в среде. Мы не обнаружили в нейронах предполагаемого всплеска H_2O_2 ни при гипоксии, ни при последующей реоксигенации. Наоборот, при гипоксии в нейронах мы наблюдали снижение базового уровня H_2O_2 . Схожую картину динамики H_2O_2 при гипоксии мы получили для культивируемых неонатальных кардиомиоцитов, выделенных из эмбрионов крыс. Гипоксия также вызывала плавное падение сигнала НuPer7 в этих клетках. Однако неонатальные кардиомиоциты демонстрируют ряд биохимических и морфологических отличий по сравнению со зрелыми типами кардиомиоцитов, что, безусловно, должно влиять и на особенности внутриклеточных редокс-процессов. Действительно, оказалось,

что при аналогичных условиях воздействия гипоксии/реоксигенации зрелые кардиомиоциты крыс в культуре демонстрировали абсолютно иную динамику H_2O_2 по сравнению с неонатальными клетками. В зрелых кардиомиоцитах на стадии гипоксии происходило достаточно быстрое (в пределах нескольких минут) увеличение сигнала NuPer7, что свидетельствовало о продукции H_2O_2 в системе. Выявив существенную разницу между зрелыми и неонатальными кардиомиоцитами по динамике H_2O_2 , мы провели серию экспериментов при сотрудничестве с группой Браже Н.А. (МГУ им. Ломоносова, ИБХ РАН) с использованием подхода Рамановской микроспектрометрии. Получив спектры комбинационного рассеяния света в условиях гипоксии и нормоксии для неонатальных и зрелых кардиомиоцитов и проанализировав изменения интенсивности пиков, соответствующих типам и состоянию цитохромов, мы установили, что неонатальные кардиомиоциты отличаются от зрелых следующим: 1) меньшим количеством компонентов дыхательной цепи и, следовательно, меньшим количеством митохондрий; 2) менее эффективной дыхательной цепью. Эти данные объясняют наблюдаемую нами разницу в динамике H_2O_2 в условиях гипоксии. При заданных условиях в зрелых кардиомиоцитах происходит дополнительная загрузка электрон-транспортной цепи, что увеличивает вероятность утечки электронов на O_2 с образованием $O_2^{\cdot-}$ и в дальнейшем H_2O_2 . Неонатальные кардиомиоциты гораздо в меньшей степени используют окислительное фосфорилирование для поддержания энергетического баланса, и потому вероятность образования H_2O_2 в них оказывается меньше. Ранее в других исследованиях также было показано, что по мере созревания кардиомиоцитов в тканях сердца млекопитающих увеличивается экспрессия митохондриальных белков и, в целом, клетки преимущественно переходят на окислительное фосфорилирование [819,851]. Наши данные подтверждают и тот ранее установленный факт, что неонатальные ткани сердца способны поддерживать метаболизм (следовательно, выживаемость) гораздо в лучшей степени в условиях гипоксии по сравнению с клетками сердца взрослых организмов [852]. Это явление имеет фундаментальный биологический смысл, поскольку сердце плода млекопитающих может испытывать сниженные концентрации O_2 , и клетки вынуждены адаптироваться к таким условиям. Затем уже после рождения и по мере развития метаболизм перестраивается.

При работе с клеточными культурами в моделях гипоксии важно иметь в виду, что разные типы клеток организма в реальных условиях органов и тканей имеют разный доступ к O_2 . Для некоторых типов клеток сниженный уровень O_2 в окружающей среде является нормальным физиологическим состоянием. Известно, что ткани человека испытывают достаточно широкий диапазон концентраций O_2 . Средний уровень O_2 в тканях находится в пределах 2–9% O_2 / 14–65 мм рт. ст. для разных органов [853,854]. Очевидно, что клетки

дыхательной системы являются наиболее оксигенированными в организме, для них pO_2 может составлять от 101 до 104 мм рт. ст. ($\sim 14\% O_2$) [855]. Оксигенация тканей органов зависит от их расположения в организме и интенсивности кровоснабжения. Доступность O_2 для клеток может отличаться даже в пределах одного органа. Например, градиент O_2 между разными клетками в тканях такого метаболически активного органа, как сердце, составляет от 2 до 6% [854]. Другой пример — скелетные мышцы, которые после сокращения могут увеличить потребность в O_2 в несколько раз по сравнению с состоянием покоя. Уровень оксигенации в покоещихся клетках скелетных мышц составляет $\sim 2\text{--}2,5\% O_2$ [856,857]. В тканях мозга, самого энергозатратного органа, оксигенация также неравномерна [858]. В мозге тканевое pO_2 может различаться на несколько процентов между поверхностными слоями коры и более глубокими структурами. Диапазон может изменяться от 5% до менее 1% O_2 [858–860]. Различные типы стволовых клеток во взрослом возрасте также поддерживаются в условиях умеренной гипоксии [861]. Неудивительно, что в костном мозге, который является основным источником гемопоэтических и мезенхимальных стволовых клеток, наблюдается самый низкий уровень оксигенации, составляющий 1,3% O_2 ($\sim 9,9$ мм рт. ст.) [862].

Таким образом, разные типы клеток в организме уже находятся в разных условиях концентрации O_2 , поэтому гипоксия может по-разному влиять на клетки, даже если они находятся в пределах одного органа. В этом заключается основная сложность в изучении воздействия гипоксии на живые системы. При работе с культивируемыми клетками определенного типа сложно воспроизвести соответствующий уровень оксигенации, который был бы эквивалентен их физиологической среде *in vivo*. Это, конечно, не означает, что клетки в культуре получают такой же уровень O_2 , сколько его содержится в атмосфере (около 21% O_2 / 160 мм рт. ст.), потому что на доступность O_2 в среде влияют многие параметры, но все же клетки в культуре находятся в гораздо более оксигенированных условиях, чем в тканях *in vivo*. Сейчас все чаще признают необходимость воспроизведения физиологического уровня O_2 для исследуемого типа клеток в культуре [780]. Но дело не только в разнице уровней O_2 в окружении сравниваемых клеток *in vitro* в культуре и *in vivo* в тканях живых организмов. Важно учитывать, что при гипоксии органы реагируют как на клеточном уровне (например, снижение интенсивности энергопотребляемых процессов, переключение метаболизма с окислительного фосфорилирования на гликолиз), так и физиологическом уровне (например, изменения в работе сосудистой системы, усиление эритропоэза). Такие комплексные ответы ткани на разных уровнях трудно или чаще вовсе невозможно воспроизвести в моделях *in vitro* [863–867]. Поэтому мы поставили вопрос о выяснении реальной динамики H_2O_2 в условиях тканей *in vivo* при гипоксии.

Для исследования воздействия гипоксии на нервную ткань *in vivo* мы выбрали модель ишемического инсульта у крыс путем окклюзии средней мозговой артерии, этот подход признан золотым стандартом при моделировании инсульта головного мозга [716,868,869]. Традиционно для изучения клеточных параметров головного мозга в норме и при развитии заболеваний применяют биохимические, морфологические и электрофизиологические подходы исследований. Позже в практику биомедицинских исследований вошли такие информативные методы диагностики мозга, как магнитно-резонансная и позитронно-эмиссионная виды томографии. Огромный вклад в развитие нейробиологии вносит доступный на сегодняшний день арсенал оптических методов, позволяющих визуализировать структурные и биохимические изменения в клетках головного мозга с высоким пространственным и временным разрешением [870–876]. Однако динамика многих биохимических процессов *in vivo* в тканях мозга по-прежнему скрыта для исследователей, особенно если речь идет о редоксах-процессах с участием соединений с высокой реакционной способностью и, следовательно, коротким временем жизни (временная шкала в пределах миллисекунд и секунд). Появление генетически кодируемых биосенсоров нового поколения позволяет решать такие задачи.

Цикл работ, посвященных *in vivo* регистрации биохимических событий в тканях мозга грызунов, мы выполняли в сотрудничестве с лабораторией Желтикова А.М. (МГУ им Ломоносова). На базе лаборатории фотоники и нелинейной спектроскопии была создана установка оптоволоконного нейроинтерфейса, позволяющая проводить длительную регистрацию флуоресцентного сигнала в глубоких слоях мозга одновременно по нескольким флуоресцентным каналам и координатам. Крысам линии SHR в структуру хвостатое ядро обоих полушарий мы инъектировали суспензию вирусных частиц AAV с геном интересующего биосенсора. Выбор области мозга для экспрессии гена биосенсора мы выбирали таким образом, чтобы флуоресцирующая ткань оказывалась в центральной части ишемического повреждения. В эти же области сразу после инъекции вируса мы имплантировали оптические волокна, которые закрепляли на черепе через специальный керамический адаптер для последующего подключения к оптическому кабелю, ведущему в оптическую схему. Примерно через месяц в тканях мозга мы регистрировали выраженный флуоресцентный сигнал биосенсора. Дальнейшие эксперименты предполагали моделирование ишемического инсульта у крыс путем окклюзии средней мозговой артерии при непрерывной регистрации флуоресцентного сигнала на протяжении всех хирургических манипуляций, последующего периода ишемии и реперфузии. Данный подход позволил регистрировать внутриклеточные события в тканях мозга крыс в центральной части развивающегося инсульта с первых секунд патогенеза.

Развитие ацидоза в ишемизированной ткани – главная трудность, с которой мы столкнулись на начальном этапе этой работы. Как мы уже неоднократно обсуждали, флуоресцентные белки из-за химической особенности хромофора демонстрируют зависимость интенсивности флуоресценции от рН. Факт, что при инсульте в тканях мозга снижается значение рН, известен давно [786,787,877]. Регистрацию изменений рН в тканях головного мозга при ишемии неоднократно осуществляли ранее с использованием различных подходов. Среди них синтетические флуоресцентные рН-индикаторы, которые применяли в поверхностных тканях мозга анестезированных животных [878,879]. Визуализация рН тканей возможна с помощью магнитно-резонансной и позитронно-эмиссионной видов томографии [880–884]. Испытывая нехватку O_2 , клетки, как правило, пытаются адаптироваться переходом от окислительного фосфорилирования митохондрий к анаэробному гликолизу. В этих условиях гидролиз АТФ, полученный гликолитическим путем, и отсутствие последующих стадий окисления пирувата приводят в клетке к накоплению лактата и H^+ .

Сравнивая развитие ацидоза при гипоксии в цитозоле и матриксе митохондрий нейронов в культуре, наиболее выраженный эффект снижения рН мы обнаружили в цитозоле. Поэтому для исследования динамики ацидоза в нейронах *in vivo* мы выбрали цитозольную версию *SypHer3s*. С первых же секунд окклюзии средней мозговой артерии у крыс мы визуализировали резкое снижение рН в цитозоле нейронов очага инсульта. В среднем рН снижался от значений $\sim 7,25$ до рН $\sim 6,7$ менее чем за 5 минут с момента остановки кровоснабжения. Важное отличие динамики рН *in vivo* при ишемическом инсульте от наблюдаемой динамики в культивируемых нейронах при гипоксии/реоксигенации заключалось в том, что рН в тканях мозга крыс долго оставался пониженным после реперфузии, при этом во всех используемых нами клеточных моделях рН быстро возвращался к исходным значениям сразу после реоксигенации.

Ожидаемо, что столь выраженное изменение рН в системе полностью перекрывает целевой сигнал большинства биосенсоров на основе FP. В частности, в описываемой модели инсульта *in vivo* мы так и не смогли использовать биосенсоры *HyPer-3* [561] для регистрации H_2O_2 и *SoNar* [641] для регистрации соотношения $NAD^+/NADH$. Однако позднее был разработан *HyPer7* для регистрации динамики H_2O_2 , который отвечает требованиям биосенсора нового поколения: яркий, высокочувствительный к регистрируемому аналиту, демонстрирует высокие кинетические параметры, при этом сигнал не зависит от колебаний рН в физиологическом диапазоне [562]. Если некоторые подходы регистрации рН в тканях мозга уже существовали ранее, и поэтому применение нами рН-биосенсора *SypHer3s* является по сути лишь дополнением к арсеналу таких

методов, то прямых подходов регистрации редокс-активных соединений в тканях головного мозга лабораторных животных не существовало. Локализованный в матриксе митохондрий нейронов HyPer7 продемонстрировал *in vivo* небольшое увеличение концентрации H_2O_2 как на стадии ишемии, так и при реперфузии. Однако наибольший по амплитуде ответ HyPer7 был обнаружен в нейронах поврежденной области лишь на следующие сутки. Учитывая высокую чувствительность биосенсора к H_2O_2 (в нМ диапазоне), можно сделать вывод, что вопреки распространенному мнению выраженной генерации H_2O_2 в нейронах в острой фазе ишемического инсульта не обнаружено. Примечательно, что динамика изменения H_2O_2 в тканях *in vivo* при ишемическом повреждении и в культуре клеток в модели гипоксии/реоксигенации отличалась, что демонстрирует плохую корреляцию редокс-событий между системами *in vitro* и *in vivo*.

Мы также провели серию экспериментов, где в тканях мозга крыс HyPer7 локализовали в митохондриях астроцитов. Поскольку нейроны и астроциты различаются по некоторым редокс-параметрам [885–887], мы предположили, что и в условиях стресса эти клетки могут демонстрировать разную динамику H_2O_2 . В острой фазе инсульта в астроцитах, как и в нейронах, мы не обнаружили выраженного всплеска H_2O_2 . В обоих типах клеток *in vivo* существенное изменение сигнала HyPer7 мы наблюдали, начиная с 12 часов с момента окклюзии артерии, при этом сигнал HyPer7 демонстрировал в астроцитах большее изменение сигнала по сравнению с нейронами. Несмотря на то, что астроциты по своему редокс-статусу характеризуются более восстанавливающей внутриклеточной средой по сравнению с нейронами, в условиях ишемии они испытывают более выраженное окисление на следующие сутки. Известно, что астроциты способны защищать нейроны от окислительного стресса посредством разных механизмов [798–803]. В этом контексте выглядит логичным, что эти клетки, расходуя больше восстановительных эквивалентов и других ресурсов при поддержке нейронов, сами испытывают более выраженный окислительный стресс.

Отсутствие выраженной продукции H_2O_2 в поврежденных ишемией тканях мозга животных противоречит устоявшимся теориям о патогенезе этого заболевания. И все же минимальные изменения сигнала высокочувствительного биосенсора HyPer7 нами были зарегистрированы в момент ишемии/реперфузии. Судя по всему, небольшие количества H_2O_2 все же образуются в системе, но пик основного производства приходится на более поздние стадии патогенеза. Мы поставили следующий вопрос: будет ли тяжесть инсульта коррелировать с большей продукцией H_2O_2 на ранних этапах патогенеза? Многие метаболические состояния, опосредованные, как правило, сопутствующими заболеваниями, увеличивают риск ишемического инсульта и влияют на тяжесть острого

состояния и дальнейшие последствия. Например, в группу повышенного риска входят люди с высоким уровнем глюкозы в крови – важным маркером сахарного диабета, однако состояние гипергликемии может быть и без диабета. Важно, что именно высокий гликемический статус влияет на динамику и степень выраженности ишемического инсульта, это неоднократно было подтверждено как в клинической практике, так и на животных моделях [810,888,889]. Считается, что высокий гликемический статус усиливает окислительный стресс при инсульте [889,890]. Предложены механизмы, посредством которых высокий уровень глюкозы приводит к увеличению продукции редокс-активных низкомолекулярных соединений. Например, в одной из работ утверждается, что нейрональная NADPH-оксидазная активность, рассматриваемая в качестве основного источника $O_2^{\cdot-}$ при реперфузии, зависит от концентрации глюкозы в крови [891]. В другой работе это также подтверждается наблюдением выраженного окислительного стресса и увеличения экспрессии субъединиц NADPH-оксидаз в тканях мозга крыс с высоким гликемическим статусом после моделирования ишемического инсульта [892]. Вызванные высоким уровнем глюкозы редокс-изменения в клетках могут быть опосредованы сигнальными путями с участием протеинкиназы C [893,894], каскадом ERK1/2 [895]. Эффект гипергликемии может быть обусловлен не только воздействием на АФК-продуцирующие системы клетки, но и подавлением антиоксидантных систем, в частности, функций Trx [896] и Prx [897]. В свете вышеизложенных фактов логично предположить, что более тяжелые последствия инсульта при гипергликемии могут быть связаны с усилением окислительного стресса. Поэтому в модели ишемического инсульта у крыс с гипергликемическим статусом мы ожидали обнаружить более выраженную продукцию H_2O_2 в острой фазе патогенеза. Однако с помощью биосенсора HyPer7 и техники оптоволоконного интерфейса у крыс с высоким содержанием глюкозы в крови ($31,7 \text{ mM} \pm 2,2 \text{ s.d.}$), вызванном разовой инъекцией стрептозотоцина, мы не обнаружили отличий в динамике H_2O_2 ни в острой фазе ишемического инсульта, ни на следующие сутки. При этом у животных с высоким уровнем глюкозы объем повреждения мозга при ишемии оказался увеличенным ~ в 2,6 раз по сравнению с животными с нормальным уровнем глюкозы в крови. Гипергликемия действительно усугубляет последствия инсульта, но не через повышенную продукцию H_2O_2 .

Важно помнить, что в наших исследованиях мы работали с биосенсором HyPer7, флуоресцентный сигнал которого отражает динамику H_2O_2 . При этом H_2O_2 , хоть и является одним из маркеров окислительного стресса, все же не всегда играет ключевую роль во внутриклеточном повреждении. Состояние окислительного стресса, судя по всему, не обязательно сопровождается образованием H_2O_2 . Ключевым повреждающим фактором при

патогенезе инсульта может быть продукция $\cdot\text{NO}$, который при повышенном образовании $\text{O}_2\cdot^-$ в системе, конвертируется в ONOO^- [898,899]. При ишемии/реперфузии характерно увеличение продуктов перекисного окисления липидов [795,900]. Эти биохимические события не могут быть визуализированы с помощью биосенсора HyPer7. Преимущество таких биосенсоров заключается как раз в том, что они позволяют направленно исследовать роль конкретного соединения в биологическом процессе. Вне всякого сомнения, разработка новых биосенсоров позволит уже в скором времени составить точную карту редокс-событий, происходящих в различных клетках нервной системы в норме и патологии. В некоторых случаях требуется оптимизация свойств уже существующих биосенсоров. Например, мы получили первый в истории генетически кодируемый биосенсор Nurocrates для визуализации гипогалогенного стресса. В представленной модели инсульта мы наблюдаем выраженные окислительные процессы через 24 часа с момента начала ишемии, это может быть обусловлено уже вторичными редокс-событиями, связанными, например, с активацией клеток микроглии в тканях мозга или попаданием в область нейтрофилов в результате нарушения гематоэнцефалического барьера. Указанные типы клеток обладают миелопероксидазной активностью, поэтому особенно интересно было бы узнать роль активных форм галогенов в патогенезе инсульта. Однако применение биосенсора Nurocrates ограничено в модели инсульта *in vivo* из-за свойственной большинству биосенсоров на основе *cpYFP* чувствительности к изменениям pH в системе. Однако HyPer7 тоже создан на базе *cpYFP*, при этом его ратиометрический сигнал стабилен в достаточно широком диапазоне pH изменений. На сегодняшний день мы обладаем достаточными сведениями о функционировании биосенсоров на основе FP, что позволяет направленно модифицировать их свойства. Нашим коллективом уже ведутся работы по оптимизации свойств Nurocrates. Кроме того, для Nurocrates, первого среди редокс-биосенсоров, была расшифрована структура с помощью рентгеноструктурного анализа. Поэтому в скором времени мы ожидаем получение Nurocrates нового поколения, новая версия позволит решить задачу регистрации динамики продуктов миелопероксидазы в тканях мозга *in vivo* при развитии ишемического инсульта. Это позволит установить роль еще одного класса редокс-активных компонентов в исследуемом патогенезе.

Исследование редокс-процессов требует создания не только новых биосенсоров, позволяющих выявлять роль различных аналитов в том или ином процессе, но также важно развитие новых технических подходов и внедрение новых экспериментальных моделей. Мы обсудили, как появление новых генетически кодируемых флуоресцентных биосенсоров в сочетании с техникой оптоволоконного интерфейса уже позволяет получать большие объемы качественной информации о биохимических процессах в головном мозге

лабораторных грызунов. Регистрацию сигнала биосенсора можно проводить по нескольким координатам мозга, сравнивать процессы в разных его структурах, клетках и их компартментах. Но данная техника применима именно для изучения мозга, поскольку волокна имплантируют в нужную область ткани и прочно фиксируют на кости черепа. В результате волокно стабильно закреплено и не смещается при движении животного, а также при проведении манипуляций, в том числе хирургических. Однако применение оптоволоконного интерфейса осложнено в мягких подвижных тканях. Доступ к органам брюшной полости *in vivo* обеспечивают с помощью абдоминальных окон [691,901], через которые можно регистрировать флуоресцентный сигнал. Однако этот подход имеет ряд ограничений, флуоресцентный сигнал должен быть очень ярким, зачастую требуются системы для мультифотонного возбуждения хромофора, под абдоминальным окном сложно или в большинстве случаев невозможно выполнять необходимые манипуляции.

Существуют животные модели инфаркта миокарда. Подход регистрации флуоресценции в тканях сердца *in vivo* реализуем [902] и был применен, например, для визуализации динамики Ca^{2+} [903]. Однако процедура моделирования инфаркта достаточно инвазивна и подразумевает проведение операции непосредственно на открытом сердце во время регистрации сигнала. Мы детектировали, как быстро Нурег7 окисляется в тканях изолированного мозга крысы *ex vivo* при контакте с атмосферой. Поэтому, чтобы предотвратить искажение результатов важно было подобрать неинвазивную *in vivo* модель гипоксии сердца. Для этой цели мы выбрали модельный организм рыбу *Danio rerio*, одно из ее преимуществ заключается в прозрачности тканей, что позволяет визуализировать различные органы без повреждений. Простота манипуляций с этим объектом, в том числе получение животных с экспрессией генов нужных молекулярных инструментов, сделали *D.rerio* широко популярным объектом для медико-биологических исследований. *D.rerio* уже активно применяют в исследованиях воздействия гипоксии на различные органы и ткани [833–836]. В большинстве опубликованных работ на эту тему изучают долговременные последствия, вызванные гипоксией. В нашем исследовании мы сосредоточились на динамике параметров именно в острой фазе патогенеза. Для создания контролируемых условий гипоксии для мальков *D.rerio* мы использовали ту же установку, что и для клеточных культур.

С помощью биосенсора SypHer3s в тканях *D.rerio* мы также наблюдали повсеместное развитие ацидоза при гипоксии, рН в среднем снижался на 0,4 – 0,6 единиц. Наименьшее снижение (на ~ 0,4 единицы) мы наблюдали в скелетных мышцах. Возможно, лучшая устойчивость мышц к ацидозу обусловлена повышенным содержанием соединений, выполняющих роль буферных систем, например, карнозиноподобных

пептидов. Миоглобин, который содержится в мышцах, выступает в роли депо O_2 , тем самым поддерживая некоторое время активность дыхательной цепи в условиях недостатка O_2 . В нашем эксперименте мальки были анестезированы с помощью трикаина, поэтому в тканях мышц отсутствовало сокращение, что следует иметь в виду при сравнении этих данных, например, с показателями сердца, которое продолжало сокращаться. Поэтому небольшая разница в динамике pH между сократительными клетками сердца и скелетными мышцами при гипоксии может быть обусловлена разной интенсивностью потребления внутриклеточных ресурсов, в том числе O_2 , в результате разной активности. Наиболее выраженный ацидоз (снижение pH на $\sim 0,6$) мы наблюдали в области головы рыбы, где находится наиболее энергопотребляющая нервная ткань.

Мы также получили рыб с повсеместной экспрессией гена биосенсора *NuPer7* для регистрации H_2O_2 . Пользуясь преимуществом простоты манипуляции с данным объектом, мы сравнили динамику сигнала биосенсора в цитозоле и митохондриальном матриксе. Динамика H_2O_2 в этих компартментах в условиях гипоксии оказалась противоположно направленной в исследуемых тканях: происходило снижение базового уровня H_2O_2 в цитозоле и наоборот повышение в матриксе митохондрий. Наиболее выраженные отличия вновь оказались характерны для нервной ткани. Примечательно, что H_2O_2 образуется в матриксе митохондрий при гипоксии, при этом не проникает в цитозоль и при восстановлении уровня O_2 в норму в этом же компартменте и нейтрализуется.

Представленная нами модель острой гипоксии на *D. rerio* имеет широкие перспективы для дальнейших применений. Исследуемая нами динамика ацидоза и H_2O_2 в тканях рыб при гипоксии хорошо коррелирует с данными, которые мы получили на модели инсульта у крыс. При этом манипуляции с *D. rerio*, в частности, их подготовка к эксперименту и проведение микроскопии, технически не сложнее, чем работа с первичными клеточными культурами (в нашем случае на примере нейронов и кардиомиоцитов). Объект *D. rerio*, сочетая в себе преимущества *in vivo* модели, позволяет масштабировать постановку задач и получать больше информации за одну серию экспериментов. Сигнал биосенсора можно одновременно регистрировать в нескольких областях, получая информацию о динамике одного и того же биохимического процесса одновременно в нескольких органах. Небольшие размеры рыб позволяют в одной серии эксперимента наблюдать одновременно за несколькими особями, что обеспечивает быстрое накопление данных. В результате такой подход гораздо менее затратен по всем параметрам (временным, финансовым) по сравнению с моделями на млекопитающих. За короткий промежуток времени можно получить данные по нескольким группам животных, варьируя разными типами биосенсоров и их локализациями, добавляя в исследования новые

параметры, например, при тестировании новых веществ, влияющих на динамику изучаемых процессов. Обнаруженные эффекты на *D. rerio* могут в дальнейшем более прицельно изучаться на моделях млекопитающих. Как и с любым другим *in vivo* объектом при работе с *D. rerio* важно помнить о некоторых особенностях этого организма, которые нужно учитывать при интерпретации результатов. Например, для *D. rerio* характерна высокая регенеративная способность. По этой причине в наших исследованиях мы проводили сравнения динамики процессов в тканях *D. rerio* с другими используемыми моделями лишь в острой фазе воздействия гипоксии. На более поздних стадиях поврежденные ткани *D. rerio* восстанавливаются гораздо быстрее, чем у млекопитающих.

Подведем итоги. За последние два десятилетия генетически кодируемые биосенсоры на основе FP во многом изменили наше представление в области редокс-биологии. Уникальность этих инструментов заключается в их биологической природе, что позволяет на уровне гена доставлять такие биосенсоры практически в любые объекты исследования и визуализировать динамику интересующего биохимического параметра в целостной системе любого уровня сложности: от внутриклеточных органелл живой клетки до тканей живого трансгенного организма. В качестве сенсорных доменов используют белки, которые в живых клетках уже выполняют функции сенсора на определенные биохимические или физические параметры внутри- или внеклеточной среды. Такие сенсорные модули в живых системах являются результатом миллионов лет эволюции. А потому этим белкам свойственна специфичность и чувствительность к аналиту в диапазонах значимых для клеток концентраций. Используя такие природные сенсорные домены, можно получать инструменты для визуализации событий, которые еще совсем недавно были скрыты от исследователей. Применение разных биосенсоров на определенные параметры позволило пересмотреть сам термин «редокс-состояние». Биологические системы не ограничены общим восстанавливающим или общим окисляющим состоянием, это всегда сеть сложных редокс-взаимодействий. Наглядным примером может послужить исследование на плодовой мухе *D. melanogaster*, в тканях которой на разных стадиях развития с помощью биосенсоров были показаны удивительные редокс-особенности, например, оказалось, что повышение концентрации H_2O_2 не обязательно совпадает с окислением пула глутатиона, эти параметры могут меняться независимо [665]. С каждым годом растет количество опубликованных работ, в которых биосенсоры применяют в качестве основных методов исследований. Регулярно нашим коллективом и нашими коллегами [619,662,904,905] публикуются обзорные статьи с целью актуализировать состояние мировой коллекции биосенсоров.

Безусловно, сфера разработок и применения генетически кодируемых биосенсоров продолжит свое стремительное развитие, следуя запросам современных медико-биологических исследований. Несмотря на обширную современную коллекцию биосенсоров, некоторые участники редокс-реакций по-прежнему остаются «неуловимыми» для исследователей, и их роли в биологических процессах научному сообществу еще предстоит выяснять. Среди таких пока «неуловимых» участников можно назвать $O_2^{\cdot-}$ и HO^{\cdot} . Также необходимо создание биосенсоров, построенных по классическому принципу, для регистрации $^{\cdot}NO$, $ONOO^-$ и H_2S , которые были бы просты в использовании. Существующие версии не нашли широкого применения в практике. До недавнего времени не было биосенсоров для регистрации продуктов гипогалогенного стресса. Созданный нами биосенсор Нурocrates теперь позволят выполнять такие задачи. Нурocrates демонстрирует изменение сигнала при взаимодействии с различными (псевдо)гипогалогенными кислотами и их производными. Однако в будущем было бы полезно создать инструменты, которые позволили бы по отдельности визуализировать динамику $HOCl$, $HOBr$, $HOscN$, производные аминов, учитывая, что, судя по всему, данные соединения могут оказывать разный биологический эффект.

Кроме создания принципиально новых биосенсоров, также необходимо разрабатывать версии уже существующих, которые отличаются по разным свойствам. Это обеспечивает возможность выбора подходящего инструмента для решения конкретной задачи. Так появились целые семейства биосенсоров для регистрации H_2O_2 , глутатиона, $NAD(H)$, где версии отличаются по чувствительности, редокс-потенциалу, кинетическим и спектральным параметрам и т.д. Создание спектрально различающихся версий биосенсора особенно актуально для развития мультипараметрических подходов регистрации сигналов, что позволяет либо комбинировать разные типы биосенсоров в пределах одной системы, либо версии одного и того же биосенсора локализовать в разных компартментах или разных типах клеток. Так, редокс-чувствительные флуоресцентные белки на сегодняшний день представлены полной цветовой палитрой. Наш вклад в эту область заключается в создании первой красной версии.

За редким исключением оптимизация свойств биосенсоров в большинстве случаев происходит с применением подходов случайного мутагенеза и налаживанием последующего скрининга для отбора нужной версии. Очевидно, что подход создания молекулярных инструментов также будет совершенствоваться. Сегодня мы наблюдаем, как во все сферы нашей жизни стремительно входят технологии, основанные на искусственном интеллекте. В будущем такие технологии позволят эффективнее и быстрее моделировать структуры создаваемых химерных белков, определять ключевые позиции в их структурах,

отвечающих за изменения свойств. Для этого необходимо создавать коллекции расшифрованных пространственных структур уже существующих и зарекомендовавших себя биосенсоров. На сегодняшний день таких работ очень мало. Например, версия созданного нами биосенсора HurocratesCS представляет собой первый редокс-биосенсор на основе srYFP, для которого пространственная структура была определена. Больше информации о структурах таких белков позволит выявить общие закономерности, что повысит вероятность успеха при создании новых биосенсоров и оптимизации существующих.

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 межкомpartmentных 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 cpYFP. На примере контрольной версии Нурocrates впервые расшифрована пространственная структура редокс-биосенсора на основе cpYFP.
3. Биосенсоры SupHer3s (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 H₂O₂, зрелые кардиомиоциты наоборот демонстрируют продукцию H₂O₂. 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 ЦИТИРУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

- [1] A. Trebst. Energy conservation in photosynthetic electron transport of chloroplasts. *Annu Rev Plant Physiol* 25 (1974) 423–458. doi: 10.1146/annurev.pp.25.060174.002231.
- [2] Y. Hatefi. The mitochondrial electron transport and oxidative phosphorylation system. *Annu Rev Biochem* 54 (1985) 1015–1069. doi: 10.1146/annurev.bi.54.070185.005055.
- [3] B. Chance, G.R. Williams. Respiratory enzymes in oxidative phosphorylation. I. Kinetics of oxygen utilization., *J Biol Chem* 217 (1955) 383–393.
- [4] G. Loschen, L. Flohé, B. Chance. Respiratory chain linked H₂O₂ production in pigeon heart mitochondria. *FEBS Lett* 18 (1971) 261–264. doi: 10.1016/0014-5793(71)80459-3.
- [5] H. Sies. 1 - Oxidative stress: Introductory remarks, in: H. Sies (Ed.), *Oxidative Stress*, Academic Press, London, 1985: pp. 1–8. doi: 10.1016/B978-0-12-642760-8.50005-3.
- [6] W. Dröge. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev* 82 (2002) 47–95. doi: 10.1152/physrev.00018.2001.
- [7] G. Storz, J.A. Imlay. Oxidative stress. *Curr Opin Microbiol* 2 (1999) 188–194. doi: 10.1016/s1369-5274(99)80033-2.
- [8] H. Sies, C. Berndt, D.P. Jones. Oxidative stress. *Annu Rev Biochem* 86 (2017) 715–748. doi: 10.1146/annurev-biochem-061516-045037.
- [9] H. Sies. Findings in redox biology: From H₂O₂ to oxidative stress. *J Biol Chem* 295 (2020) 13458–13473. doi: 10.1074/jbc.X120.015651.
- [10] H. Sies, B. Chance. The steady state level of catalase compound I in isolated hemoglobin-free perfused rat liver. *FEBS Lett* 11 (1970) 172–176. doi: 10.1016/0014-5793(70)80521-x.
- [11] B. Chance, H. Sies, A. Boveris. Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol Rev* 59 (1979) 527–605. doi: 10.1152/physrev.1979.59.3.527.
- [12] O. Loew. A new enzyme of general occurrence in organisms. *Science* 11 (1900) 701–702. doi: 10.1126/science.11.279.701.
- [13] G.C. Mills. Hemoglobin catabolism. I. Glutathione peroxidase, an erythrocyte enzyme which protects hemoglobin from oxidative breakdown., *J Biol Chem* 229 (1957) 189–197.
- [14] L. Flohé, S. Toppo, L. Orian. The glutathione peroxidase family: Discoveries and mechanism. *Free Radic Biol Med.* 187 (2022) 113–122. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2022.05.003.
- [15] J.M. McCord, I. Fridovich. Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte hemoglobin., *J Biol Chem* 244 (1969) 6049–6055.
- [16] K. Kim, I.H. Kim, K.Y. Lee, S.G. Rhee, E.R. Stadtman. The isolation and purification of a specific “protector” protein which inhibits enzyme inactivation by a thiol/Fe(III)/O₂ mixed-function oxidation system., *J Biol Chem* 263 (1988) 4704–4711. doi: 10.1016/s0021-9258(18)68840-4.
- [17] H.Z. Chae, K. Robison, L.B. Poole, G. Church, G. Storz, S.G. Rhee. Cloning and sequencing of thiol-specific antioxidant from mammalian brain: alkyl hydroperoxide reductase and thiol-specific antioxidant define a large family of antioxidant enzymes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91 (1994) 7017–7021. doi: 10.1073/pnas.91.15.7017.
- [18] S.G. Rhee. Overview on Peroxiredoxin. *Mol Cells* 39 (2016) 1–5. doi: 10.14348/molcells.2016.2368.
- [19] A. Perkins, K.J. Nelson, D. Parsonage, L.B. Poole, P.A. Karplus. Peroxiredoxins: guardians against oxidative stress and modulators of peroxide signaling. *Trends Biochem Sci* 40 (2015) 435–445. doi: 10.1016/j.tibs.2015.05.001.
- [20] J. Schultz, K. Kaminker. Myeloperoxidase of the leucocyte of normal human blood. I. Content and localization. *Arch Biochem Biophys* 96 (1962) 465–467. doi: 10.1016/0003-9861(62)90321-1.

- [21] S.J. Klebanoff, A.J. Kettle, H. Rosen, C.C. Winterbourn, W.M. Nauseef. Myeloperoxidase: a front-line defender against phagocytosed microorganisms. *J Leukoc Biol* 93 (2013) 185–198. doi: 10.1189/jlb.0712349.
- [22] A.R. Cross, A.W. Segal. The NADPH oxidase of professional phagocytes--prototype of the NOX electron transport chain systems. *Biochim Biophys Acta* 1657 (2004) 1–22. doi: 10.1016/j.bbabi.2004.03.008.
- [23] W.M. Nauseef. How human neutrophils kill and degrade microbes: an integrated view. *Immunol Rev* 219 (2007) 88–102. doi: 10.1111/j.1600-065X.2007.00550.x.
- [24] B.M. Babior, J.D. Lambeth, W. Nauseef. The neutrophil NADPH oxidase. *Arch Biochem Biophys* 397 (2002) 342–344. doi: 10.1006/abbi.2001.2642.
- [25] F.D. Oakley, D. Abbott, Q. Li, J.F. Engelhardt. Signaling components of redox active endosomes: the redoxosomes. *Antioxid Redox Signal* 11 (2009) 1313–1333. doi: 10.1089/ars.2008.2363.
- [26] A. Vermot, I. Petit-Härtlein, S.M.E. Smith, F. Fieschi. NADPH oxidases (NOX): an overview from discovery, molecular mechanisms to physiology and pathology. *Antioxidants (Basel)* 10 (2021). doi: 10.3390/antiox10060890.
- [27] K. Bedard, K.-H. Krause. The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. *Physiol Rev.* 87 (2007) 245–313. doi: 10.1152/physrev.00044.2005.
- [28] L.I. Leichert, T.P. Dick. Incidence and physiological relevance of protein thiol switches., *Biol Chem* 396 (2015) 389–399. doi: 10.1515/hsz-2014-0314.
- [29] N. Brandes, S. Schmitt, U. Jakob. Thiol-based redox switches in eukaryotic proteins. *Antioxid Redox Signal* 11 (2009) 997–1014. doi: 10.1089/ars.2008.2285.
- [30] M. Deponate, C.H. Lillig. Enzymatic control of cysteinyl thiol switches in proteins. *Biol Chem* 396 (2015) 401–413. doi: 10.1515/hsz-2014-0280.
- [31] M. Lo Conte, K.S. Carroll. The redox biochemistry of protein sulfenylation and sulfinylation. *J Biol Chem* 288 (2013) 26480–26488. doi: 10.1074/jbc.R113.467738.
- [32] N. Gould, P.-T. Doulias, M. Tenopoulou, K. Raju, H. Ischiropoulos. Regulation of protein function and signaling by reversible cysteine S-nitrosylation. *J Biol Chem* 288 (2013) 26473–26479. doi: 10.1074/jbc.R113.460261.
- [33] J.M. Denu, K.G. Tanner. Specific and reversible inactivation of protein tyrosine phosphatases by hydrogen peroxide: evidence for a sulfenic acid intermediate and implications for redox regulation. *Biochemistry* 37 (1998) 5633–5642. doi: 10.1021/bi973035t.
- [34] S.-R. Lee, K.-S. Kwon, S.-R. Kim, S.G. Rhee. Reversible inactivation of protein-tyrosine phosphatase 1B in A431 cells stimulated with epidermal growth factor. *J Biol Chem* 273 (1998) 15366–15372. doi: 10.1074/jbc.273.25.15366.
- [35] E. Giannoni, F. Buricchi, G. Raugei, G. Ramponi, P. Chiarugi. Intracellular reactive oxygen species activate Src tyrosine kinase during cell adhesion and anchorage-dependent cell growth. *Mol Cell Biol* 25 (2005) 6391–6403. doi: 10.1128/MCB.25.15.6391-6403.2005.
- [36] M. Qi, E.A. Elion. MAP kinase pathways. *J Cell Sci* 118 (2005) 3569–3572. doi: 10.1242/jcs.02470.
- [37] R. Bretón-Romero, C. González de Orduña, N. Romero, F.J. Sánchez-Gómez, C. de Álvaro, A. Porras, F. Rodríguez-Pascual, J. Laranjinha, R. Radi, S. Lamas. Critical role of hydrogen peroxide signaling in the sequential activation of p38 MAPK and eNOS in laminar shear stress. *Free Radic Biol Med* 52 (2012) 1093–1100. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2011.12.026.
- [38] A. Nguyen, P. Chen, H. Cai. Role of CaMKII in hydrogen peroxide activation of ERK1/2, p38 MAPK, HSP27 and actin reorganization in endothelial cells. *FEBS Letters* 572 (2004) 307–313. doi: 10.1016/j.febslet.2004.06.061.
- [39] H. Cai, Z. Li, M.E. Davis, W. Kanner, D.G. Harrison, S.C.J. Dudley. Akt-dependent phosphorylation of serine 1179 and mitogen-activated protein kinase/extracellular

- signal-regulated kinase 1/2 cooperatively mediate activation of the endothelial nitric-oxide synthase by hydrogen peroxide. *Mol Pharmacol* 63 (2003) 325–331. doi: 10.1124/mol.63.2.325.
- [40] R. Colavitti, G. Pani, B. Bedogni, R. Anzevino, S. Borrello, J. Waltenberger, T. Galeotti. Reactive oxygen species as downstream mediators of angiogenic signaling by vascular endothelial growth factor receptor-2/KDR. *J Biol Chem* 277 (2002) 3101–3108. doi: 10.1074/jbc.M107711200.
- [41] P.V. Usatyuk, S. Vepa, T. Watkins, D. He, N.L. Parinandi, V. Natarajan. Redox regulation of reactive oxygen species-induced p38 MAP kinase activation and barrier dysfunction in lung microvascular endothelial cells. *Antioxid Redox Signal* 5 (2003) 723–730. doi: 10.1089/152308603770380025.
- [42] A. Ramachandran, D. Moellering, Y.-M. Go, S. Shiva, A.-L. Levonen, H. Jo, R.P. Patel, S. Parthasarathy, V.M. Darley-Usmar. Activation of c-Jun N-terminal kinase and apoptosis in endothelial cells mediated by endogenous generation of hydrogen peroxide. *Biol Chem* 383 (2002) 693–701. doi: 10.1515/BC.2002.071.
- [43] T. Oba, C. Kurono, R. Nakajima, T. Takaishi, K. Ishida, G.A. Fuller, W. Klomkleaw, M. Yamaguchi. H₂O₂ activates ryanodine receptor but has little effect on recovery of releasable Ca²⁺ content after fatigue. *J Appl Physiol* 93 (2002) 1999–2008. doi: 10.1152/jappphysiol.00097.2002.
- [44] M.A. Soto, C. González, E. Lissi, C. Vergara, R. Latorre. Ca(2+)-activated K⁺ channel inhibition by reactive oxygen species. *Am J Physiol Cell Physiol* 282 (2002) C461–471. doi: 10.1152/ajpcell.00167.2001.
- [45] H. Liu, R. Colavitti, I.I. Rovira, T. Finkel. Redox-dependent transcriptional regulation. *Circ Res* 97 (2005) 967–974. doi: 10.1161/01.RES.0000188210.72062.10.
- [46] H. Choi, S. Kim, P. Mukhopadhyay, S. Cho, J. Woo, G. Storz, S.E. Ryu. Structural basis of the redox switch in the OxyR transcription factor. *Cell* 105 (2001) 103–113. doi: 10.1016/s0092-8674(01)00300-2.
- [47] R.F. Furchgott, J.V. Zawadzki. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 288 (1980) 373–376. doi: 10.1038/288373a0.
- [48] L.J. Ignarro, R.E. Byrns, G.M. Buga, K.S. Wood. Endothelium-derived relaxing factor from pulmonary artery and vein possesses pharmacologic and chemical properties identical to those of nitric oxide radical. *Circ Res* 61 (1987) 866–879. doi: 10.1161/01.res.61.6.866.
- [49] S.H. Francis, J.L. Busch, J.D. Corbin, D. Sibley. cGMP-dependent protein kinases and cGMP phosphodiesterases in nitric oxide and cGMP action. *Pharmacol Rev* 62 (2010) 525–563. doi: 10.1124/pr.110.002907.
- [50] P.-T. Doulias, J.L. Greene, T.M. Greco, M. Tenopoulou, S.H. Seeholzer, R.L. Dunbrack, H. Ischiropoulos. Structural profiling of endogenous S-nitrosocysteine residues reveals unique features that accommodate diverse mechanisms for protein S-nitrosylation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107 (2010) 16958–16963. doi: 10.1073/pnas.1008036107.
- [51] T.A. Heinrich, R.S. da Silva, K.M. Miranda, C.H. Switzer, D.A. Wink, J.M. Fukuto. Biological nitric oxide signalling: chemistry and terminology. *Br J Pharmacol* 169 (2013) 1417–1429. doi: 10.1111/bph.12217.
- [52] G.I. Giles, K.M. Tasker, C. Jacob. Hypothesis: the role of reactive sulfur species in oxidative stress. *Free Radic Biol Med* 31 (2001) 1279–1283. doi: 10.1016/s0891-5849(01)00710-9.
- [53] E. Schröder, J.A. Littlechild, A.A. Lebedev, N. Errington, A.A. Vagin, M.N. Isupov. Crystal structure of decameric 2-Cys peroxiredoxin from human erythrocytes at 1.7 Å resolution. *Structure* 8 (2000) 605–615. doi: 10.1016/s0969-2126(00)00147-7.
- [54] B. Biteau, J. Labarre, M.B. Toledano. ATP-dependent reduction of cysteine-sulphinic acid by *S. cerevisiae* sulphiredoxin. *Nature* 425 (2003) 980–984. doi: 10.1038/nature02075.

- [55] R.O.J. Beauchamp, J.S. Bus, J.A. Popp, C.J. Boreiko, D.A. Andjelkovich. A critical review of the literature on hydrogen sulfide toxicity. *Crit Rev Toxicol* 13 (1984) 25–97. doi: 10.3109/10408448409029321.
- [56] L. Li, M. Bhatia, Y.Z. Zhu, Y.C. Zhu, R.D. Ramnath, Z.J. Wang, F.B.M. Anuar, M. Whiteman, M. Salto-Tellez, P.K. Moore. Hydrogen sulfide is a novel mediator of lipopolysaccharide-induced inflammation in the mouse. *FASEB J* 19 (2005) 1196–1198. doi: 10.1096/fj.04-3583fje.
- [57] C. Dello Russo, G. Tringali, E. Ragazzoni, N. Maggiano, E. Menini, M. Vairano, P. Preziosi, P. Navarra. Evidence that hydrogen sulphide can modulate hypothalamo-pituitary-adrenal axis function: in vitro and in vivo studies in the rat. *J Neuroendocrinol* 12 (2000) 225–233. doi: 10.1046/j.1365-2826.2000.00441.x.
- [58] W. Zhao, J. Zhang, Y. Lu, R. Wang. The vasorelaxant effect of H₂S as a novel endogenous gaseous K(ATP) channel opener. *EMBO J* 20 (2001) 6008–6016. doi: 10.1093/emboj/20.21.6008.
- [59] A.P. Fernandes, A. Holmgren. Glutaredoxins: glutathione-dependent redox enzymes with functions far beyond a simple thioredoxin backup system. *Antioxid Redox Signal* 6 (2004) 63–74. doi: 10.1089/152308604771978354.
- [60] J.-F. Collet, J. Messens. Structure, function, and mechanism of thioredoxin proteins. *Antioxid Redox Signal* 13 (2010) 1205–1216. doi: 10.1089/ars.2010.3114.
- [61] C.H. Lillig, C. Berndt, A. Holmgren. Glutaredoxin systems. *Biochim Biophys Acta* 1780 (2008) 1304–1317. doi: 10.1016/j.bbagen.2008.06.003.
- [62] F.Q. Schafer, G.R. Buettner. Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple. *Free Radic Biol Med* 30 (2001) 1191–1212. doi: 10.1016/S0891-5849(01)00480-4.
- [63] H.J. Forman, H. Zhang, A. Rinna. Glutathione: overview of its protective roles, measurement, and biosynthesis. *Mol Aspects Med* 30 (2009) 1–12. doi: 10.1016/j.mam.2008.08.006.
- [64] R. Brigelius-Flohé, M. Maiorino. Glutathione peroxidases. *Biochim Biophys Acta* 1830 (2013) 3289–3303. doi: 10.1016/j.bbagen.2012.11.020.
- [65] M. Deponce. Glutathione catalysis and the reaction mechanisms of glutathione-dependent enzymes. *Biochim Biophys Acta* 1830 (2013) 3217–3266. doi: 10.1016/j.bbagen.2012.09.018.
- [66] H. Sies. Oxidative stress: a concept in redox biology and medicine. *Redox Biol* 4 (2015) 180–183. doi: 10.1016/j.redox.2015.01.002.
- [67] H. Sies. Oxidative eustress: On constant alert for redox homeostasis. *Redox Biol* 41 (2021) 101867. doi: 10.1016/j.redox.2021.101867.
- [68] H. Sies. Hydrogen peroxide as a central redox signaling molecule in physiological oxidative stress: Oxidative eustress. *Redox Biol* 11 (2017) 613–619. doi: 10.1016/j.redox.2016.12.035.
- [69] C.C. Winterbourn. Reconciling the chemistry and biology of reactive oxygen species. *Nat Chem Biol* 4 (2008) 278–286. doi: 10.1038/nchembio.85.
- [70] P. Di Mascio, G.R. Martinez, S. Miyamoto, G.E. Ronsein, M.H.G. Medeiros, J. Cadet. Singlet molecular oxygen reactions with nucleic acids, lipids, and proteins. *Chem. Rev.* 119 (2019) 2043–2086. doi: 10.1021/acs.chemrev.8b00554.
- [71] Y.-M. Go, J.D. Chandler, D.P. Jones. The cysteine proteome. *Free Radic Biol Med* 84 (2015) 227–245. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2015.03.022.
- [72] J. Hirst, J. Carroll, I.M. Fearnley, R.J. Shannon, J.E. Walker. The nuclear encoded subunits of complex I from bovine heart mitochondria. *Biochim Biophys Acta* 1604 (2003) 135–150. doi: 10.1016/s0005-2728(03)00059-8.
- [73] L.A. Sazanov. Respiratory complex I: mechanistic and structural insights provided by the crystal structure of the hydrophilic domain. *Biochemistry* 46 (2007) 2275–2288. doi: 10.1021/bi602508x.

- [74] L. Kussmaul, J. Hirst. The mechanism of superoxide production by NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I) from bovine heart mitochondria. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103 (2006) 7607–7612. doi: 10.1073/pnas.0510977103.
- [75] R. Zhao, S. Jiang, L. Zhang, Z. Yu. Mitochondrial electron transport chain, ROS generation and uncoupling (Review). *Int J Mol Med* 44 (2019) 3–15. doi: 10.3892/ijmm.2019.4188.
- [76] M. Cino, R.F. Del Maestro. Generation of hydrogen peroxide by brain mitochondria: the effect of reoxygenation following postdecapitative ischemia. *Arch Biochem Biophys* 269 (1989) 623–638. doi: 10.1016/0003-9861(89)90148-3.
- [77] S. Iwata, J.W. Lee, K. Okada, J.K. Lee, M. Iwata, B. Rasmussen, T.A. Link, S. Ramaswamy, B.K. Jap. Complete structure of the 11-subunit bovine mitochondrial cytochrome bcl complex. *Science* 281 (1998) 64–71. doi: 10.1126/science.281.5373.64.
- [78] J.F. Turrens, A. Alexandre, A.L. Lehninger. Ubisemiquinone is the electron donor for superoxide formation by complex III of heart mitochondria. *Arch Biochem Biophys* 237 (1985) 408–414. doi: 10.1016/0003-9861(85)90293-0.
- [79] E. Cadenas, A. Boveris, C.I. Ragan, A.O. Stoppani. Production of superoxide radicals and hydrogen peroxide by NADH-ubiquinone reductase and ubiquinol-cytochrome c reductase from beef-heart mitochondria. *Arch Biochem Biophys* 180 (1977) 248–257. doi: 10.1016/0003-9861(77)90035-2.
- [80] F.L. Muller, Y. Liu, H. Van Remmen. Complex III releases superoxide to both sides of the inner mitochondrial membrane. *J Biol Chem* 279 (2004) 49064–49073. doi: 10.1074/jbc.M407715200.
- [81] M.D. Brand. The sites and topology of mitochondrial superoxide production. *Exp Gerontol* 45 (2010) 466–472. doi: 10.1016/j.exger.2010.01.003.
- [82] A. Bezawork-Geleta, J. Rohlena, L. Dong, K. Pacak, J. Neuzil. Mitochondrial Complex II: At the Crossroads. *Trends Biochem Sci* 42 (2017) 312–325. doi: 10.1016/j.tibs.2017.01.003.
- [83] T.M. Iverson. Catalytic mechanisms of complex II enzymes: A structural perspective. *Biochim Biophys Acta* 1827 (2013) 648–657. doi: 10.1016/j.bbabi.2012.09.008.
- [84] F. Sun, X. Huo, Y. Zhai, A. Wang, J. Xu, D. Su, M. Bartlam, Z. Rao. Crystal structure of mitochondrial respiratory membrane protein complex II. *Cell* 121 (2005) 1043–1057. doi: 10.1016/j.cell.2005.05.025.
- [85] C.L. Quinlan, A.L. Orr, I.V. Perevoshchikova, J.R. Treberg, B.A. Ackrell, M.D. Brand. Mitochondrial complex II can generate reactive oxygen species at high rates in both the forward and reverse reactions. *J Biol Chem* 287 (2012) 27255–27264. doi: 10.1074/jbc.M112.374629.
- [86] E.T. Chouchani, V.R. Pell, E. Gaude, D. Aksentijević, S.Y. Sundier, E.L. Robb, A. Logan, S.M. Nadtochiy, E.N.J. Ord, A.C. Smith, F. Eyassu, R. Shirley, C.-H. Hu, A.J. Dare, A.M. James, S. Rogatti, R.C. Hartley, S. Eaton, A.S.H. Costa, P.S. Brookes, S.M. Davidson, M.R. Duchon, K. Saeb-Parsy, M.J. Shattock, A.J. Robinson, L.M. Work, C. Frezza, T. Krieg, M.P. Murphy. Ischaemic accumulation of succinate controls reperfusion injury through mitochondrial ROS. *Nature* 515 (2014) 431–435. doi: 10.1038/nature13909.
- [87] T. Tsukihara, H. Aoyama, E. Yamashita, T. Tomizaki, H. Yamaguchi, K. Shinzawa-Itoh, R. Nakashima, R. Yaono, S. Yoshikawa. The whole structure of the 13-subunit oxidized cytochrome c oxidase at 2.8 Å. *Science* 272 (1996) 1136–1144. doi: 10.1126/science.272.5265.1136.
- [88] K. Muramoto, K. Ohta, K. Shinzawa-Itoh, K. Kanda, M. Taniguchi, H. Nabekura, E. Yamashita, T. Tsukihara, S. Yoshikawa. Bovine cytochrome c oxidase structures enable O₂ reduction with minimization of reactive oxygens and provide a proton-pumping gate. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107 (2010) 7740–7745. doi: 10.1073/pnas.0910410107.
- [89] A.A. Starkov, G. Fiskum, C. Chinopoulos, B.J. Lorenzo, S.E. Browne, M.S. Patel, M.F. Beal. Mitochondrial alpha-ketoglutarate dehydrogenase complex generates reactive oxygen species. *J Neurosci* 24 (2004) 7779–7788. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1899-04.2004.

- [90] Z. Drahota, S.K.R. Chowdhury, D. Floryk, T. Mráček, J. Wilhelm, H. Rauchová, G. Lenaz, J. Houštěk. Glycerophosphate-dependent hydrogen peroxide production by brown adipose tissue mitochondria and its activation by ferricyanide. *J Bioenerg Biomembr* 34 (2002) 105–113. doi: 10.1023/A:1015123908918.
- [91] H.J. Forman, J. Kennedy. Dihydroorotate-dependent superoxide production in rat brain and liver. A function of the primary dehydrogenase. *Arch Biochem Biophys* 173 (1976) 219–224. doi: 10.1016/0003-9861(76)90252-6.
- [92] J. St-Pierre, J.A. Buckingham, S.J. Roebuck, M.D. Brand. Topology of superoxide production from different sites in the mitochondrial electron transport chain. *J Biol Chem* 277 (2002) 44784–44790. doi: 10.1074/jbc.M207217200.
- [93] G.Y.N. Iyer, M.F. Islam, J.H. Quastel. Biochemical aspects of phagocytosis. *Nature* 192 (1961) 535–541. doi: 10.1038/192535a0.
- [94] B.M. Babior, R.S. Kipnes, J.T. Curnutte. Biological defense mechanisms. The production by leukocytes of superoxide, a potential bactericidal agent. *J Clin Invest* 52 (1973) 741–744. doi: 10.1172/JCI107236.
- [95] B. Holmes, A.R. Page, R.A. Good. Studies of the metabolic activity of leukocytes from patients with a genetic abnormality of phagocytic function. *J Clin Invest* 46 (1967) 1422–1432. doi: 10.1172/JCI105634.
- [96] P.G. Quie, J.G. White, B. Holmes, R.A. Good. In vitro bactericidal capacity of human polymorphonuclear leukocytes: diminished activity in chronic granulomatous disease of childhood. *J Clin Invest* 46 (1967) 668–679. doi: 10.1172/JCI105568.
- [97] A.W. Segal, O.T.G. Jones. Novel cytochrome b system in phagocytic vacuoles of human granulocytes. *Nature* 276 (1978) 515–517. doi: 10.1038/276515a0.
- [98] B.D. Volpp, W.M. Nauseef, R.A. Clark. Two cytosolic neutrophil oxidase components absent in autosomal chronic granulomatous disease. *Science* 242 (1988) 1295–1297. doi: 10.1126/science.2848318.
- [99] U.G. Knaus, P.G. Heyworth, T. Evans, J.T. Curnutte, G.M. Bokoch. Regulation of phagocyte oxygen radical production by the GTP-binding protein Rac 2. *Science* 254 (1991) 1512–1515. doi: 10.1126/science.1660188.
- [100] F.B. Wientjes, J.J. Hsuan, N.F. Totty, A.W. Segal. p40phox, a third cytosolic component of the activation complex of the NADPH oxidase to contain src homology 3 domains. *Biochem J* 296 (Pt 3) (1993) 557–561. doi: 10.1042/bj2960557.
- [101] R.A. Clark, B.D. Volpp, K.G. Leidal, W.M. Nauseef. Two cytosolic components of the human neutrophil respiratory burst oxidase translocate to the plasma membrane during cell activation. *J Clin Invest* 85 (1990) 714–721. doi: 10.1172/JCI114496.
- [102] Y. Groemping, K. Lapouge, S.J. Smerdon, K. Rittinger. Molecular basis of phosphorylation-induced activation of the NADPH oxidase. *Cell* 113 (2003) 343–355. doi: 10.1016/s0092-8674(03)00314-3.
- [103] F. Debeurme, A. Picciocchi, M.-C. Dagher, D. Grunwald, S. Beaumel, F. Fieschi, M.-J. Stasia. Regulation of NADPH oxidase activity in phagocytes: relationship between FAD/NADPH binding and oxidase complex assembly. *J Biol Chem* 285 (2010) 33197–33208. doi: 10.1074/jbc.M110.151555.
- [104] A.W. Segal. The function of the NADPH oxidase of phagocytes and its relationship to other NOXs in plants, invertebrates, and mammals. *Int J Biochem Cell Biol* 40 (2008) 604–618. doi: 10.1016/j.biocel.2007.10.003.
- [105] K. Bedard, B. Lardy, K.-H. Krause. NOX family NADPH oxidases: not just in mammals. *Biochimie* 89 (2007) 1107–1112. doi: 10.1016/j.biochi.2007.01.012.
- [106] Y.A. Suh, R.S. Arnold, B. Lassegue, J. Shi, X. Xu, D. Sorescu, A.B. Chung, K.K. Griendling, J.D. Lambeth. Cell transformation by the superoxide-generating oxidase Mox1. *Nature* 401 (1999) 79–82. doi: 10.1038/43459.
- [107] B. Bánfi, A. Maturana, S. Jaconi, S. Arnaudeau, T. Laforge, B. Sinha, E. Ligeti, N. Demaurex, K.H. Krause. A mammalian H⁺ channel generated through alternative splicing

- of the NADPH oxidase homolog NOH-1. *Science* 287 (2000) 138–142. doi: 10.1126/science.287.5450.138.
- [108] H. Kikuchi, M. Hikage, H. Miyashita, M. Fukumoto. NADPH oxidase subunit, gp91(phox) homologue, preferentially expressed in human colon epithelial cells. *Gene* 254 (2000) 237–243. doi: 10.1016/s0378-1119(00)00258-4.
- [109] B. Bánfi, R.A. Clark, K. Steger, K.-H. Krause. Two novel proteins activate superoxide generation by the NADPH oxidase NOX1. *J Biol Chem* 278 (2003) 3510–3513. doi: 10.1074/jbc.C200613200.
- [110] B. Lassègue, D. Sorescu, K. Szöcs, Q. Yin, M. Akers, Y. Zhang, S.L. Grant, J.D. Lambeth, K.K. Griendling. Novel gp91(phox) homologues in vascular smooth muscle cells: nox1 mediates angiotensin II-induced superoxide formation and redox-sensitive signaling pathways. *Circ Res* 88 (2001) 888–894. doi: 10.1161/hh0901.090299.
- [111] T. Ago, T. Kitazono, J. Kuroda, Y. Kumai, M. Kamouchi, H. Ooboshi, M. Wakisaka, T. Kawahara, K. Rokutan, S. Ibayashi, M. Iida. NAD(P)H oxidases in rat basilar arterial endothelial cells. *Stroke* 36 (2005) 1040–1046. doi: 10.1161/01.STR.0000163111.05825.0b.
- [112] N.K. Lee, Y.G. Choi, J.Y. Baik, S.Y. Han, D.-W. Jeong, Y.S. Bae, N. Kim, S.Y. Lee. A crucial role for reactive oxygen species in RANKL-induced osteoclast differentiation. *Blood* 106 (2005) 852–859. doi: 10.1182/blood-2004-09-3662.
- [113] R. Paffenholz, R.A. Bergstrom, F. Pasutto, P. Wabnitz, R.J. Munroe, W. Jagla, U. Heinzmann, A. Marquardt, A. Bareiss, J. Laufs, A. Russ, G. Stumm, J.C. Schimenti, D.E. Bergstrom. Vestibular defects in head-tilt mice result from mutations in Nox3, encoding an NADPH oxidase. *Genes Dev* 18 (2004) 486–491. doi: 10.1101/gad.1172504.
- [114] R. Takeya, N. Ueno, K. Kami, M. Taura, M. Kohjima, T. Izaki, H. Nunoi, H. Sumimoto. Novel human homologues of p47phox and p67phox participate in activation of superoxide-producing NADPH oxidases. *J Biol Chem* 278 (2003) 25234–25246. doi: 10.1074/jbc.M212856200.
- [115] G. Cheng, D. Ritsick, J.D. Lambeth. Nox3 regulation by NOXO1, p47phox, and p67phox. *J Biol Chem* 279 (2004) 34250–34255. doi: 10.1074/jbc.M400660200.
- [116] M. Geiszt, J.B. Kopp, P. Várnai, T.L. Leto. Identification of renox, an NAD(P)H oxidase in kidney. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97 (2000) 8010–8014. doi: 10.1073/pnas.130135897.
- [117] K.-K. Prior, M.S. Leisegang, I. Josipovic, O. Löwe, A.M. Shah, N. Weissmann, K. Schröder, R.P. Brandes. CRISPR/Cas9-mediated knockout of p22phox leads to loss of Nox1 and Nox4, but not Nox5 activity. *Redox Biol* 9 (2016) 287–295. doi: 10.1016/j.redox.2016.08.013.
- [118] A.N. Lyle, N.N. Deshpande, Y. Taniyama, B. Seidel-Rogol, L. Pounkova, P. Du, C. Papaharalambus, B. Lassègue, K.K. Griendling. Poldip2, a novel regulator of Nox4 and cytoskeletal integrity in vascular smooth muscle cells. *Circ Res* 105 (2009) 249–259. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.109.193722.
- [119] C.F. Lee, M. Qiao, K. Schröder, Q. Zhao, R. Asmis. Nox4 is a novel inducible source of reactive oxygen species in monocytes and macrophages and mediates oxidized low density lipoprotein-induced macrophage death. *Circ Res* 106 (2010) 1489–1497. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.109.215392.
- [120] B. Bánfi, G. Molnár, A. Maturana, K. Steger, B. Hegedûs, N. Demaurex, K.H. Krause. A Ca(2+)-activated NADPH oxidase in testis, spleen, and lymph nodes. *J Biol Chem* 276 (2001) 37594–37601. doi: 10.1074/jbc.M103034200.
- [121] R.S. BelAiba, T. Djordjevic, A. Petry, K. Diemer, S. Bonello, B. Banfi, J. Hess, A. Pogrebniak, C. Bickel, A. Görlach. NOX5 variants are functionally active in endothelial cells. *Free Radic Biol Med* 42 (2007) 446–459. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2006.10.054.
- [122] D.B. Jay, C.A. Papaharalambus, B. Seidel-Rogol, A.E. Dikalova, B. Lassègue, K.K. Griendling. Nox5 mediates PDGF-induced proliferation in human aortic smooth muscle cells. *Free Radic Biol Med* 45 (2008) 329–335. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2008.04.024.

- [123] B. Bánfi, F. Tirone, I. Durussel, J. Knisz, P. Moskwa, G.Z. Molnár, K.-H. Krause, J.A. Cox. Mechanism of Ca²⁺ activation of the NADPH oxidase 5 (NOX5). *J Biol Chem* 279 (2004) 18583–18591. doi: 10.1074/jbc.M310268200.
- [124] F. Tirone, J.A. Cox. NADPH oxidase 5 (NOX5) interacts with and is regulated by calmodulin. *FEBS Lett* 581 (2007) 1202–1208. doi: 10.1016/j.febslet.2007.02.047.
- [125] C. Dupuy, R. Ohayon, A. Valent, M.S. Noël-Hudson, D. Dème, A. Virion. Purification of a novel flavoprotein involved in the thyroid NADPH oxidase. Cloning of the porcine and human cdnas. *J Biol Chem* 274 (1999) 37265–37269. doi: 10.1074/jbc.274.52.37265.
- [126] J.L. Meitzler, P.R. Ortiz de Montellano. Caenorhabditis elegans and human dual oxidase 1 (DUOX1) “peroxidase” domains: insights into heme binding and catalytic activity. *J Biol Chem* 284 (2009) 18634–18643. doi: 10.1074/jbc.M109.013581.
- [127] T. Ueyama, M. Sakuma, Y. Ninoyu, T. Hamada, C. Dupuy, M. Geiszt, T.L. Leto, N. Saito. The extracellular A-loop of dual oxidases affects the specificity of reactive oxygen species release. *J Biol Chem* 290 (2015) 6495–6506. doi: 10.1074/jbc.M114.592717.
- [128] X. De Deken, D. Wang, J.E. Dumont, F. Miot. Characterization of ThOX proteins as components of the thyroid H₂O₂-generating system. *Exp Cell Res* 273 (2002) 187–196. doi: 10.1006/excr.2001.5444.
- [129] S. Rigutto, C. Hoste, H. Grasberger, M. Milenkovic, D. Communi, J.E. Dumont, B. Corvilain, F. Miot, X. De Deken. Activation of dual oxidases Duox1 and Duox2: differential regulation mediated by camp-dependent protein kinase and protein kinase C-dependent phosphorylation. *J Biol Chem* 284 (2009) 6725–6734. doi: 10.1074/jbc.M806893200.
- [130] H. Grasberger, S. Refetoff. Identification of the maturation factor for dual oxidase. Evolution of an eukaryotic operon equivalent. *J Biol Chem* 281 (2006) 18269–18272. doi: 10.1074/jbc.C600095200.
- [131] C. Hajjar, M.V. Cherrier, G. Dias Mirandela, I. Petit-Hartlein, M.J. Stasia, J.C. Fontecilla-Camps, F. Fieschi, J. Dupuy. The NOX family of proteins is also present in bacteria., *mBio* 8 (2017) e01487-17. doi: 10.1128/mBio.01487-17.
- [132] Y. Nisimoto, B.A. Diebold, D. Cosentino-Gomes, J.D. Lambeth. Nox4: a hydrogen peroxide-generating oxygen sensor. *Biochemistry* 53 (2014) 5111–5120. doi: 10.1021/bi500331y.
- [133] M. Milenkovic, X. De Deken, L. Jin, M. De Felice, R. Di Lauro, J.E. Dumont, B. Corvilain, F. Miot. Duox expression and related H₂O₂ measurement in mouse thyroid: onset in embryonic development and regulation by TSH in adult. *J Endocrinol* 192 (2007) 615–626. doi: 10.1677/JOE-06-0003.
- [134] S. Parvez, M.J.C. Long, J.R. Poganik, Y. Aye. Redox signaling by reactive electrophiles and oxidants. *Chem. Rev.* 118 (2018) 8798–8888. doi: 10.1021/acs.chemrev.7b00698.
- [135] P.R. Gardner, I. Fridovich. Superoxide sensitivity of the Escherichia coli aconitase., *J Biol Chem* 266 (1991) 19328–19333.
- [136] B. Brüne, K.-U. Schmidt, V. Ullrich. Activation of soluble guanylate cyclase by carbon monoxide and inhibition by superoxide anion. *Eur J Biochem* 192 (1990) 683–688. doi: 10.1111/j.1432-1033.1990.tb19276.x.
- [137] D. Namgaladze, H.W. Hofer, V. Ullrich. Redox control of calcineurin by targeting the binuclear Fe²⁺-Zn²⁺ center at the enzyme active site. *J Biol Chem* 277 (2002) 5962–5969. doi: 10.1074/jbc.M111268200.
- [138] M. Fujikawa, K. Kobayashi, T. Kozawa. Direct oxidation of the [2Fe-2S] cluster in SoxR protein by superoxide: distinct differential sensitivity to superoxide-mediated signal transduction. *J Biol Chem* 287 (2012) 35702–35708. doi: 10.1074/jbc.M112.395079.
- [139] J.A. Imlay. Iron-sulphur clusters and the problem with oxygen. *Mol Microbiol* 59 (2006) 1073–1082. doi: 10.1111/j.1365-2958.2006.05028.x.
- [140] M.-S. Koo, J.-H. Lee, S.-Y. Rah, W.-S. Yeo, J.-W. Lee, K.-L. Lee, Y.-S. Koh, S.-O. Kang, J.-H. Roe. A reducing system of the superoxide sensor SoxR in Escherichia coli. *EMBO J* 22 (2003) 2614–2622. doi: 10.1093/emboj/cdg252.

- [141] J.S. Beckman, T.W. Beckman, J. Chen, P.A. Marshall, B.A. Freeman. Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87 (1990) 1620–1624. doi: 10.1073/pnas.87.4.1620.
- [142] R. Radi, J.S. Beckman, K.M. Bush, B.A. Freeman. Peroxynitrite-induced membrane lipid peroxidation: the cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide. *Arch Biochem Biophys* 288 (1991) 481–487. doi: 10.1016/0003-9861(91)90224-7.
- [143] T. Fukui, M. Ushio-Fukai, Superoxide dismutases: role in redox signaling, vascular function, and diseases. *Antioxid Redox Signal* 15 (2011) 1583–1606. doi: 10.1089/ars.2011.3999.
- [144] J.A. Tainer, E.D. Getzoff, J.S. Richardson, D.C. Richardson. Structure and mechanism of copper, zinc superoxide dismutase. *Nature* 306 (1983) 284–287. doi: 10.1038/306284a0.
- [145] G.E. Borgstahl, H.E. Parge, M.J. Hickey, W.F.J. Beyer, R.A. Hallewell, J.A. Tainer. The structure of human mitochondrial manganese superoxide dismutase reveals a novel tetrameric interface of two 4-helix bundles. *Cell* 71 (1992) 107–118. doi: 10.1016/0092-8674(92)90270-m.
- [146] H. Zhao, R. Zhang, X. Yan, K. Fan. Superoxide dismutase nanozymes: an emerging star for anti-oxidation. *J Mater Chem B* 9 (2021) 6939–6957. doi: 10.1039/d1tb00720c.
- [147] M.S. Lah, M.M. Dixon, K.A. Patridge, W.C. Stallings, J.A. Fee, M.L. Ludwig. Structure-function in *Escherichia coli* iron superoxide dismutase: comparisons with the manganese enzyme from *Thermus thermophilus*. *Biochemistry* 34 (1995) 1646–1660. doi: 10.1021/bi00005a021.
- [148] H.D. Youn, E.J. Kim, J.H. Roe, Y.C. Hah, S.O. Kang. A novel nickel-containing superoxide dismutase from *Streptomyces* spp. *Biochem J* 318 (Pt 3) (1996) 889–896. doi: 10.1042/bj3180889.
- [149] J. Shearer. Insight into the structure and mechanism of nickel-containing superoxide dismutase derived from peptide-based mimics. *Acc Chem Res* 47 (2014) 2332–2341. doi: 10.1021/ar500060s.
- [150] P.J. Hart, M.M. Balbirnie, N.L. Ogihara, A.M. Nersissian, M.S. Weiss, J.S. Valentine, D. Eisenberg. A structure-based mechanism for copper-zinc superoxide dismutase. *Biochemistry* 38 (1999) 2167–2178. doi: 10.1021/bi982284u.
- [151] J. Azadmanesh, G.E.O. Borgstahl. A Review of the catalytic mechanism of human manganese superoxide dismutase., *Antioxidants (Basel)* 7 (2018). doi: 10.3390/antiox7020025.
- [152] E.M. Fielden, P.B. Roberts, R.C. Bray, D.J. Lowe, G.N. Mautner, G. Rotilio, L. Calabrese. Mechanism of action of superoxide dismutase from pulse radiolysis and electron paramagnetic resonance. Evidence that only half the active sites function in catalysis. *Biochem J* 139 (1974) 49–60. doi: 10.1042/bj1390049.
- [153] C. Quijano, L. Castro, G. Peluffo, V. Valez, R. Radi. Enhanced mitochondrial superoxide in hyperglycemic endothelial cells: direct measurements and formation of hydrogen peroxide and peroxynitrite. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 293 (2007) H3404-3414. doi: 10.1152/ajpheart.00761.2007.
- [154] R.M. Lebovitz, H. Zhang, H. Vogel, J.J. Cartwright, L. Dionne, N. Lu, S. Huang, M.M. Matzuk. Neurodegeneration, myocardial injury, and perinatal death in mitochondrial superoxide dismutase-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93 (1996) 9782–9787. doi: 10.1073/pnas.93.18.9782.
- [155] S. Melov, J.A. Schneider, B.J. Day, D. Hinerfeld, P. Coskun, S.S. Mirra, J.D. Crapo, D.C. Wallace. A novel neurological phenotype in mice lacking mitochondrial manganese superoxide dismutase. *Nat Genet* 18 (1998) 159–163. doi: 10.1038/ng0298-159.
- [156] S. Pedrini, D. Sau, S. Guareschi, M. Bogush, R.H.J. Brown, N. Naniche, A. Kia, D. Trotti, P. Pasinelli. ALS-linked mutant SOD1 damages mitochondria by promoting conformational changes in Bcl-2., *Hum Mol Genet* 19 (2010) 2974–2986. doi: 10.1093/hmg/ddq202.

- [157] N. Hauptmann, J. Grimsby, J.C. Shih, E. Cadenas. The metabolism of tyramine by monoamine oxidase A/B causes oxidative damage to mitochondrial DNA. *Arch Biochem Biophys* 335 (1996) 295–304. doi: 10.1006/abbi.1996.0510.
- [158] E. Zito. ERO1: A protein disulfide oxidase and H₂O₂ producer. *Free Radic Biol Med* 83 (2015) 299–304. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2015.01.011.
- [159] M.E. Matlashov, V.V. Belousov, G. Enikolopov. How much H₂O₂ is produced by recombinant D-amino acid oxidase in mammalian cells? *Antioxid Redox Signal* 20 (2014) 1039–1044. doi: 10.1089/ars.2013.5618.
- [160] C.C. Winterbourn, D. Metodiewa. Reactivity of biologically important thiol compounds with superoxide and hydrogen peroxide. *Free Radic Biol Med* 27 (1999) 322–328. doi: 10.1016/S0891-5849(99)00051-9.
- [161] G. Ferrer-Sueta, B. Manta, H. Botti, R. Radi, M. Trujillo, A. Denicola. Factors affecting protein thiol reactivity and specificity in peroxide reduction. *Chem Res Toxicol* 24 (2011) 434–450. doi: 10.1021/tx100413v.
- [162] J.R. Stone. An assessment of proposed mechanisms for sensing hydrogen peroxide in mammalian systems. *Arch Biochem Biophys* 422 (2004) 119–124. doi: /10.1016/j.abb.2003.12.029.
- [163] C.C. Winterbourn, M.B. Hampton. Thiol chemistry and specificity in redox signaling, *Free Radic Biol Med* 45 (2008) 549–561. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2008.05.004.
- [164] A. Claiborne, H. Miller, D. Parsonage, R.P. Ross. Protein-sulfenic acid stabilization and function in enzyme catalysis and gene regulation. *FASEB J* 7 (1993) 1483–1490. doi: 10.1096/fasebj.7.15.8262333.
- [165] S. García-Santamarina, S. Boronat, E. Hidalgo. Reversible cysteine oxidation in hydrogen peroxide sensing and signal transduction. *Biochemistry* 53 (2014) 2560–2580. doi: 10.1021/bi401700f.
- [166] P. Ghezzi. Regulation of protein function by glutathionylation. *Free Radic Res* 39 (2005) 573–580. doi: 10.1080/10715760500072172.
- [167] H.A. Woo, H.Z. Chae, S.C. Hwang, K.-S. Yang, S.W. Kang, K. Kim, S.G. Rhee. Reversing the inactivation of peroxiredoxins caused by cysteine sulfinic acid formation. *Science* 300 (2003) 653–656. doi: 10.1126/science.1080273.
- [168] C. Lennicke, J. Rahn, R. Lichtenfels, L.A. Wessjohann, B. Seliger. Hydrogen peroxide – production, fate and role in redox signaling of tumor cells, *Cell Commun Signal* 13 (2015) 39. doi: 10.1186/s12964-015-0118-6.
- [169] O. Lyublinskaya, F. Antunes. Measuring intracellular concentration of hydrogen peroxide with the use of genetically encoded H₂O₂ biosensor HyPer. *Redox Biol* 24 (2019) 101200. doi: 10.1016/j.redox.2019.101200.
- [170] C. Gao, Y. Tian, R. Zhang, J. Jing, X. Zhang. Endoplasmic reticulum-directed ratiometric fluorescent probe for quantitative detection of basal H₂O₂. *Anal Chem* 89 (2017) 12945–12950. doi: 10.1021/acs.analchem.7b03809.
- [171] A. Espinosa, A. García, S. Härtel, C. Hidalgo, E. Jaimovich. NADPH Oxidase and hydrogen peroxide mediate insulin-induced calcium increase in skeletal muscle cells. *J Biol Chem* 284 (2009) 2568–2575. doi: 10.1074/jbc.M804249200.
- [172] L. Zhang, X. Wang, R. Cueto, C. Effi, Y. Zhang, H. Tan, X. Qin, Y. Ji, X. Yang, H. Wang. Biochemical basis and metabolic interplay of redox regulation. *Redox Biol* 26 (2019) 101284. doi: 10.1016/j.redox.2019.101284.
- [173] T. Henzler, E. Steudle. Transport and metabolic degradation of hydrogen peroxide in *Chara corallina*: model calculations and measurements with the pressure probe suggest transport of H₂O₂ across water channels. *J Exp Bot* 51 (2000) 2053–2066. doi: 10.1093/jexbot/51.353.2053.
- [174] G.P. Bienert, F. Chaumont. Aquaporin-facilitated transmembrane diffusion of hydrogen peroxide, *Bioch Biophys Acta* 1840 (2014) 1596–1604. doi: 10.1016/j.bbagen.2013.09.017.

- [175] S. Bestetti, I. Medraño-Fernandez, M. Galli, M. Ghitti, G.P. Bienert, G. Musco, A. Orsi, A. Rubartelli, R. Sitia. A persulfidation-based mechanism controls aquaporin-8 conductance. *Sci Adv* 4 (2018) eaar5770. doi: 10.1126/sciadv.aar5770.
- [176] W.H. Watson, J. Pohl, W.R. Montfort, O. Stuchlik, M.S. Reed, G. Powis, D.P. Jones. Redox potential of human thioredoxin 1 and identification of a second dithiol/disulfide motif. *J Biol Chem* 278 (2003) 33408–33415. doi: 10.1074/jbc.M211107200.
- [177] D. Young, B. Pedre, D. Ezeriņa, B. De Smet, A. Lewandowska, M.-A. Tossounian, N. Bodra, J. Huang, L. Astolfi Rosado, F. Van Breusegem, J. Messens. Protein promiscuity in H₂O₂ signaling. *Antioxid Redox Signal* 30 (2019) 1285–1324. doi: 10.1089/ars.2017.7013.
- [178] N. Di Marzo, E. Chisci, R. Giovannoni. The role of hydrogen peroxide in redox-dependent signaling: homeostatic and pathological responses in mammalian cells. *Cells* 7 (2018). doi: 10.3390/cells7100156.
- [179] H.S. Marinho, C. Real, L. Cyrne, H. Soares, F. Antunes. Hydrogen peroxide sensing, signaling and regulation of transcription factors. *Redox Biol* 2 (2014) 535–562. doi: 10.1016/j.redox.2014.02.006.
- [180] M. Roman, P. Jitaru, C. Barbante. Selenium biochemistry and its role for human health. *Metallomics* 6 (2014) 25–54. doi: 10.1039/c3mt00185g.
- [181] L. Orian, L. Flohé. Selenium-catalyzed reduction of hydroperoxides in chemistry and biology. *Antioxidants (Basel)* 10 (2021). doi: 10.3390/antiox10101560.
- [182] J.R. Erickson, M.A. Joiner, X. Guan, W. Kutschke, J. Yang, C.V. Oddis, R.K. Bartlett, J.S. Lowe, S.E. O'Donnell, N. Aykin-Burns, M.C. Zimmerman, K. Zimmerman, A.-J.L. Ham, R.M. Weiss, D.R. Spitz, M.A. Shea, R.J. Colbran, P.J. Mohler, M.E. Anderson. A dynamic pathway for calcium-independent activation of CaMKII by methionine oxidation. *Cell* 133 (2008) 462–474. doi: 10.1016/j.cell.2008.02.048.
- [183] A. Drazic, H. Miura, J. Peschek, Y. Le, N.C. Bach, T. Kriehuber, J. Winter. Methionine oxidation activates a transcription factor in response to oxidative stress. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110 (2013) 9493–9498. doi: 10.1073/pnas.1300578110.
- [184] B.C. Lee, Z. Péterfi, F.W. Hoffmann, R.E. Moore, A. Kaya, A. Avanesov, L. Tarrago, Y. Zhou, E. Weerapana, D.E. Fomenko, P.R. Hoffmann, V.N. Gladyshev. MsrB1 and MICALs regulate actin assembly and macrophage function via reversible stereoselective methionine oxidation. *Mol Cell* 51 (2013) 397–404. doi: 10.1016/j.molcel.2013.06.019.
- [185] E.R. Stadtman, H. Van Remmen, A. Richardson, N.B. Wehr, R.L. Levine. Methionine oxidation and aging. *Biochim Biophys Acta* 1703 (2005) 135–140. doi: 10.1016/j.bbapap.2004.08.010.
- [186] A. Kaya, B.C. Lee, V.N. Gladyshev. Regulation of protein function by reversible methionine oxidation and the role of selenoprotein MsrB1. *Antioxid Redox Signal* 23 (2015) 814–822. doi: 10.1089/ars.2015.6385.
- [187] S. Lourenço dos Santos, I. Petropoulos, B. Friguet. The oxidized protein repair enzymes methionine sulfoxide reductases and their roles in protecting against oxidative stress, in ageing and in regulating protein function. *Antioxidants* 7 (2018). doi: 10.3390/antiox7120191.
- [188] L. Tarrago, A. Kaya, H.-Y. Kim, B. Manta, B.-C. Lee, V.N. Gladyshev. The selenoprotein methionine sulfoxide reductase B1 (MSRB1). *Free Radic Biol Med* 191 (2022) 228–240. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2022.08.043.
- [189] D.A. Svistunenko. Reaction of haem containing proteins and enzymes with hydroperoxides: the radical view. *Biochim et Biophys Acta* 1707 (2005) 127–155. doi: 10.1016/j.bbabbio.2005.01.004.
- [190] J.-W. Lee, J.D. Helmann. The PerR transcription factor senses H₂O₂ by metal-catalysed histidine oxidation. *Nature* 440 (2006) 363–367. doi: 10.1038/nature04537.
- [191] J.P. Kehrer. The Haber–Weiss reaction and mechanisms of toxicity. *Toxicology* 149 (2000) 43–50. doi: 10.1016/S0300-483X(00)00231-6.

- [192] T. Kanti Das, M.R. Wati, K. Fatima-Shad. Oxidative stress gated by fenton and haber weiss reactions and its association with alzheimer's disease. *Archives of Neuroscience* 2 (2015) e60038. doi: 10.5812/archneurosci.20078.
- [193] G.V. Buxton, C.L. Greenstock, W.P. Helman, A.B. Ross. Critical Review of rate constants for reactions of hydrated electrons, hydrogen atoms and hydroxyl radicals ($\cdot\text{OH}/\cdot\text{O}^-$ in Aqueous Solution. *J. Phys. Chem. Ref. Data* 17 (1988) 513–886. doi: 10.1063/1.555805.
- [194] G. Xu, M.R. Chance. Hydroxyl radical-mediated modification of proteins as probes for structural proteomics. *Chem Rev* 107 (2007) 3514–3543. doi: 10.1021/cr0682047.
- [195] F. Liu, S. Lai, H. Tong, P.S.J. Lakey, M. Shiraiwa, M.G. Weller, U. Pöschl, C.J. Kampf. Release of free amino acids upon oxidation of peptides and proteins by hydroxyl radicals, *Anal Bioanal Chem* 409 (2017) 2411–2420. doi: 10.1007/s00216-017-0188-y.
- [196] A.M. Fleming, C.J. Burrows. On the irrelevancy of hydroxyl radical to DNA damage from oxidative stress and implications for epigenetics. *Chem Soc Rev* 49 (2020) 6524–6528. doi: 10.1039/D0CS00579G.
- [197] C. Chatgililoglu, M.G. Krokidis, A. Masi, S. Barata-Vallejo, C. Ferreri, M.A. Terzidis, T. Szreder, K. Bobrowski. New insights into the reaction paths of hydroxyl radicals with purine moieties in DNA and double-stranded oligodeoxynucleotides. *Molecules* 24 (2019). doi: 10.3390/molecules24213860.
- [198] H. Yin, L. Xu, N.A. Porter. Free radical lipid peroxidation: mechanisms and analysis. *Chem Rev* 111 (2011) 5944–5972. doi: 10.1021/cr200084z.
- [199] A. Ayala, M.F. Muñoz, S. Argüelles. Lipid peroxidation: production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal. *Oxid Med Cell Longev* 2014 (2014) 360438. doi: 10.1155/2014/360438.
- [200] A. Higdon, A.R. Diers, J.Y. Oh, A. Landar, V.M. Darley-Usmar. Cell signalling by reactive lipid species: new concepts and molecular mechanisms. *Biochem J* 442 (2012) 453–464. doi: 10.1042/BJ20111752.
- [201] J. Hitzel, E. Lee, Y. Zhang, S.I. Bibli, X. Li, S. Zukunft, B. Pflüger, J. Hu, C. Schürmann, A.E. Vasconez, J.A. Oo, A. Kratzer, S. Kumar, F. Rezende, I. Josipovic, D. Thomas, H. Giral, Y. Schreiber, G. Geisslinger, C. Fork, X. Yang, F. Sigala, C.E. Romanoski, J. Kroll, H. Jo, U. Landmesser, A.J. Lusis, D. Namgaladze, I. Fleming, M.S. Leisegang, J. Zhu, R.P. Brandes. Oxidized phospholipids regulate amino acid metabolism through MTHFD2 to facilitate nucleotide release in endothelial cells. *Nat Commun* 9 (2018) 2292. doi: 10.1038/s41467-018-04602-0.
- [202] V.E. Kagan, Y.Y. Tyurina, W.Y. Sun, I.I. Vlasova, H. Dar, V.A. Tyurin, A.A. Amoscato, R. Mallampalli, P.C.A. van der Wel, R.R. He, A.A. Shvedova, D.I. Gabilovich, H. Bayir. Redox phospholipidomics of enzymatically generated oxygenated phospholipids as specific signals of programmed cell death. *Free Radic Biol Med* 147 (2020) 231–241. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2019.12.028.
- [203] G.A. Czapski, K. Czubowicz, J.B. Strosznajder, R.P. Strosznajder. The lipoxygenases: their regulation and implication in alzheimer's disease. *Neurochem Res* 41 (2016) 243–257. doi: 10.1007/s11064-015-1776-x.
- [204] R. Fritz, J. Bol, U. Hebling, S. Angermüller, A. Völkl, H.D. Fahimi, S. Mueller. Compartment-dependent management of H₂O₂ by peroxisomes. *Free Radic Biol Med* 42 (2007) 1119–1129. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2007.01.014.
- [205] A. Baker, C.-C. Lin, C. Lett, B. Karpinska, M.H. Wright, C.H. Foyer. Catalase: a critical node in the regulation of cell fate. *Free Radic Biol and Med* 199 (2023) 56–66. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2023.02.009.
- [206] V.D. Antonenkov, S. Grunau, S. Ohlmeier, J.K. Hiltunen. Peroxisomes are oxidative organelles. *Antioxid Redox Signal* 13 (2010) 525–537. doi: 10.1089/ars.2009.2996.
- [207] Y. Ogura, I. Yamazaki. Steady-state kinetics of the catalase reaction in the presence of cyanide. *J Biochem* 94 (1983) 403–408. doi: 10.1093/oxfordjournals.jbchem.a134369.

- [208] J.P. Kehrer, J.D. Robertson, C.V. Smith. Free radicals and reactive oxygen species, in: C.A. McQueen (Ed.), *Comprehensive Toxicology* (Second Edition), Elsevier, Oxford, 2010: pp. 277–307. doi: 10.1016/B978-0-08-046884-6.00114-7.
- [209] G. Takebe, J. Yarimizu, Y. Saito, T. Hayashi, H. Nakamura, J. Yodoi, S. Nagasawa, K. Takahashi. A comparative study on the hydroperoxide and thiol specificity of the glutathione peroxidase family and selenoprotein P. *J Biol Chem* 277 (2002) 41254–41258. doi: 10.1074/jbc.M202773200.
- [210] J. Pei, X. Pan, G. Wei, Y. Hua. Research progress of glutathione peroxidase family (GPX) in redoxitation. *Front Pharmacol* 14 (2023) 1147414. doi: 10.3389/fphar.2023.1147414.
- [211] E. Lubos, J. Loscalzo, D.E. Handy. Glutathione peroxidase-1 in health and disease: from molecular mechanisms to therapeutic opportunities. *Antioxid Redox Signal* 15 (2011) 1957–1997. doi: 10.1089/ars.2010.3586.
- [212] G.V. Kryukov, S. Castellano, S.V. Novoselov, A.V. Lobanov, O. Zehtab, R. Guigó, V.N. Gladyshev. Characterization of mammalian selenoproteomes. *Science* 300 (2003) 1439–1443. doi: 10.1126/science.1083516.
- [213] A. Taylor, A. Robson, B.C. Houghton, C.A. Jepson, W.C.L. Ford, J. Frayne. Epididymal specific, selenium-independent GPX5 protects cells from oxidative stress-induced lipid peroxidation and DNA mutation. *Hum Reprod* 28 (2013) 2332–2342. doi: 10.1093/humrep/det237.
- [214] S.A. Comhair, P.R. Bhathena, C. Farver, F.B. Thunnissen, S.C. Erzurum. Extracellular glutathione peroxidase induction in asthmatic lungs: evidence for redox regulation of expression in human airway epithelial cells. *FASEB J* 15 (2001) 70–78. doi: 10.1096/fj.00-0085com.
- [215] B. Hofmann, H.-J. Hecht, L. Flohé. Peroxiredoxins. *Biol Chem* 383 (2002) 347–364. doi: 10.1515/BC.2002.040.
- [216] Z.A. Wood, E. Schröder, J. Robin Harris, L.B. Poole. Structure, mechanism and regulation of peroxiredoxins. *Trends Biochem Sci* 28 (2003) 32–40. doi: 10.1016/s0968-0004(02)00003-8.
- [217] A.V. Peskin, F.M. Low, L.N. Paton, G.J. Maghzal, M.B. Hampton, C.C. Winterbourn. The high reactivity of peroxiredoxin 2 with H₂O₂ is not reflected in its reaction with other oxidants and thiol reagents. *J Biol Chem* 282 (2007) 11885–11892. doi: 10.1074/jbc.M700339200.
- [218] S.G. Rhee, H.A. Woo, I.S. Kil, S.H. Bae. Peroxiredoxin functions as a peroxidase and a regulator and sensor of local peroxides. *J Biol Chem* 287 (2012) 4403–4410. doi: 10.1074/jbc.R111.283432.
- [219] Y. Manevich, S.I. Feinstein, A.B. Fisher. Activation of the antioxidant enzyme 1-CYS peroxiredoxin requires glutathionylation mediated by heterodimerization with π GST. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101 (2004) 3780–3785. doi: 10.1073/pnas.0400181101.
- [220] T.-S. Chang, W. Jeong, S.Y. Choi, S. Yu, S.W. Kang, S.G. Rhee. Regulation of peroxiredoxin I activity by Cdc2-mediated phosphorylation. *J Biol Chem* 277 (2002) 25370–25376. doi: 10.1074/jbc.M110432200.
- [221] K.H. Koo, S. Lee, S.Y. Jeong, E.T. Kim, H.J. Kim, K. Kim, K. Song, H.Z. Chae. Regulation of thioredoxin peroxidase activity by C-terminal truncation. *Arch Biochem Biophys* 397 (2002) 312–318. doi: 10.1006/abbi.2001.2700.
- [222] T. Rabilloud, M. Heller, F. Gasnier, S. Luche, C. Rey, R. Aebersold, M. Benahmed, P. Louisot, J. Lunardi. Proteomics analysis of cellular response to oxidative stress: evidence for in vivo overoxidation of peroxiredoxins at their active site. *J Biol Chem* 277 (2002) 19396–19401. doi: 10.1074/jbc.M106585200.
- [223] Z.A. Wood, L.B. Poole, P.A. Karplus. Peroxiredoxin evolution and the regulation of hydrogen peroxide signaling. *Science* 300 (2003) 650–653. doi: 10.1126/science.1080405.
- [224] T.-S. Chang, W. Jeong, H.A. Woo, S.M. Lee, S. Park, S.G. Rhee. Characterization of mammalian sulfiredoxin and its reactivation of hyperoxidized peroxiredoxin through

- reduction of cysteine sulfinic acid in the active site to cysteine. *J Biol Chem* 279 (2004) 50994–51001. doi: 10.1074/jbc.M409482200.
- [225] S.G. Rhee, S.W. Kang, W. Jeong, T.-S. Chang, K.-S. Yang, H.A. Woo. Intracellular messenger function of hydrogen peroxide and its regulation by peroxiredoxins. *Curr Opin Cell Biol* 17 (2005) 183–189. doi: 10.1016/j.ceb.2005.02.004.
- [226] H.A. Woo, W. Jeong, T.-S. Chang, K.J. Park, S.J. Park, J.S. Yang, S.G. Rhee. Reduction of cysteine sulfinic acid by sulfiredoxin is specific to 2-cys peroxiredoxins. *J Biol Chem* 280 (2005) 3125–3128. doi: 10.1074/jbc.C400496200.
- [227] M. Zámocký, S. Hofbauer, I. Schaffner, B. Gasselhuber, A. Nicolussi, M. Soudi, K.F. Pirker, P.G. Furtmüller, C. Obinger. Independent evolution of four heme peroxidase superfamilies. *Arch Biochem Biophys* 574 (2015) 108–119. doi: 10.1016/j.abb.2014.12.025.
- [228] G. Cheng, J.C. Salerno, Z. Cao, P.J. Pagano, J.D. Lambeth. Identification and characterization of VPO1, a new animal heme-containing peroxidase. *Free Radic Biol Med* 45 (2008) 1682–1694. doi: /10.1016/j.freeradbiomed.2008.09.009.
- [229] K. Agner. Verdoperoxidase: a ferment isolated from leucocytes. Norstedt, 1941. <https://books.google.ru/books?id=71n5OAAACAAJ>.
- [230] M.J. Davies, C.L. Hawkins. The role of myeloperoxidase in biomolecule modification, chronic inflammation, and disease. *Antioxid Redox Signal*. 32 (2020) 957–981. doi: 10.1089/ars.2020.8030.
- [231] A.J. Kettle, C.C. Winterbourn. Myeloperoxidase: a key regulator of neutrophil oxidant production. *Redox Rep* 3 (1997) 3–15. doi: 10.1080/13510002.1997.11747085.
- [232] A.J. Kettle, I.G. Robertson, B.D. Palmer, R.F. Anderson, K.B. Patel, C.C. Winterbourn. Oxidative metabolism of amsacrine by the neutrophil enzyme myeloperoxidase. *Biochem Pharmacol* 44 (1992) 1731–1738. doi: 10.1016/0006-2952(92)90066-r.
- [233] U. Burner, G. Krapfenbauer, P.G. Furtmüller, G. Regelsberger, C. Obinger. Oxidation of hydroquinone, 2,3-dimethylhydroquinone and 2,3,5-trimethylhydroquinone by human myeloperoxidase. *Redox Rep* 5 (2000) 185–190. doi: 10.1179/135100000101535735.
- [234] C.C. Winterbourn, M.B. Hampton, J.H. Livesey, A.J. Kettle. Modeling the reactions of superoxide and myeloperoxidase in the neutrophil phagosome: implications for microbial killing. *J Biol Chem* 281 (2006) 39860–39869. doi: 10.1074/jbc.M605898200.
- [235] A.J. Kettle, C.C. Winterbourn. Superoxide modulates the activity of myeloperoxidase and optimizes the production of hypochlorous acid. *Biochem J* 252 (1988) 529–536. doi: 10.1042/bj2520529.
- [236] A.J. Kettle, R.F. Anderson, M.B. Hampton, C.C. Winterbourn. Reactions of superoxide with myeloperoxidase. *Biochemistry* 46 (2007) 4888–4897. doi: 10.1021/bi602587k.
- [237] M.J. Davies, C.L. Hawkins, D.I. Pattison, M.D. Rees. Mammalian heme peroxidases: from molecular mechanisms to health implications. *Antioxid Redox Signal* 10 (2008) 1199–1234. doi: 10.1089/ars.2007.1927.
- [238] C.J. van Dalen, M.W. Whitehouse, C.C. Winterbourn, A.J. Kettle. Thiocyanate and chloride as competing substrates for myeloperoxidase. *Biochem J* 327 (Pt 2) (1997) 487–492. doi: 10.1042/bj3270487.
- [239] P.G. Furtmüller, U. Burner, C. Obinger. Reaction of myeloperoxidase compound I with chloride, bromide, iodide, and thiocyanate. *Biochemistry* 37 (1998) 17923–17930. doi: 10.1021/bi9818772.
- [240] P.E. Morgan, D.I. Pattison, J. Talib, F.A. Summers, J.A. Harmer, D.S. Celermajer, C.L. Hawkins, M.J. Davies. High plasma thiocyanate levels in smokers are a key determinant of thiol oxidation induced by myeloperoxidase. *Free Radic Biol Med* 51 (2011) 1815–1822. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2011.08.008.
- [241] D.I. Pattison, M.J. Davies, C.L. Hawkins. Reactions and reactivity of myeloperoxidase-derived oxidants: differential biological effects of hypochlorous and hypothiocyanous acids. *Free Radic Res* 46 (2012) 975–995. doi: 10.3109/10715762.2012.667566.

- [242] A. Spagnolo, S. Torsello, G. Morisi, E. Petrozzi, R. Antonini, G. Ricci, G.C. Urbinati, A. Menotti. Serum thiocyanate levels as an objective measure of smoking habits in epidemiological studies. *Eur J Epidemiol* 4 (1988) 206–211. doi: 10.1007/BF00144753.
- [243] R. Senthilmohan, A.J. Kettle. Bromination and chlorination reactions of myeloperoxidase at physiological concentrations of bromide and chloride. *Arch Biochem Biophys* 445 (2006) 235–244. doi: 10.1016/j.abb.2005.07.005.
- [244] J. Arnhold, E. Monzani, P.G. Furtmüller, M. Zederbauer, L. Casella, C. Obinger, Kinetics and thermodynamics of halide and nitrite oxidation by mammalian heme peroxidases. *Eur J Inorg Chem* (2006) 3801–3811. doi: 10.1002/ejic.200600436.
- [245] D.I. Pattison, M.J. Davies. Reactions of myeloperoxidase-derived oxidants with biological substrates: gaining chemical insight into human inflammatory diseases. *Curr Med Chem* 13 (2006) 3271–3290. doi: 10.2174/092986706778773095.
- [246] D.I. Pattison, M.J. Davies. Absolute rate constants for the reaction of hypochlorous acid with protein side chains and peptide bonds. *Chem Res Toxicol* 14 (2001) 1453–1464. doi: 10.1021/tx0155451.
- [247] C.L. Hawkins, D.I. Pattison, M.J. Davies. Hypochlorite-induced oxidation of amino acids, peptides and proteins. *Amino Acids* 25 (2003) 259–274. doi: 10.1007/s00726-003-0016-x.
- [248] X. Fu, D.M. Mueller, J.W. Heinecke. Generation of intramolecular and intermolecular sulfenamides, sulfinamides, and sulfonamides by hypochlorous acid: a potential pathway for oxidative cross-linking of low-density lipoprotein by myeloperoxidase. *Biochemistry* 41 (2002) 1293–1301. doi: 10.1021/bi015777z.
- [249] M.J. Raftery, Z. Yang, S.M. Valenzuela, C.L. Geczy. Novel intra- and inter-molecular sulfinamide bonds in S100A8 produced by hypochlorite oxidation. *J Biol Chem* 276 (2001) 33393–33401. doi: 10.1074/jbc.M101566200.
- [250] M.J. Davies, C.L. Hawkins. Hypochlorite-induced oxidation of thiols: formation of thiyl radicals and the role of sulfenyl chlorides as intermediates. *Free Radic Res* 33 (2000) 719–729. doi: 10.1080/10715760000301241.
- [251] H.K. Khor, M.T. Fisher, C. Schöneich. Potential role of methionine sulfoxide in the inactivation of the chaperone GroEL by hypochlorous acid (HOCl) and peroxynitrite (ONOO⁻). *J Biol Chem* 279 (2004) 19486–19493. doi: 10.1074/jbc.M310045200.
- [252] J.L. Beal, S.B. Foster, M.T. Ashby. Hypochlorous acid reacts with the N-terminal methionines of proteins to give dehydromethionine, a potential biomarker for neutrophil-induced oxidative stress. *Biochemistry* 48 (2009) 11142–11148. doi: 10.1021/bi901343d.
- [253] C.L. Hawkins, M.J. Davies. Hypochlorite-induced damage to proteins: formation of nitrogen-centred radicals from lysine residues and their role in protein fragmentation. *Biochem J* 332 (Pt 3) (1998) 617–625. doi: 10.1042/bj3320617.
- [254] C. L. Hawkins, M. J. Davies. Reaction of HOCl with amino acids and peptides: EPR evidence for rapid rearrangement and fragmentation reactions of nitrogen-centred radicals. *J Chem Soc, Perkin Trans 2* (1998) 1937–1946. doi: 10.1039/A802949K.
- [255] M.M. Anderson, S.L. Hazen, F.F. Hsu, J.W. Heinecke. Human neutrophils employ the myeloperoxidase-hydrogen peroxide-chloride system to convert hydroxy-amino acids into glycolaldehyde, 2-hydroxypropanal, and acrolein. A mechanism for the generation of highly reactive alpha-hydroxy and alpha,beta-unsaturated aldehydes by phagocytes at sites of inflammation. *J Clin Invest* 99 (1997) 424–432. doi: 10.1172/JCI119176.
- [256] A.V. Peskin, C.C. Winterbourn. Kinetics of the reactions of hypochlorous acid and amino acid chloramines with thiols, methionine, and ascorbate. *Free Radic Biol Med* 30 (2001) 572–579. doi: 10.1016/s0891-5849(00)00506-2.
- [257] J. Marcinkiewicz, E. Kontny. Taurine and inflammatory diseases. *Amino Acids* 46 (2014) 7–20. doi: 10.1007/s00726-012-1361-4.
- [258] D.I. Pattison, M.J. Davies. Kinetic analysis of the reactions of hypobromous acid with protein components: implications for cellular damage and use of 3-bromotyrosine as a marker of oxidative stress. *Biochemistry* 43 (2004) 4799–4809. doi: 10.1021/bi035946a.

- [259] P. Nagy, G.N.L. Jameson, C.C. Winterbourn. Kinetics and mechanisms of the reaction of hypothiocyanous acid with 5-thio-2-nitrobenzoic acid and reduced glutathione. *Chem Res Toxicol* 22 (2009) 1833–1840. doi: 10.1021/tx900249d.
- [260] O. Skaff, D.I. Pattison, M.J. Davies. Hypothiocyanous acid reactivity with low-molecular-mass and protein thiols: absolute rate constants and assessment of biological relevance. *Biochem J* 422 (2009) 111–117. doi: 10.1042/BJ20090276.
- [261] O. Skaff, D.I. Pattison, P.E. Morgan, R. Bachana, V.K. Jain, K.I. Priyadarsini, M.J. Davies. Selenium-containing amino acids are targets for myeloperoxidase-derived hypothiocyanous acid: determination of absolute rate constants and implications for biological damage. *Biochem J* 441 (2012) 305–316. doi: 10.1042/BJ20101762.
- [262] P. Nagy, M.T. Ashby. Reactive sulfur species: kinetics and mechanisms of the oxidation of cysteine by hypohalous acid to give cysteine sulfenic acid. *J Am Chem Soc* 129 (2007) 14082–14091. doi: 10.1021/ja0737218.
- [263] T.J. Barrett, D.I. Pattison, S.E. Leonard, K.S. Carroll, M.J. Davies, C.L. Hawkins. Inactivation of thiol-dependent enzymes by hypothiocyanous acid: role of sulfenyl thiocyanate and sulfenic acid intermediates. *Free Radic Biol Med* 52 (2012) 1075–1085. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2011.12.024.
- [264] G.T. Nguyen, E.R. Green, J. Mecsas. Neutrophils to the ROScues: Mechanisms of NADPH Oxidase Activation and Bacterial Resistance. *Front Cell Infect Microbiol* 7 (2017) 373. doi: 10.3389/fcimb.2017.00373.
- [265] N.V. Vorobjeva, B.V. Chernyak. NETosis: Molecular Mechanisms, Role in Physiology and Pathology. *Biochemistry (Mosc)* 85 (2020) 1178–1190. doi: 10.1134/S0006297920100065.
- [266] H.K. Lehman, B.H. Segal. The role of neutrophils in host defense and disease, *Journal of J Allergy Clin Immunol* 145 (2020) 1535–1544. doi: 10.1016/j.jaci.2020.02.038.
- [267] F. Lanza. Clinical manifestation of myeloperoxidase deficiency. *J Mol Med (Berl)* 76 (1998) 676–681. doi: 10.1007/s001090050267.
- [268] L.C.D. Smyth, H.C. Murray, M. Hill, E. van Leeuwen, B. Highet, N.J. Magon, M. Osanlouy, S.N. Mathiesen, B. Mockett, M.K. Singh-Bains, V.K. Morris, A.N. Clarkson, M.A. Curtis, W.C. Abraham, S.M. Hughes, R.L.M. Faull, A.J. Kettle, M. Draganow, M.B. Hampton. Neutrophil-vascular interactions drive myeloperoxidase accumulation in the brain in Alzheimer’s disease. *Acta Neuropathologica Communications* 10 (2022) 38. doi: 10.1186/s40478-022-01347-2.
- [269] S. Gellhaar, D. Sunnemark, H. Eriksson, L. Olson, D. Galter. Myeloperoxidase-immunoreactive cells are significantly increased in brain areas affected by neurodegeneration in Parkinson’s and Alzheimer’s disease. *Cell Tissue Res* 369 (2017) 445–454. doi: 10.1007/s00441-017-2626-8.
- [270] N. Zhang, X. Aiyasiding, W. Li, H. Liao, Q. Tang. Neutrophil degranulation and myocardial infarction. *Cell Commun Signal* 20 (2022) 50. doi: 10.1186/s12964-022-00824-4.
- [271] Y.-C. Wang, Y.-B. Lu, X.-L. Huang, Y.-F. Lao, L. Zhang, J. Yang, M. Shi, H.-L. Ma, Y.-W. Pan, Y.-N. Zhang. Myeloperoxidase: a new target for the treatment of stroke? *Neural Regen Res* 17 (2022) 1711–1716. doi: 10.4103/1673-5374.332130.
- [272] C. Frangie, J. Daher. Role of myeloperoxidase in inflammation and atherosclerosis (Review). *Biomed Rep* 16 (2022) 53. doi: 10.3892/br.2022.1536.
- [273] Z. Wang, J.A. DiDonato, J. Buffa, S.A. Comhair, M.A. Aronica, R.A. Dweik, N.A. Lee, J.J. Lee, M.J. Thomassen, M. Kavuru, S.C. Erzurum, S.L. Hazen. Eosinophil peroxidase catalyzed protein carbamylation participates in asthma. *J Biol Chem* 291 (2016) 22118–22135. doi: 10.1074/jbc.M116.750034.
- [274] R.M.S.N. Fernandes, N.P. da Silva, E.I. Sato. Increased myeloperoxidase plasma levels in rheumatoid arthritis. *Rheumatol Int* 32 (2012) 1605–1609. doi: 10.1007/s00296-011-1810-5.

- [275] D.L. Lefkowitz, S.S. Lefkowitz. Microglia and myeloperoxidase: a deadly partnership in neurodegenerative disease. *Free Radic Biol Med* 45 (2008) 726–731. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2008.05.021.
- [276] S. Sugiyama, Y. Okada, G.K. Sukhova, R. Virmani, J.W. Heinecke, P. Libby. Macrophage myeloperoxidase regulation by granulocyte macrophage colony-stimulating factor in human atherosclerosis and implications in acute coronary syndromes. *Am J Pathol* 158 (2001) 879–891. doi: 10.1016/S0002-9440(10)64036-9.
- [277] T.S. McMillen, J.W. Heinecke, R.C. LeBoeuf. Expression of human myeloperoxidase by macrophages promotes atherosclerosis in mice. *Circulation* 111 (2005) 2798–2804. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.104.516278.
- [278] C. Guo, M.J. Davies, C.L. Hawkins. Role of thiocyanate in the modulation of myeloperoxidase-derived oxidant induced damage to macrophages. *Redox Biology* 36 (2020) 101666. doi: 10.1016/j.redox.2020.101666.
- [279] G.F. Vile, L.A. Rothwell, A.J. Kettle. Hypochlorous acid activates the tumor suppressor protein p53 in cultured human skin fibroblasts. *Arch Biochem Biophys* 359 (1998) 51–56. doi: 10.1006/abbi.1998.0881.
- [280] S. Schoonbroodt, S. Legrand-Poels, M. Best-Belpomme, J. Piette. Activation of the NF-kappaB transcription factor in a T-lymphocytic cell line by hypochlorous acid. *Biochem J* 321 (Pt 3) (1997) 777–785. doi: 10.1042/bj3210777.
- [281] R.G. Midwinter, M.C. Vissers, C.C. Winterbourn. Hypochlorous acid stimulation of the mitogen-activated protein kinase pathway enhances cell survival. *Arch Biochem Biophys* 394 (2001) 13–20. doi: 10.1006/abbi.2001.2530.
- [282] W.K. Alderton, C.E. Cooper, R.G. Knowles. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochem J* 357 (2001) 593–615. doi: 10.1042/0264-6021:3570593.
- [283] U. Förstermann, W.C. Sessa. Nitric oxide synthases: regulation and function. *Eur Heart J* 33 (2012) 829–837, 837a–837d. doi: 10.1093/eurheartj/ehr304.
- [284] P.J. Andrew, B. Mayer. Enzymatic function of nitric oxide synthases. *Cardiovasc Res* 43 (1999) 521–531. doi: 10.1016/s0008-6363(99)00115-7.
- [285] V. Fernando, X. Zheng, Y. Walia, V. Sharma, J. Letson, S. Furuta. S-Nitrosylation: an emerging paradigm of redox signaling. *Antioxidants* 8 (2019). doi: 10.3390/antiox8090404.
- [286] K.-B. Cho, E. Derat, S. Shaik. Compound I of nitric oxide synthase: the active site protonation state. *J. Am. Chem. Soc.* 129 (2007) 3182–3188. doi: 10.1021/ja066662r.
- [287] V.W.T. Liu, P.L. Huang. Cardiovascular roles of nitric oxide: a review of insights from nitric oxide synthase gene disrupted mice. *Cardiovasc Res* 77 (2008) 19–29. doi: 10.1016/j.cardiores.2007.06.024.
- [288] M.N. Möller, N. Rios, M. Trujillo, R. Radi, A. Denicola, B. Alvarez. Detection and quantification of nitric oxide-derived oxidants in biological systems. *J Biol Chem* 294 (2019) 14776–14802. doi: 10.1074/jbc.REV119.006136.
- [289] R. Radi. Oxygen radicals, nitric oxide, and peroxynitrite: Redox pathways in molecular medicine. *Proc Natl Acad Sci U S A* 115 (2018) 5839–5848. doi: 10.1073/pnas.1804932115.
- [290] F. Murad. Shattuck Lecture. Nitric oxide and cyclic GMP in cell signaling and drug development. *N Engl J Med* 355 (2006) 2003–2011. doi: 10.1056/NEJMsa063904.
- [291] G.C. Brown, C.E. Cooper. Nanomolar concentrations of nitric oxide reversibly inhibit synaptosomal respiration by competing with oxygen at cytochrome oxidase. *FEBS Lett* 356 (1994) 295–298. doi: 10.1016/0014-5793(94)01290-3.
- [292] A. Martínez-Ruiz, I.M. Araújo, A. Izquierdo-Álvarez, P. Hernansanz-Agustín, S. Lamas, J.M. Serrador. Specificity in S-nitrosylation: a short-range mechanism for NO signaling? *Antioxid Redox Signal* 19 (2013) 1220–1235. doi: 10.1089/ars.2012.5066.
- [293] D.T. Hess, A. Matsumoto, S.-O. Kim, H.E. Marshall, J.S. Stamler. Protein S-nitrosylation: purview and parameters. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6 (2005) 150–166. doi: 10.1038/nrm1569.

- [294] T. Nakamura, S.A. Lipton. Protein S-Nitrosylation as a therapeutic target for neurodegenerative diseases. *Trends Pharmacol Sci* 37 (2016) 73–84. doi: 10.1016/j.tips.2015.10.002.
- [295] J. Jia, A. Arif, F. Terenzi, B. Willard, E.F. Plow, S.L. Hazen, P.L. Fox. Target-selective protein S-nitrosylation by sequence motif recognition. *Cell* 159 (2014) 623–634. doi: 10.1016/j.cell.2014.09.032.
- [296] A.B. Milsom, C.J.H. Jones, J. Goodfellow, M.P. Frenneaux, J.R. Peters, P.E. James. Abnormal metabolic fate of nitric oxide in Type I diabetes mellitus. *Diabetologia* 45 (2002) 1515–1522. doi: 10.1007/s00125-002-0956-9.
- [297] L. Liu, Y. Yan, M. Zeng, J. Zhang, M.A. Hanes, G. Ahearn, T.J. McMahon, T. Dickfeld, H.E. Marshall, L.G. Que, J.S. Stamler. Essential roles of S-nitrosothiols in vascular homeostasis and endotoxic shock. *Cell* 116 (2004) 617–628. doi: 10.1016/s0092-8674(04)00131-x.
- [298] T. Nakamura, S.A. Lipton. Emerging role of protein-protein transnitrosylation in cell signaling pathways. *Antioxid Redox Signal* 18 (2013) 239–249. doi: 10.1089/ars.2012.4703.
- [299] Y. Hou, Z. Guo, J. Li, P.G. Wang. Seleno compounds and glutathione peroxidase catalyzed decomposition of S-nitrosothiols. *Biochem Biophys Res Commun* 228 (1996) 88–93. doi: 10.1006/bbrc.1996.1620.
- [300] D. Nikitovic, A. Holmgren. S-nitrosoglutathione is cleaved by the thioredoxin system with liberation of glutathione and redox regulating nitric oxide. *J Biol Chem* 271 (1996) 19180–19185. doi: 10.1074/jbc.271.32.19180.
- [301] R.E. Huie, S. Padmaja. The reaction of NO with superoxide. *Free Radic Res Commun* 18 (1993) 195–199. doi: 10.3109/10715769309145868.
- [302] W.H. Koppenol, R. Kissner. Can O=NOOH undergo homolysis? *Chem Res Toxicol* 11 (1998) 87–90. doi: 10.1021/tx970200x.
- [303] R. Radi, A. Cassina, R. Hodara, C. Quijano, L. Castro. Peroxynitrite reactions and formation in mitochondria. *Free Radic Biol Med* 33 (2002) 1451–1464. doi: 10.1016/s0891-5849(02)01111-5.
- [304] S. Burney, J.L. Caulfield, J.C. Niles, J.S. Wishnok, S.R. Tannenbaum. The chemistry of DNA damage from nitric oxide and peroxynitrite. *Mutat Res* 424 (1999) 37–49. doi: 10.1016/s0027-5107(99)00006-8.
- [305] J.C. Niles, J.S. Wishnok, S.R. Tannenbaum. Peroxynitrite-induced oxidation and nitration products of guanine and 8-oxoguanine: structures and mechanisms of product formation. *Nitric Oxide* 14 (2006) 109–121. doi: 10.1016/j.niox.2005.11.001.
- [306] J.M. Souza, R. Radi. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase inactivation by peroxynitrite. *Arch Biochem Biophys* 360 (1998) 187–194. doi: 10.1006/abbi.1998.0932.
- [307] E.A. Konorev, N. Hogg, B. Kalyanaraman. Rapid and irreversible inhibition of creatine kinase by peroxynitrite. *FEBS Lett* 427 (1998) 171–174. doi: 10.1016/s0014-5793(98)00413-x.
- [308] R. Radi, M. Rodriguez, L. Castro, R. Telleri. Inhibition of mitochondrial electron transport by peroxynitrite. *Arch Biochem Biophys* 308 (1994) 89–95. doi: 10.1006/abbi.1994.1013.
- [309] R. Radi. Nitric oxide, oxidants, and protein tyrosine nitration. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101 (2004) 4003–4008. doi: 10.1073/pnas.0307446101.
- [310] S.A. Greenacre, H. Ischiropoulos. Tyrosine nitration: localisation, quantification, consequences for protein function and signal transduction. *Free Radic Res* 34 (2001) 541–581. doi: 10.1080/10715760100300471.
- [311] L.A. MacMillan-Crow, J.A. Thompson. Tyrosine modifications and inactivation of active site manganese superoxide dismutase mutant (Y34F) by peroxynitrite. *Arch Biochem Biophys* 366 (1999) 82–88. doi: 10.1006/abbi.1999.1202.
- [312] P. Schmidt, N. Youhnovski, A. Daiber, A. Balan, M. Arsic, M. Bachschmid, M. Przybylski, V. Ullrich. Specific nitration at tyrosine 430 revealed by high resolution mass spectrometry

- as basis for redox regulation of bovine prostacyclin synthase. *J Biol Chem* 278 (2003) 12813–12819. doi: 10.1074/jbc.M208080200.
- [313] A.J. Lokuta, N.A. Maertz, S.V. Meethal, K.T. Potter, T.J. Kamp, H.H. Valdivia, R.A. Haworth. Increased nitration of sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase in human heart failure. *Circulation* 111 (2005) 988–995. doi: 10.1161/01.CIR.0000156461.81529.D7.
- [314] H. Li, D.D. Gutterman, N.J. Rusch, A. Bubolz, Y. Liu. Nitration and functional loss of voltage-gated K⁺ channels in rat coronary microvessels exposed to high glucose. *Diabetes* 53 (2004) 2436–2442. doi: 10.2337/diabetes.53.9.2436.
- [315] B. Blanchard-Fillion, J.M. Souza, T. Friel, G.C.T. Jiang, K. Vrana, V. Sharov, L. Barrón, C. Schöneich, C. Quijano, B. Alvarez, R. Radi, S. Przedborski, G.S. Fernando, J. Horwitz, H. Ischiropoulos. Nitration and inactivation of tyrosine hydroxylase by peroxynitrite. *J Biol Chem* 276 (2001) 46017–46023. doi: 10.1074/jbc.M105564200.
- [316] S. Kasina, W. Rizwani, K.V.N. Radhika, S.S. Singh. Nitration of profilin effects its interaction with poly (L-proline) and actin. *J Biochem* 138 (2005) 687–695. doi: 10.1093/jb/mvi163.
- [317] G. Tedeschi, G. Cappelletti, A. Negri, L. Pagliato, M.G. Maggioni, R. Maci, S. Ronchi. Characterization of nitroproteome in neuron-like PC12 cells differentiated with nerve growth factor: identification of two nitration sites in alpha-tubulin. *Proteomics* 5 (2005) 2422–2432. doi: 10.1002/pmic.200401208.
- [318] W. Chang, D.R. Webster, A.A. Salam, D. Gruber, A. Prasad, J.P. Eiserich, J.C. Bulinski. Alteration of the C-terminal amino acid of tubulin specifically inhibits myogenic differentiation. *J Biol Chem* 277 (2002) 30690–30698. doi: 10.1074/jbc.M204930200.
- [319] B. Alvarez, R. Radi. Peroxynitrite reactivity with amino acids and proteins. *Amino Acids* 25 (2003) 295–311. doi: 10.1007/s00726-003-0018-8.
- [320] F. Yamakura, K. Ikeda. Modification of tryptophan and tryptophan residues in proteins by reactive nitrogen species. *Nitric Oxide* 14 (2006) 152–161. doi: 10.1016/j.niox.2005.07.009.
- [321] C. Szabó, H. Ischiropoulos, R. Radi. Peroxynitrite: biochemistry, pathophysiology and development of therapeutics. *Nature Reviews Drug Discovery* 6 (2007) 662–680. doi: 10.1038/nrd2222.
- [322] R.M. Uppu, W.A. Pryor. Carbon dioxide catalysis of the reaction of peroxynitrite with ethyl acetoacetate: an example of aliphatic nitration by peroxynitrite. *Biochem Biophys Res Commun* 229 (1996) 764–769. doi: 10.1006/bbrc.1996.1878.
- [323] H. Kimura. Signaling molecules: hydrogen sulfide and polysulfide. *Antioxid Redox Signal* 22 (2015) 362–376. doi: 10.1089/ars.2014.5869.
- [324] K.Y. Chen, J.C. Morris. Kinetics of oxidation of aqueous sulfide by oxygen. *Environ. Sci. Technol.* 6 (1972) 529–537. doi: 10.1021/es60065a008.
- [325] J.C. Mathai, A. Missner, P. Kügler, S.M. Saparov, M.L. Zeidel, J.K. Lee, P. Pohl. No facilitator required for membrane transport of hydrogen sulfide. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106 (2009) 16633–16638. doi: 10.1073/pnas.0902952106.
- [326] T.V. Mishanina, M. Libiad, R. Banerjee. Biogenesis of reactive sulfur species for signaling by hydrogen sulfide oxidation pathways. *Nat Chem Biol* 11 (2015) 457–464. doi: 10.1038/nchembio.1834.
- [327] K.K. Millis, K.H. Weaver, D.L. Rabenstein. Oxidation/reduction potential of glutathione. *J Org Chem* 58 (1993) 4144–4146. doi: 10.1021/jo00067a060.
- [328] J. Furne, A. Saeed, M.D. Levitt. Whole tissue hydrogen sulfide concentrations are orders of magnitude lower than presently accepted values. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 295 (2008) R1479–1485. doi: 10.1152/ajpregu.90566.2008.
- [329] O. Kabil, R. Banerjee. Enzymology of H₂S biogenesis, decay and signaling. *Antioxid Redox Signal* 20 (2014) 770–782. doi: 10.1089/ars.2013.5339.
- [330] R. Pietri, E. Román-Morales, J. López-Garriga. Hydrogen sulfide and hemeproteins: knowledge and mysteries. *Antioxid Redox Signal* 15 (2011) 393–404. doi: 10.1089/ars.2010.3698.

- [331] P. Nicholls. Inhibition of cytochrome c oxidase by sulphide. *Biochem Soc Trans* 3 (1975) 316–319. doi: 10.1042/bst0030316.
- [332] J.P. Collman, S. Ghosh, A. Dey, R.A. Decréau. Using a functional enzyme model to understand the chemistry behind hydrogen sulfide induced hibernation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106 (2009) 22090–22095. doi: 10.1073/pnas.0904082106.
- [333] V. Vitvitsky, P.K. Yadav, S. An, J. Seravalli, U.-S. Cho, R. Banerjee. Structural and mechanistic insights into hemoglobin-catalyzed hydrogen sulfide oxidation and the fate of polysulfide products. *J Biol Chem* 292 (2017) 5584–5592. doi: 10.1074/jbc.M117.774943.
- [334] V. Vitvitsky, O. Kabil, R. Banerjee. High turnover rates for hydrogen sulfide allow for rapid regulation of its tissue concentrations. *Antioxid Redox Signal* 17 (2012) 22–31. doi: 10.1089/ars.2011.4310.
- [335] E. Cuevasanta, M. Lange, J. Bonanata, E.L. Coitiño, G. Ferrer-Sueta, M.R. Filipovic, B. Alvarez. Reaction of hydrogen sulfide with disulfide and sulfenic acid to form the strongly nucleophilic persulfide. *J Biol Chem* 290 (2015) 26866–26880. doi: 10.1074/jbc.M115.672816.
- [336] M.M. Cortese-Krott, B.O. Fernandez, J.L.T. Santos, E. Mergia, M. Grman, P. Nagy, M. Kelm, A. Butler, M. Feelisch. Nitrosopersulfide (SSNO⁻) accounts for sustained NO bioactivity of S-nitrosothiols following reaction with sulfide. *Redox Biology* 2 (2014) 234–244. doi: 10.1016/j.redox.2013.12.031.
- [337] O. Kabil, R. Banerjee. Redox biochemistry of hydrogen sulfide. *J Biol Chem* 285 (2010) 21903–21907. doi: 10.1074/jbc.R110.128363.
- [338] Y. Kimura, Y. Mikami, K. Osumi, M. Tsugane, J. Oka, H. Kimura. Polysulfides are possible H₂S-derived signaling molecules in rat brain. *FASEB J* 27 (2013) 2451–2457. doi: 10.1096/fj.12-226415.
- [339] S. Koike, Y. Ogasawara, N. Shibuya, H. Kimura, K. Ishii. Polysulfide exerts a protective effect against cytotoxicity caused by t-butylhydroperoxide through Nrf2 signaling in neuroblastoma cells. *FEBS Lett* 587 (2013) 3548–3555. doi: 10.1016/j.febslet.2013.09.013.
- [340] J.M. Fukuto, L.J. Ignarro, P. Nagy, D.A. Wink, C.G. Kevil, M. Feelisch, M.M. Cortese-Krott, C.L. Bianco, Y. Kumagai, A.J. Hobbs, J. Lin, T. Ida, T. Akaike. Biological hydropersulfides and related polysulfides – a new concept and perspective in redox biology. *FEBS Letters* 592 (2018) 2140–2152. doi: 10.1002/1873-3468.13090.
- [341] T. Akaike, T. Ida, F.-Y. Wei, M. Nishida, Y. Kumagai, M.M. Alam, H. Ihara, T. Sawa, T. Matsunaga, S. Kasamatsu, A. Nishimura, M. Morita, K. Tomizawa, A. Nishimura, S. Watanabe, K. Inaba, H. Shima, N. Tanuma, M. Jung, S. Fujii, Y. Watanabe, M. Ohmuraya, P. Nagy, M. Feelisch, J.M. Fukuto, H. Motohashi. Cysteinyl-tRNA synthetase governs cysteine polysulfidation and mitochondrial bioenergetics. *Nat Commun* 8 (2017) 1177. doi: 10.1038/s41467-017-01311-y.
- [342] A. Meister, M.E. Anderson. Glutathione. *Annu Rev Biochem* 52 (1983) 711–760. doi: 10.1146/annurev.bi.52.070183.003431.
- [343] V.I. Lushchak. Glutathione homeostasis and functions: potential targets for medical interventions. *J Amino Acids* 2012 (2012) 736837. doi: 10.1155/2012/736837.
- [344] C.C. Franklin, D.S. Backos, I. Mohar, C.C. White, H.J. Forman, T.J. Kavanagh. Structure, function, and post-translational regulation of the catalytic and modifier subunits of glutamate cysteine ligase. *Mol Aspects Med* 30 (2009) 86–98. doi: 10.1016/j.mam.2008.08.009.
- [345] S.C. Lu. Glutathione synthesis. *Biochim Biophys Acta* 1830 (2013) 3143–3153. doi: 10.1016/j.bbagen.2012.09.008.
- [346] S.C. Lu. Regulation of glutathione synthesis. *Mol Aspects Med* 30 (2009) 42–59. doi: 10.1016/j.mam.2008.05.005.
- [347] Z.Z. Shi, J. Osei-Frimpong, G. Kala, S.V. Kala, R.J. Barrios, G.M. Habib, D.J. Lukin, C.M. Danney, M.M. Matzuk, M.W. Lieberman. Glutathione synthesis is essential for mouse development but not for cell growth in culture. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97 (2000) 5101–5106. doi: 10.1073/pnas.97.10.5101.

- [348] Y. Yang, M.Z. Dieter, Y. Chen, H.G. Shertzer, D.W. Nebert, T.P. Dalton. Initial characterization of the glutamate-cysteine ligase modifier subunit Gclm(-/-) knockout mouse. Novel model system for a severely compromised oxidative stress response. *J Biol Chem* 277 (2002) 49446–49452. doi: 10.1074/jbc.M209372200.
- [349] G. Giordano, C.C. White, L.A. McConnachie, C. Fernandez, T.J. Kavanagh, L.G. Costa. Neurotoxicity of domoic acid in cerebellar granule neurons in a genetic model of glutathione deficiency. *Mol Pharmacol* 70 (2006) 2116–2126. doi: 10.1124/mol.106.027748.
- [350] M. Tomic, J. Ott, S. Barral, P. Bovet, P. Deppen, F. Gheorghita, M.-L. Matthey, J. Parnas, M. Preisig, M. Saraga, A. Solida, S. Timm, A.G. Wang, T. Werge, M. Cuénod, K.Q. Do. Schizophrenia and oxidative stress: glutamate cysteine ligase modifier as a susceptibility gene. *Am J Hum Genet* 79 (2006) 586–592. doi: 10.1086/507566.
- [351] A.V. Polonikov, V.P. Ivanov, M.A. Solodilova, I.V. Khoroshaya, M.A. Kozhuhov, V.I. Panfilov. The relationship between polymorphisms in the glutamate cysteine ligase gene and asthma susceptibility. *Respir Med* 101 (2007) 2422–2424. doi: 10.1016/j.rmed.2007.06.012.
- [352] N. Dahl, M. Pigg, E. Ristoff, R. Gali, B. Carlsson, B. Mannervik, A. Larsson, P. Board. Missense mutations in the human glutathione synthetase gene result in severe metabolic acidosis, 5-oxoprolinuria, hemolytic anemia and neurological dysfunction. *Hum Mol Genet* 6 (1997) 1147–1152. doi: 10.1093/hmg/6.7.1147.
- [353] J. Markovic, C. Borrás, A. Ortega, J. Sastre, J. Viña, F.V. Pallardó. Glutathione is recruited into the nucleus in early phases of cell proliferation. *J Biol Chem* 282 (2007) 20416–20424. doi: 10.1074/jbc.M609582200.
- [354] P. Diaz Vivancos, T. Wolff, J. Markovic, F.V. Pallardó, C.H. Foyer. A nuclear glutathione cycle within the cell cycle. *Biochem J* 431 (2010) 169–178. doi: 10.1042/BJ20100409.
- [355] D.W. Voehringer, D.J. McConkey, T.J. McDonnell, S. Brisbay, R.E. Meyn. Bcl-2 expression causes redistribution of glutathione to the nucleus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95 (1998) 2956–2960. doi: 10.1073/pnas.95.6.2956.
- [356] K. Kojer, M. Bien, H. Gangel, B. Morgan, T.P. Dick, J. Riemer. Glutathione redox potential in the mitochondrial intermembrane space is linked to the cytosol and impacts the Mia40 redox state. *EMBO J* 31 (2012) 3169–3182. doi: 10.1038/emboj.2012.165.
- [357] Y. Wang, F.S. Yen, X.G. Zhu, R.C. Timson, R. Weber, C. Xing, Y. Liu, B. Allwein, H. Luo, H.-W. Yeh, S. Heissel, G. Unlu, E.R. Gamazon, M.G. Kharas, R. Hite, K. Birsoy. SLC25A39 is necessary for mitochondrial glutathione import in mammalian cells. *Nature* 599 (2021) 136–140. doi: 10.1038/s41586-021-04025-w.
- [358] A.J. Ponsero, A. Igbaria, M.A. Darch, S. Miled, C.E. Outten, J.R. Winther, G. Palais, B. D’Autréaux, A. Delaunay-Moisan, M.B. Toledano. Endoplasmic reticulum transport of glutathione by Sec61 is regulated by Ero1 and Bip. *Mol Cell* 67 (2017) 962–973.e5. doi: 10.1016/j.molcel.2017.08.012.
- [359] N.J. Bulleid, L. Ellgaard. Multiple ways to make disulfides. *Trends Biochem Sci* 36 (2011) 485–492. doi: 10.1016/j.tibs.2011.05.004.
- [360] F. Hatahet, L.W. Ruddock. Protein disulfide isomerase: a critical evaluation of its function in disulfide bond formation. *Antioxid Redox Signal* 11 (2009) 2807–2850. doi: 10.1089/ars.2009.2466.
- [361] N.J. Darby, T.E. Creighton. Characterization of the active site cysteine residues of the thioredoxin-like domains of protein disulfide isomerase. *Biochemistry* 34 (1995) 16770–16780. doi: 10.1021/bi00051a027.
- [362] S. Chakravarthi, N.J. Bulleid. Glutathione is required to regulate the formation of native disulfide bonds within proteins entering the secretory pathway. *J Biol Chem* 279 (2004) 39872–39879. doi: 10.1074/jbc.M406912200.
- [363] C.S. Sevier, C.A. Kaiser. Ero1 and redox homeostasis in the endoplasmic reticulum. *Biochim Biophys Acta* 1783 (2008) 549–556. doi: 10.1016/j.bbamcr.2007.12.011.

- [364] T.J. Tavender, J.J. Springate, N.J. Bulleid. Recycling of peroxiredoxin IV provides a novel pathway for disulphide formation in the endoplasmic reticulum. *EMBO J* 29 (2010) 4185–4197. doi: 10.1038/emboj.2010.273.
- [365] B.P. Tu, J.S. Weissman. The FAD- and O₂-dependent reaction cycle of Ero1-mediated oxidative protein folding in the endoplasmic reticulum. *Mol Cell* 10 (2002) 983–994. doi: 10.1016/S1097-2765(02)00696-2.
- [366] S. Chakravarthi, C.E. Jessop, N.J. Bulleid. The role of glutathione in disulphide bond formation and endoplasmic-reticulum-generated oxidative stress. *EMBO Rep* 7 (2006) 271–275. doi: 10.1038/sj.embor.7400645.
- [367] C. Berndt, C.H. Lillig, A. Holmgren. Thiol-based mechanisms of the thioredoxin and glutaredoxin systems: implications for diseases in the cardiovascular system. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 292 (2007) H1227-1236. doi: 10.1152/ajpheart.01162.2006.
- [368] B. Xia, A. Vlamis-Gardikas, A. Holmgren, P.E. Wright, H.J. Dyson. Solution structure of *Escherichia coli* glutaredoxin-2 shows similarity to mammalian glutathione-S-transferases. *J Mol Biol* 310 (2001) 907–918. doi: 10.1006/jmbi.2001.4721.
- [369] F.T. Ogata, V. Branco, F.F. Vale, L. Coppo. Glutaredoxin: discovery, redox defense and much more. *Redox Biol* 43 (2021) 101975. doi: 10.1016/j.redox.2021.101975.
- [370] D.S. Berkholz, H.R. Faber, S.N. Savvides, P.A. Karplus. Catalytic cycle of human glutathione reductase near 1 Å resolution. *J Mol Biol* 382 (2008) 371–384. doi: 10.1016/j.jmb.2008.06.083.
- [371] P.S. Ramos, J.C. Oates, D.L. Kamen, A.H. Williams, P.M. Gaffney, J.A. Kelly, K.M. Kaufman, R.P. Kimberly, T.B. Niewold, C.O. Jacob, B.P. Tsao, G.S. Alarcón, E.E. Brown, J.C. Edberg, M.A. Petri, R. Ramsey-Goldman, J.D. Reveille, L.M. Vilá, J.A. James, J.M. Guthridge, J.T. Merrill, S.A. Boackle, B.I. Freedman, R.H. Scofield, A.M. Stevens, T.J. Vyse, L.A. Criswell, K.L. Moser, M.E. Alarcón-Riquelme, C.D. Langefeld, J.B. Harley, G.S. Gilkeson. Variable association of reactive intermediate genes with systemic lupus erythematosus in populations with different African ancestry. *J Rheumatol* 40 (2013) 842–849. doi: 10.3899/jrheum.120989.
- [372] N.M. Kamerbeek, R. van Zwieten, M. de Boer, G. Morren, H. Vuil, N. Bannink, C. Lincke, K.M. Dolman, K. Becker, R.H. Schirmer, S. Gromer, D. Roos. Molecular basis of glutathione reductase deficiency in human blood cells. *Blood* 109 (2007) 3560–3566. doi: 10.1182/blood-2006-08-042531.
- [373] D. Sheehan, G. Meade, V.M. Foley, C.A. Dowd. Structure, function and evolution of glutathione transferases: implications for classification of non-mammalian members of an ancient enzyme superfamily. *Biochem J* 360 (2001) 1–16. doi: 10.1042/0264-6021:3600001.
- [374] J.D. Hayes, J.U. Flanagan, I.R. Jowsey. Glutathione transferases. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 45 (2005) 51–88. doi: 10.1146/annurev.pharmtox.45.120403.095857.
- [375] P. Eaton, N. Wright, D.J. Hearse, M.J. Shattock. Glyceraldehyde phosphate dehydrogenase oxidation during cardiac ischemia and reperfusion. *J Mol Cell Cardiol* 34 (2002) 1549–1560. doi: 10.1006/jmcc.2002.2108.
- [376] Y. Xiong, J.D. Uys, K.D. Tew, D.M. Townsend. S-glutathionylation: from molecular mechanisms to health outcomes. *Antioxid Redox Signal* 15 (2011) 233–270. doi: 10.1089/ars.2010.3540.
- [377] M.M. Gallogly, J.J. Mieyal. Mechanisms of reversible protein glutathionylation in redox signaling and oxidative stress. *Curr Opin Pharmacol* 7 (2007) 381–391. doi: 10.1016/j.coph.2007.06.003.
- [378] T. Adachi, D.R. Pimentel, T. Heibeck, X. Hou, Y.J. Lee, B. Jiang, Y. Ido, R.A. Cohen. S-glutathiolation of Ras mediates redox-sensitive signaling by angiotensin II in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem* 279 (2004) 29857–29862. doi: 10.1074/jbc.M313320200.
- [379] J.T. Jones, X. Qian, J.L.J. van der Velden, S.B. Chia, D.H. McMillan, S. Flemer, S.M. Hoffman, K.G. Lahue, R.W. Schneider, J.D. Nolin, V. Anathy, A. van der Vliet, D.M. Townsend, K.D. Tew, Y.M.W. Janssen-Heininger. Glutathione S-transferase pi modulates

- NF- κ B activation and pro-inflammatory responses in lung epithelial cells. *Redox Biol* 8 (2016) 375–382. doi: 10.1016/j.redox.2016.03.005.
- [380] C.S. Velu, S.K. Niture, C.E. Doneanu, N. Pattabiraman, K.S. Srivenugopal. Human p53 is inhibited by glutathionylation of cysteines present in the proximal DNA-binding domain during oxidative stress. *Biochemistry* 46 (2007) 7765–7780. doi: 10.1021/bi700425y.
- [381] A. Musaogullari, Y.-C. Chai. Redox regulation by protein S-glutathionylation: from molecular mechanisms to implications in health and disease. *Int J Mol Sci* 21 (2020). doi: 10.3390/ijms21218113.
- [382] C.C. Dahm, K. Moore, M.P. Murphy. Persistent S-nitrosation of complex I and other mitochondrial membrane proteins by S-nitrosothiols but not nitric oxide or peroxyxynitrite: implications for the interaction of nitric oxide with mitochondria. *J Biol Chem* 281 (2006) 10056–10065. doi: 10.1074/jbc.M512203200.
- [383] K. Kaliyaperumal, A.K. Sharma, D.G. McDonald, J.S. Dhindsa, C. Yount, A.K. Singh, J.-S. Won, I. Singh. S-Nitrosoglutathione-mediated STAT3 regulation in efficacy of radiotherapy and cisplatin therapy in head and neck squamous cell carcinoma. *Redox Biol* 6 (2015) 41–50. doi: 10.1016/j.redox.2015.07.001.
- [384] N.V. Marozkina, B. Gaston. S-Nitrosylation signaling regulates cellular protein interactions. *Biochim Biophys Acta* 1820 (2012) 722–729. doi: 10.1016/j.bbagen.2011.06.017.
- [385] Y.-Z. Fang, S. Yang, G. Wu. Free radicals, antioxidants, and nutrition. *Nutrition* 18 (2002) 872–879. doi: 10.1016/s0899-9007(02)00916-4.
- [386] G.L. Newton, K. Arnold, M.S. Price, C. Sherrill, S.B. Delcardayre, Y. Aharonowitz, G. Cohen, J. Davies, R.C. Fahey, C. Davis. Distribution of thiols in microorganisms: mycothiol is a major thiol in most actinomycetes. *J Bacteriol* 178 (1996) 1990–1995. doi: 10.1128/jb.178.7.1990-1995.1996.
- [387] R.G. Bartsch, G.L. Newton, C. Sherrill, R.C. Fahey. Glutathione amide and its perthiol in anaerobic sulfur bacteria. *J Bacteriol* 178 (1996) 4742–4746. doi: 10.1128/jb.178.15.4742-4746.1996.
- [388] G.L. Newton, M. Rawat, J.J. La Clair, V.K. Jothivasan, T. Budiarto, C.J. Hamilton, A. Claiborne, J.D. Helmann, R.C. Fahey/ Bacillithiol is an antioxidant thiol produced in Bacilli. *Nat Chem Biol* 5 (2009) 625–627. doi: 10.1038/nchembio.189.
- [389] P. Frendo, J. Harrison, C. Norman, M.J. Hernández Jiménez, G. Van de Sype, A. Gilabert, A. Puppo. Glutathione and homoglutathione play a critical role in the nodulation process of *Medicago truncatula*. *Mol Plant Microbe Interact* 18 (2005) 254–259. doi: 10.1094/MPMI-18-0254.
- [390] L. Colville, C.M.B. Sáez, G.P. Lewis, I. Kranner. The distribution of glutathione and homoglutathione in leaf, root and seed tissue of 73 species across the three sub-families of the Leguminosae. *Phytochemistry* 115 (2015) 175–183. doi: 10.1016/j.phytochem.2015.01.011.
- [391] S. Klapheck, B. Chrost, J. Starke, H. Zimmermann. γ -Glutamylcysteinylserine — a new homologue of glutathione in plants of the family Poaceae. *Botanica Acta* 105 (1992) 174–179. doi: 10.1111/j.1438-8677.1992.tb00284.x.
- [392] S.M. Kanzok, A. Fechner, H. Bauer, J.K. Ulschmid, H.M. Müller, J. Botella-Munoz, S. Schnewly, R. Schirmer, K. Becker. Substitution of the thioredoxin system for glutathione reductase in *Drosophila melanogaster*. *Science* 291 (2001) 643–646. doi: 10.1126/science.291.5504.643.
- [393] R.L. Krauth-Siegel, M.A. Comini. Redox control in trypanosomatids, parasitic protozoa with trypanothione-based thiol metabolism. *Biochim Biophys Acta* 1780 (2008) 1236–1248. doi: 10.1016/j.bbagen.2008.03.006.
- [394] F. Aslund, K.D. Berndt, A. Holmgren. Redox potentials of glutaredoxins and other thiol-disulfide oxidoreductases of the thioredoxin superfamily determined by direct protein-protein redox equilibria. *J Biol Chem* 272 (1997) 30780–30786. doi: 10.1074/jbc.272.49.30780.

- [395] S. Lee, S.M. Kim, R.T. Lee. Thioredoxin and thioredoxin target proteins: from molecular mechanisms to functional significance. *Antioxid Redox Signal* 18 (2013) 1165–1207. doi: 10.1089/ars.2011.4322.
- [396] L. Zhong, E.S. Arnér, A. Holmgren. Structure and mechanism of mammalian thioredoxin reductase: the active site is a redox-active selenolthiol/selenenylsulfide formed from the conserved cysteine-selenocysteine sequence. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97 (2000) 5854–5859. doi: 10.1073/pnas.100114897.
- [397] A. Jastrzab, E. Skrzydlewska. Thioredoxin-dependent system. Application of inhibitors. *J Enzyme Inhib Med Chem* 36 (2021) 362–371. doi: 10.1080/14756366.2020.1867121.
- [398] C. Johansson, C.H. Lillig, A. Holmgren. Human mitochondrial glutaredoxin reduces S-glutathionylated proteins with high affinity accepting electrons from either glutathione or thioredoxin reductase. *J Biol Chem* 279 (2004) 7537–7543. doi: 10.1074/jbc.M312719200.
- [399] G. Bellisola, G. Fracasso, R. Ippoliti, G. Menestrina, A. Rosén, S. Soldà, S. Udali, R. Tomazzolli, G. Tridente, M. Colombatti. Reductive activation of ricin and ricin A-chain immunotoxins by protein disulfide isomerase and thioredoxin reductase. *Biochem Pharmacol* 67 (2004) 1721–1731. doi: 10.1016/j.bcp.2004.01.013.
- [400] J.M. May, S. Mendiratta, K.E. Hill, R.F. Burk. Reduction of dehydroascorbate to ascorbate by the selenoenzyme thioredoxin reductase. *J Biol Chem* 272 (1997) 22607–22610. doi: 10.1074/jbc.272.36.22607.
- [401] W.R. Heineman, W.B. Jensen, Leland C. Clark Jr. (1918–2005), *Biosensors and Bioelectronics* 21 (2006) 1403–1404. doi: 10.1016/j.bios.2005.12.005.
- [402] L.C. Clark Jr., C. Lyons, Electrode systems for continuous monitoring in cardiovascular surgery, *Ann N Y Acad Sci* 102 (1962) 29–45. doi: 10.1111/j.1749-6632.1962.tb13623.x.
- [403] M.E. Payne, A. Zamarayeva, V.I. Pister, N.A.D. Yamamoto, A.C. Arias. Printed, flexible lactate sensors: design considerations before performing on-body measurements. *Sci Rep* 9 (2019) 13720. doi: 10.1038/s41598-019-49689-7.
- [404] I. Satoh, I. Karube, S. Suzuki. Enzyme electrode for free cholesterol. *Biotechnol Bioeng* 19 (1977) 1095–1099. doi: 10.1002/bit.260190711.
- [405] Z. Sun, T. Nguyen, K. McAuliffe, M. You. Intracellular imaging with genetically encoded RNA-based molecular sensors. *Nanomaterials (Basel)* 9 (2019). doi: 10.3390/nano9020233.
- [406] S. Ramazi, J. Zahiri. Post-translational modifications in proteins: resources, tools and prediction methods. *Database* 2021:baab012. doi: 10.1093/database/baab012.
- [407] B. Macek, K. Forchhammer, J. Hardouin, E. Weber-Ban, C. Grangeasse, I. Mijakovic. Protein post-translational modifications in bacteria. *Nat Rev Microbiol* 17 (2019) 651–664. doi: 10.1038/s41579-019-0243-0.
- [408] M.G. Rosenfeld, V.V. Lunyak, C.K. Glass. Sensors and signals: a coactivator/corepressor/epigenetic code for integrating signal-dependent programs of transcriptional response. *Genes Dev* 20 (2006) 1405–1428. doi: 10.1101/gad.1424806.
- [409] T.M. Filtz, W.K. Vogel, M. Leid. Regulation of transcription factor activity by interconnected post-translational modifications. *Trends Pharmacol Sci* 35 (2014) 76–85. doi: 10.1016/j.tips.2013.11.005.
- [410] C.A. Grove, A.J.M. Walhout. Transcription factor functionality and transcription regulatory networks. *Mol Biosyst* 4 (2008) 309–314. doi: 10.1039/b715909a.
- [411] H.E. Marshall, K. Merchant, J.S. Stamler. Nitrosation and oxidation in the regulation of gene expression. *FASEB J* 14 (2000) 1889–1900. doi: 10.1096/fj.00.011rev.
- [412] E. Sevilla, M.T. Bes, A. González, M.L. Peleato, M.F. Fillat. Redox-based transcriptional regulation in prokaryotes: revisiting model mechanisms. *Antioxid Redox Signal* 30 (2019) 1651–1696. doi: 10.1089/ars.2017.7442.
- [413] D.M. van Aalten, C.C. DiRusso, J. Knudsen. The structural basis of acyl coenzyme A-dependent regulation of the transcription factor FadR. *EMBO J* 20 (2001) 2041–2050. doi: 10.1093/emboj/20.8.2041.

- [414] K.J. McLaughlin, C.M. Strain-Damerell, K. Xie, D. Brekasis, A.S. Soares, M.S.B. Paget, C.L. Kielkopf. Structural basis for NADH/NAD⁺ redox sensing by a Rex family repressor. *Mol Cell* 38 (2010) 563–575. doi: 10.1016/j.molcel.2010.05.006.
- [415] Q. Ji, L. Zhang, M.B. Jones, F. Sun, X. Deng, H. Liang, H. Cho, P. Brugarolas, Y.N. Gao, S.N. Peterson, L. Lan, T. Bae, C. He. Molecular mechanism of quinone signaling mediated through S-quinonization of a YodB family repressor QsrR. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110 (2013) 5010–5015. doi: 10.1073/pnas.1219446110.
- [416] M.J. Borrok, L.L. Kiessling, K.T. Forest. Conformational changes of glucose/galactose-binding protein illuminated by open, unliganded, and ultra-high-resolution ligand-bound structures. *Protein Sci* 16 (2007) 1032–1041. doi: 10.1110/ps.062707807.
- [417] A.L. Davidson, H.A. Shuman, H. Nikaido. Mechanism of maltose transport in *Escherichia coli*: transmembrane signaling by periplasmic binding proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89 (1992) 2360–2364. doi: 10.1073/pnas.89.6.2360.
- [418] I. Alicea, J.S. Marvin, A.E. Miklos, A.D. Ellington, L.L. Looger, E.R. Schreiter. Structure of the *Escherichia coli* phosphonate binding protein PhnD and rationally optimized phosphonate biosensors. *J Mol Biol* 414 (2011) 356–369. doi: 10.1016/j.jmb.2011.09.047.
- [419] B.H. Oh, C.H. Kang, H. De Bondt, S.H. Kim, K. Nikaido, A.K. Joshi, G.F. Ames. The bacterial periplasmic histidine-binding protein. structure/function analysis of the ligand-binding site and comparison with related proteins. *J Biol Chem* 269 (1994) 4135–4143.
- [420] D.B. Bylund. Alpha-2 Adrenoceptors. in: S.J. Enna, D.B. Bylund (Eds.), *xPharm: The Comprehensive Pharmacology Reference*, 2007 1–9. doi: 10.1016/B978-008055232-3.60195-3.
- [421] M. Ishii, Y. Kurachi. Muscarinic acetylcholine receptors. *Curr Pharm Des* 12 (2006) 3573–3581. doi: 10.2174/138161206778522056.
- [422] C. Missale, S.R. Nash, S.W. Robinson, M. Jaber, M.G. Caron. Dopamine receptors: from structure to function. *Physiol Rev* 78 (1998) 189–225. doi: 10.1152/physrev.1998.78.1.189.
- [423] J.R. Giorgione, J.-H. Lin, J.A. McCammon, A.C. Newton. Increased membrane affinity of the C1 domain of protein kinase Cdelta compensates for the lack of involvement of its C2 domain in membrane recruitment. *J Biol Chem* 281 (2006) 1660–1669. doi: 10.1074/jbc.M510251200.
- [424] M. Hyvönen, M.J. Macias, M. Nilges, H. Oschkinat, M. Saraste, M. Wilmanns. Structure of the binding site for inositol phosphates in a PH domain. *EMBO J* 14 (1995) 4676–4685.
- [425] M.A. Lemmon, K.M. Ferguson, R. O'Brien, P.B. Sigler, J. Schlessinger. Specific and high-affinity binding of inositol phosphates to an isolated pleckstrin homology domain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92 (1995) 10472–10476. doi: 10.1073/pnas.92.23.10472.
- [426] X. Fei, Y. Gu. Progress in modifications and applications of fluorescent dye probe. *Prog Nat Sci* 19 (2009) 1–7. doi: 10.1016/j.pnsc.2008.06.004.
- [427] Y. Fu, N.S. Finney. Small-molecule fluorescent probes and their design. *RSC Adv.* 8 (2018) 29051–29061. doi: 10.1039/C8RA02297F.
- [428] E. Oliveira, E. Bértolo, C. Núñez, V. Pilla, H.M. Santos, J. Fernández-Lodeiro, A. Fernández-Lodeiro, J. Djafari, J.L. Capelo, C. Lodeiro. Green and red fluorescent dyes for translational applications in imaging and sensing analytes: a dual-color flag. *ChemistryOpen* 7 (2018) 9–52. doi: 10.1002/open.201700135.
- [429] K. Im, S. Mareninov, M.F.P. Diaz, W.H. Yong. An introduction to performing immunofluorescence staining. *Methods Mol Biol* 1897 (2019) 299–311. doi: 10.1007/978-1-4939-8935-5_26.
- [430] R. Duval, C. Duplais. Fluorescent natural products as probes and tracers in biology. *Nat Prod Rep* 34 (2017) 161–193. doi: 10.1039/C6NP00111D.
- [431] O. Shimomura, F.H. Johnson, Y. Saiga. Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusan, aequorea. *J Cell Comp Physiol* 59 (1962) 223–239. doi: 10.1002/jcp.1030590302.

- [432] O. Shimomura. Luminescence of aequorin is triggered by the binding of two calcium ions. *Biochem Biophys Res Commun* 211 (1995) 359–363. doi: 10.1006/bbrc.1995.1821.
- [433] S. Inouye, S. Sasaki. Blue fluorescent protein from the calcium-sensitive photoprotein aequorin: catalytic properties for the oxidation of coelenterazine as an oxygenase. *FEBS Lett* 580 (2006) 1977–1982. doi: 10.1016/j.febslet.2006.02.065.
- [434] H. Morise, O. Shimomura, F.H. Johnson, J. Winant. Intermolecular energy transfer in the bioluminescent system of *Aequorea*. *Biochemistry* 13 (1974) 2656–2662. doi: 10.1021/bi00709a028.
- [435] D.C. Prasher, V.K. Eckenrode, W.W. Ward, F.G. Prendergast, M.J. Cormier. Primary structure of the *Aequorea victoria* green-fluorescent protein. *Gene* 111 (1992) 229–233. doi: 10.1016/0378-1119(92)90691-h.
- [436] M. Chalfie, Y. Tu, G. Euskirchen, W.W. Ward, D.C. Prasher. Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science* 263 (1994) 802–805. doi: 10.1126/science.8303295.
- [437] R.Y. Tsien. The green fluorescent protein. *Annu Rev Biochem* 67 (1998) 509–544. doi: 10.1146/annurev.biochem.67.1.509.
- [438] S.H. Bokman, W.W. Ward. Renaturation of *Aequorea* green-fluorescent protein *Biochem Biophys Res Commun* 101 (1981) 1372–1380. doi: 10.1016/0006-291X(81)91599-0.
- [439] W.B. Frommer, M.W. Davidson, R.E. Campbell. Genetically encoded biosensors based on engineered fluorescent proteins. *Chem Soc Rev* 38 (2009) 2833–2841. doi: 10.1039/b907749a.
- [440] D.P. Barondeau, C.D. Putnam, C.J. Kassmann, J.A. Tainer, E.D. Getzoff. Mechanism and energetics of green fluorescent protein chromophore synthesis revealed by trapped intermediate structures. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100 (2003) 12111–12116. doi: 10.1073/pnas.2133463100.
- [441] M.A. Rosenow, H.A. Huffman, M.E. Phail, R.M. Wachter. The crystal structure of the Y66L variant of green fluorescent protein supports a cyclization–oxidation–dehydration mechanism for chromophore maturation. *Biochemistry* 43 (2004) 4464–4472. doi: 10.1021/bi0361315.
- [442] B.G. Reid, G.C. Flynn. Chromophore formation in green fluorescent protein. *Biochemistry* 36 (1997) 6786–6791. doi: 10.1021/bi970281w.
- [443] L. Zhang, H.N. Patel, J.W. Lappe, R.M. Wachter. Reaction progress of Chromophore Biogenesis in Green Fluorescent Protein. *J. Am. Chem. Soc.* 128 (2006) 4766–4772. doi: 10.1021/ja0580439.
- [444] M. Ormö, A.B. Cubitt, K. Kallio, L.A. Gross, R.Y. Tsien, S.J. Remington. Crystal structure of the *Aequorea victoria* green fluorescent protein. *Science* 273 (1996) 1392–1395. doi: 10.1126/science.273.5280.1392.
- [445] S.L. Maddalo, M. Zimmer. The role of the protein matrix in green fluorescent protein fluorescence. *Photochem Photobiol* 82 (2006) 367–372. doi: 10.1562/2005-04-11-RA-485.
- [446] K. Brejc, T.K. Sixma, P.A. Kitts, S.R. Kain, R.Y. Tsien, M. Ormö, S.J. Remington. Structural basis for dual excitation and photoisomerization of the *Aequorea victoria* green fluorescent protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94 (1997) 2306–2311. doi: 10.1073/pnas.94.6.2306.
- [447] M. Chattoraj, B.A. King, G.U. Bublitz, S.G. Boxer. Ultra-fast excited state dynamics in green fluorescent protein: multiple states and proton transfer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93 (1996) 8362–8367. doi: 10.1073/pnas.93.16.8362.
- [448] J.J. van Thor, G. Zanetti, K.L. Ronayne, M. Towrie. Structural events in the photocycle of green fluorescent protein. *J Phys Chem B* 109 (2005) 16099–16108. doi: 10.1021/jp051315+.
- [449] H. Lossau, A. Kummer, R. Heinecke, F. Pöllinger-Dammer, C. Kompa, G. Bieser, T. Jonsson, C.M. Silva, M.M. Yang, D.C. Youvan, M.E. Michel-Beyerle. Time-resolved spectroscopy of wild-type and mutant Green Fluorescent Proteins reveals excited state

- deprotonation consistent with fluorophore-protein interactions. *Chem Phys* 213 (1996) 1–16. doi: 10.1016/S0301-0104(96)00340-0.
- [450] G.J. Palm, A. Zdanov, G.A. Gaitanaris, R. Stauber, G.N. Pavlakis, A. Wlodawer. The structural basis for spectral variations in green fluorescent protein. *Nat Struct Biol* 4 (1997) 361–365. doi: 10.1038/nsb0597-361.
- [451] H. Masuda, Y. Takenaka, A. Yamaguchi, S. Nishikawa, H. Mizuno. A novel yellowish-green fluorescent protein from the marine copepod, *Chiridius poppei*, and its use as a reporter protein in HeLa cells. *Gene* 372 (2006) 18–25. doi: 10.1016/j.gene.2005.11.031.
- [452] E.K. Bomati, J.E. Haley, J.P. Noel, D.D. Deheyn. Spectral and structural comparison between bright and dim green fluorescent proteins in *Amphioxus*. *Sci Rep* 4 (2014) 5469. doi: 10.1038/srep05469.
- [453] N.C. Shaner, G.G. Lambert, A. Chamma, Y. Ni, P.J. Cranfill, M.A. Baird, B.R. Sell, J.R. Allen, R.N. Day, M. Israelsson, M.W. Davidson, J. Wang. A bright monomeric green fluorescent protein derived from *Branchiostoma lanceolatum*. *Nat Methods* 10 (2013) 407–409. doi: 10.1038/nmeth.2413.
- [454] G.G. Lambert, H. Depernet, G. Gotthard, D.T. Schultz, I. Navizet, T. Lambert, S.R. Adams, A. Torreblanca-Zanca, M. Chu, D.S. Bindels, V. Levesque, J. Nero Moffatt, A. Salih, A. Royant, N.C. Shaner. *Aequorea*'s secrets revealed: New fluorescent proteins with unique properties for bioimaging and biosensing. *PLoS Biol* 18 (2020) e3000936. doi: 10.1371/journal.pbio.3000936.
- [455] M. Hirano, R. Ando, S. Shimozono, M. Sugiyama, N. Takeda, H. Kurokawa, R. Deguchi, K. Endo, K. Haga, R. Takai-Todaka, S. Inaura, Y. Matsumura, H. Hama, Y. Okada, T. Fujiwara, T. Morimoto, K. Katayama, A. Miyawaki. A highly photostable and bright green fluorescent protein. *Nat Biotechnol* 40 (2022) 1132–1142. doi: 10.1038/s41587-022-01278-2.
- [456] W. Tomosugi, T. Matsuda, T. Tani, T. Nemoto, I. Kotera, K. Saito, K. Horikawa, T. Nagai. An ultramarine fluorescent protein with increased photostability and pH insensitivity. *Nat Methods* 6 (2009) 351–353. doi: 10.1038/nmeth.1317.
- [457] T.T. Yang, P. Sinai, G. Green, P.A. Kitts, Y.T. Chen, L. Lybarger, R. Chervenak, G.H. Patterson, D.W. Piston, S.R. Kain. Improved fluorescence and dual color detection with enhanced blue and green variants of the green fluorescent protein. *J Biol Chem* 273 (1998) 8212–8216. doi: 10.1074/jbc.273.14.8212.
- [458] M.A. Rizzo, G.H. Springer, B. Granada, D.W. Piston. An improved cyan fluorescent protein variant useful for FRET. *Nature Biotechnol* 22 (2004) 445–449. doi: 10.1038/nbt945.
- [459] A.W. Nguyen, P.S. Daugherty. Evolutionary optimization of fluorescent proteins for intracellular FRET. *Nat Biotechnol* 23 (2005) 355–360. doi: 10.1038/nbt1066.
- [460] M.L. Markwardt, G.-J. Kremers, C.A. Kraft, K. Ray, P.J.C. Cranfill, K.A. Wilson, R.N. Day, R.M. Wachter, M.W. Davidson, M.A. Rizzo. An improved cerulean fluorescent protein with enhanced brightness and reduced reversible photoswitching. *PLoS One* 6 (2011) e17896. doi: 10.1371/journal.pone.0017896.
- [461] J. Goedhart, D. von Stetten, M. Noirclerc-Savoye, M. Lelimousin, L. Joosen, M.A. Hink, L. van Weeren, T.W.J. Gadella, A. Royant. Structure-guided evolution of cyan fluorescent proteins towards a quantum yield of 93%. *Nature Commun* 3 (2012) 751. doi: 10.1038/ncomms1738.
- [462] M. Erard, A. Fredj, H. Pasquier, D.-B. Beltolngar, Y. Bousmah, V. Derrien, P. Vincent, F. Merola. Minimum set of mutations needed to optimize cyan fluorescent proteins for live cell imaging. *Mol. BioSyst.* 9 (2013) 258–267. doi: 10.1039/C2MB25303H.
- [463] R.M. Wachter, M.A. Elsliger, K. Kallio, G.T. Hanson, S.J. Remington. Structural basis of spectral shifts in the yellow-emission variants of green fluorescent protein. *Structure* 6 (1998) 1267–1277. doi: 10.1016/s0969-2126(98)00127-0.

- [464] O. Griesbeck, G.S. Baird, R.E. Campbell, D.A. Zacharias, R.Y. Tsien. Reducing the environmental sensitivity of yellow fluorescent protein. Mechanism and applications. *J Biol Chem* 276 (2001) 29188–29194. doi: 10.1074/jbc.M102815200.
- [465] M.D. Wiens, F. Hoffmann, Y. Chen, R.E. Campbell. Enhancing fluorescent protein photostability through robot-assisted photobleaching. *Integr Biol (Camb)* 10 (2018) 419–428. doi: 10.1039/c8ib00063h.
- [466] T. Nagai, K. Ibata, E.S. Park, M. Kubota, K. Mikoshiba, A. Miyawaki. A variant of yellow fluorescent protein with fast and efficient maturation for cell-biological applications. *Nat Biotechnol* 20 (2002) 87–90. doi: 10.1038/nbt0102-87.
- [467] M.V. Matz, A.F. Fradkov, Y.A. Labas, A.P. Savitsky, A.G. Zaraisky, M.L. Markelov, S.A. Lukyanov. Fluorescent proteins from nonbioluminescent Anthozoa species. *Nat Biotechnol* 17 (1999) 969–973. doi: 10.1038/13657.
- [468] G.S. Baird, D.A. Zacharias, R.Y. Tsien. Biochemistry, mutagenesis, and oligomerization of DsRed, a red fluorescent protein from coral. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97 (2000) 11984–11989. doi: 10.1073/pnas.97.22.11984.
- [469] L.A. Gross, G.S. Baird, R.C. Hoffman, K.K. Baldrige, R.Y. Tsien. The structure of the chromophore within DsRed, a red fluorescent protein from coral. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97 (2000) 11990–11995. doi: 10.1073/pnas.97.22.11990.
- [470] R.E. Campbell, O. Tour, A.E. Palmer, P.A. Steinbach, G.S. Baird, D.A. Zacharias, R.Y. Tsien. A monomeric red fluorescent protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99 (2002) 7877–7882. doi: 10.1073/pnas.082243699.
- [471] N.C. Shaner, R.E. Campbell, P.A. Steinbach, B.N.G. Giepmans, A.E. Palmer, R.Y. Tsien. Improved monomeric red, orange and yellow fluorescent proteins derived from *Discosoma* sp. red fluorescent protein. *Nat Biotechnol* 22 (2004) 1567–1572. doi: 10.1038/nbt1037.
- [472] N.C. Shaner, M.Z. Lin, M.R. McKeown, P.A. Steinbach, K.L. Hazelwood, M.W. Davidson, R.Y. Tsien. Improving the photostability of bright monomeric orange and red fluorescent proteins. *Nat Methods* 5 (2008) 545–551. doi: 10.1038/nmeth.1209.
- [473] Y. Shen, Y. Chen, J. Wu, N.C. Shaner, R.E. Campbell. Engineering of mCherry variants with long Stokes shift, red-shifted fluorescence, and low cytotoxicity. *PLoS One* 12 (2017) e0171257. doi: 10.1371/journal.pone.0171257.
- [474] M.Z. Lin, M.R. McKeown, H.-L. Ng, T.A. Aguilera, N.C. Shaner, R.E. Campbell, S.R. Adams, L.A. Gross, W. Ma, T. Alber, R.Y. Tsien. Autofluorescent proteins with excitation in the optical window for intravital imaging in mammals. *Chem Biol* 16 (2009) 1169–1179. doi: 10.1016/j.chembiol.2009.10.009.
- [475] L. Wang, W.C. Jackson, P.A. Steinbach, R.Y. Tsien. Evolution of new nonantibody proteins via iterative somatic hypermutation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101 (2004) 16745–16749. doi: 10.1073/pnas.0407752101.
- [476] M.D. Wiens, Y. Shen, X. Li, M.A. Salem, N. Smisdom, W. Zhang, A. Brown, R.E. Campbell. A tandem green-red heterodimeric fluorescent protein with high FRET efficiency. *Chembiochem* 17 (2016) 2361–2367. doi: 10.1002/cbic.201600492.
- [477] E.M. Merzlyak, J. Goedhart, D. Shcherbo, M.E. Bulina, A.S. Shcheglov, A.F. Fradkov, A. Gaintzeva, K.A. Lukyanov, S. Lukyanov, T.W.J. Gadella, D.M. Chudakov. Bright monomeric red fluorescent protein with an extended fluorescence lifetime. *Nat Methods* 4 (2007) 555–557. doi: 10.1038/nmeth1062.
- [478] J. Wiedenmann, A. Schenk, C. Röcker, A. Girod, K.-D. Spindler, G.U. Nienhaus. A far-red fluorescent protein with fast maturation and reduced oligomerization tendency from *Entacmaea quadricolor* (Anthozoa, Actinaria). *Proc Natl Acad Sci U S A* 99 (2002) 11646–11651. doi: 10.1073/pnas.182157199.
- [479] B.T. Bajar, E.S. Wang, A.J. Lam, B.B. Kim, C.L. Jacobs, E.S. Howe, M.W. Davidson, M.Z. Lin, J. Chu. Improving brightness and photostability of green and red fluorescent proteins for live cell imaging and FRET reporting. *Sci Rep* 6 (2016) 20889. doi: 10.1038/srep20889.

- [480] D. Shcherbo, C.S. Murphy, G.V. Ermakova, E.A. Solovieva, T.V. Chepurnykh, A.S. Shcheglov, V.V. Verkhusha, V.Z. Pletnev, K.L. Hazelwood, P.M. Roche, S. Lukyanov, A.G. Zarausky, M.W. Davidson, D.M. Chudakov. Far-red fluorescent tags for protein imaging in living tissues. *Biochem J* 418 (2009) 567–574. doi: 10.1042/BJ20081949.
- [481] J. Chu, R.D. Haynes, S.Y. Corbel, P. Li, E. González-González, J.S. Burg, N.J. Ataie, A.J. Lam, P.J. Cranfill, M.A. Baird, M.W. Davidson, H.-L. Ng, K.C. Garcia, C.H. Contag, K. Shen, H.M. Blau, M.Z. Lin. Non-invasive intravital imaging of cellular differentiation with a bright red-excitable fluorescent protein. *Nat Methods* 11 (2014) 572–578. doi: 10.1038/nmeth.2888.
- [482] Z. Li, Z. Zhang, L. Bi, Z. Cui, J. Deng, D. Wang, X.-E. Zhang. Mutagenesis of mNeptune Red-Shifts Emission Spectrum to 681–685 nm. *PLoS One* 11 (2016) e0148749. doi: 10.1371/journal.pone.0148749.
- [483] R. Ando, H. Hama, M. Yamamoto-Hino, H. Mizuno, A. Miyawaki. An optical marker based on the UV-induced green-to-red photoconversion of a fluorescent protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99 (2002) 12651–12656. doi: 10.1073/pnas.202320599.
- [484] H. Ren, B. Yang, C. Ma, Y.S. Hu, P.G. Wang, L. Wang. Cysteine sulfoxidation increases the photostability of red fluorescent proteins. *ACS Chem Biol* 11 (2016) 2679–2684. doi: 10.1021/acscchembio.6b00579.
- [485] S. Siedler, G. Schendzielorz, S. Binder, L. Eggeling, S. Bringer, M. Bott. SoxR as a single-cell biosensor for NADPH-consuming enzymes in *Escherichia coli*. *ACS Synth Biol* 3 (2014) 41–47. doi: 10.1021/sb400110j.
- [486] C.F. Amábile-Cuevas, B. Demple. Molecular characterization of the soxRS genes of *Escherichia coli*: two genes control a superoxide stress regulon. *Nucleic Acids Res* 19 (1991) 4479–4484. doi: 10.1093/nar/19.16.4479.
- [487] S. Watanabe, A. Kita, K. Kobayashi, K. Miki. Crystal structure of the [2Fe-2S] oxidative-stress sensor SoxR bound to DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105 (2008) 4121–4126. doi: 10.1073/pnas.0709188105.
- [488] P. Gaudu, B. Weiss. SoxR, a [2Fe-2S] transcription factor, is active only in its oxidized form. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93 (1996) 10094–10098. doi: 10.1073/pnas.93.19.10094.
- [489] J.L. Blanchard, W.-Y. Wholey, E.M. Conlon, P.J. Pomposiello. Rapid changes in gene expression dynamics in response to superoxide reveal SoxRS-dependent and independent transcriptional networks. *PLoS One* 2 (2007) e1186. doi: 10.1371/journal.pone.0001186.
- [490] A.R. Krapp, M.V. Humbert, N. Carrillo. The soxRS response of *Escherichia coli* can be induced in the absence of oxidative stress and oxygen by modulation of NADPH content. *Microbiology (Reading)* 157 (2011) 957–965. doi: 10.1099/mic.0.039461-0.
- [491] K. Kobayashi, S. Tagawa. Isolation of reductase for SoxR that governs an oxidative response regulon from *Escherichia coli*. *FEBS Lett* 451 (1999) 227–230. doi: 10.1016/s0014-5793(99)00565-7.
- [492] J.D. Knudsen, M. Carlquist, M. Gorwa-Grauslund. NADH-dependent biosensor in *Saccharomyces cerevisiae*: principle and validation at the single cell level. *AMB Express* 4 (2014) 81. doi: 10.1186/s13568-014-0081-4.
- [493] J.M. Ellis, M.J. Wolfgang. A genetically encoded metabolite sensor for malonyl-CoA. *Chem Biol* 19 (2012) 1333–1339. doi: 10.1016/j.chembiol.2012.08.018.
- [494] N. Mustafi, A. Grünberger, D. Kohlheyer, M. Bott, J. Frunzke. The development and application of a single-cell biosensor for the detection of l-methionine and branched-chain amino acids. *Metab Eng* 14 (2012) 449–457. doi: 10.1016/j.ymben.2012.02.002.
- [495] S. Binder, G. Schendzielorz, N. Stäbler, K. Krumbach, K. Hoffmann, M. Bott, L. Eggeling. A high-throughput approach to identify genomic variants of bacterial metabolite producers at the single-cell level. *Genome Biol* 13 (2012) R40. doi: 10.1186/gb-2012-13-5-r40.
- [496] S.-L. Choi, E. Rha, S.J. Lee, H. Kim, K. Kwon, Y.-S. Jeong, Y.H. Rhee, J.J. Song, H.-S. Kim, S.-G. Lee. Toward a generalized and high-throughput enzyme screening system based on artificial genetic circuits. *ACS Synth Biol* 3 (2014) 163–171. doi: 10.1021/sb400112u.

- [497] L. Eggeling, M. Bott, J. Marienhagen. Novel screening methods—biosensors. *Curr Opin Biotechnol* 35 (2015) 30–36. doi: 10.1016/j.copbio.2014.12.021.
- [498] R. Bizzarri, M. Serresi, S. Luin, F. Beltram. Green fluorescent protein based pH indicators for in vivo use: a review. *Anal Bioanal Chem* 393 (2009) 1107–1122. doi: 10.1007/s00216-008-2515-9.
- [499] G.T. Hanson, T.B. McAnaney, E.S. Park, M.E.P. Rendell, D.K. Yarbrough, S. Chu, L. Xi, S.G. Boxer, M.H. Montrose, S.J. Remington. Green fluorescent protein variants as ratiometric dual emission pH sensors. 1. Structural characterization and preliminary application. *Biochemistry* 41 (2002) 15477–15488. doi: 10.1021/bi026609p.
- [500] M.-A. Elsliger, R.M. Wachter, G.T. Hanson, K. Kallio, S.J. Remington. Structural and spectral response of green fluorescent protein variants to changes in pH. *Biochemistry* 38 (1999) 5296–5301. doi: 10.1021/bi9902182.
- [501] M. Kneen, J. Farinas, Y. Li, A.S. Verkman. Green fluorescent protein as a noninvasive intracellular pH indicator. *Biophys J* 74 (1998) 1591–1599. doi: 10.1016/S0006-3495(98)77870-1.
- [502] S. Sankaranarayanan, D. De Angelis, J.E. Rothman, T.A. Ryan. The use of pHluorins for optical measurements of presynaptic activity. *Biophys J* 79 (2000) 2199–2208. doi: 10.1016/S0006-3495(00)76468-X.
- [503] H. Ai, S.G. Olenych, P. Wong, M.W. Davidson, R.E. Campbell. Hue-shifted monomeric variants of *Clavularia cyan* fluorescent protein: identification of the molecular determinants of color and applications in fluorescence imaging. *BMC Biol* 6 (2008) 13. doi: 10.1186/1741-7007-6-13.
- [504] G. Miesenböck, D.A. De Angelis, J.E. Rothman. Visualizing secretion and synaptic transmission with pH-sensitive green fluorescent proteins. *Nature* 394 (1998) 192–195. doi: 10.1038/28190.
- [505] M.J. Mahon. pHluorin2: an enhanced, ratiometric, pH-sensitive green fluorescent protein. *Adv Biosci Biotechnol* 2 (2011) 132–137. doi: 10.4236/abb.2011.23021.
- [506] J. Llopis, J.M. McCaffery, A. Miyawaki, M.G. Farquhar, R.Y. Tsien. Measurement of cytosolic, mitochondrial, and Golgi pH in single living cells with green fluorescent proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95 (1998) 6803–6808. doi: 10.1073/pnas.95.12.6803.
- [507] R. Bizzarri, C. Arcangeli, D. Arosio, F. Ricci, P. Faraci, F. Cardarelli, F. Beltram. Development of a novel GFP-based ratiometric excitation and emission pH indicator for intracellular studies. *Biophys J* 90 (2006) 3300–3314. doi: 10.1529/biophysj.105.074708.
- [508] R. Bizzarri, R. Nifosi, S. Abbruzzetti, W. Rocchia, S. Guidi, D. Arosio, G. Garau, B. Campanini, E. Grandi, F. Ricci, C. Viappiani, F. Beltram. Green fluorescent protein ground states: the influence of a second protonation site near the chromophore. *Biochemistry* 46 (2007) 5494–5504. doi: 10.1021/bi602646r.
- [509] Y. Shen, M. Rosendale, R.E. Campbell, D. Perrais. pHuji, a pH-sensitive red fluorescent protein for imaging of exo- and endocytosis. *J Cell Biol* 207 (2014) 419–432. doi: 10.1083/jcb.201404107.
- [510] M. Tantama, Y.P. Hung, G. Yellen. Imaging intracellular pH in live cells with a genetically encoded red fluorescent protein sensor. *J Am Chem Soc* 133 (2011) 10034–10037. doi: 10.1021/ja202902d.
- [511] S. Jayaraman, P. Haggie, R.M. Wachter, S.J. Remington, A.S. Verkman. Mechanism and cellular applications of a green fluorescent protein-based halide sensor. *J Biol Chem* 275 (2000) 6047–6050. doi: 10.1074/jbc.275.9.6047.
- [512] R.M. Wachter, D. Yarbrough, K. Kallio, S.J. Remington. Crystallographic and energetic analysis of binding of selected anions to the yellow variants of green fluorescent protein. *J Mol Biol* 301 (2000) 157–171. doi: 10.1006/jmbi.2000.3905.
- [513] L.J. Galletta, P.M. Haggie, A.S. Verkman. Green fluorescent protein-based halide indicators with improved chloride and iodide affinities. *FEBS Lett* 499 (2001) 220–224. doi: 10.1016/s0014-5793(01)02561-3.

- [514] S. Zhong, D. Navaratnam, J. Santos-Sacchi. A genetically-encoded YFP sensor with enhanced chloride sensitivity, photostability and reduced pH interference demonstrates augmented transmembrane chloride movement by gerbil prestin (SLC26a5). *PLoS One* 9 (2014) e99095. doi: 10.1371/journal.pone.0099095.
- [515] D. Arosio, F. Ricci, L. Marchetti, R. Gualdani, L. Albertazzi, F. Beltram. Simultaneous intracellular chloride and pH measurements using a GFP-based sensor. *Nat Methods* 7 (2010) 516–518. doi: 10.1038/nmeth.1471.
- [516] T.M. Watanabe, K. Imada, K. Yoshizawa, M. Nishiyama, C. Kato, F. Abe, T.J. Morikawa, M. Kinoshita, H. Fujita, T. Yanagida. Glycine insertion makes yellow fluorescent protein sensitive to hydrostatic pressure. *PLoS One* 8 (2013) e73212. doi: 10.1371/journal.pone.0073212.
- [517] H. Ostergaard, A. Henriksen, F.G. Hansen, J.R. Winther. Shedding light on disulfide bond formation: engineering a redox switch in green fluorescent protein. *EMBO J* 20 (2001) 5853–5862. doi: 10.1093/emboj/20.21.5853.
- [518] T. Balla, P. Várnai. Visualization of cellular phosphoinositide pools with GFP-fused protein-domains. *Curr Protoc Cell Biol Chapter* 24 (2009) Unit 24.4. doi: 10.1002/0471143030.cb2404s42.
- [519] T. Yeung, G.E. Gilbert, J. Shi, J. Silvius, A. Kapus, S. Grinstein. Membrane phosphatidylserine regulates surface charge and protein localization. *Science* 319 (2008) 210–213. doi: 10.1126/science.1152066.
- [520] O. Dyachok, Y. Isakov, J. Sâgetorp, A. Tengholm. Oscillations of cyclic AMP in hormone-stimulated insulin-secreting beta-cells. *Nature* 439 (2006) 349–352. doi: 10.1038/nature04410.
- [521] R. Irannejad, J.C. Tomshine, J.R. Tomshine, M. Chevalier, J.P. Mahoney, J. Steyaert, S.G.F. Rasmussen, R.K. Sunahara, H. El-Samad, B. Huang, M. von Zastrow. Conformational biosensors reveal GPCR signalling from endosomes. *Nature* 495 (2013) 534–538. doi: 10.1038/nature12000.
- [522] E. Eroglu, B. Gottschalk, S. Charoensin, S. Blass, H. Bischof, R. Rost, C.T. Madreiter-Sokolowski, B. Pelzmann, E. Bernhart, W. Sattler, S. Hallström, T. Malinski, M. Waldeck-Weiermair, W.F. Graier, R. Malli. Development of novel FP-based probes for live-cell imaging of nitric oxide dynamics. *Nat Commun* 7 (2016) 10623. doi: 10.1038/ncomms10623.
- [523] M. Gutscher, A.-L. Pauleau, L. Marty, T. Brach, G.H. Wabnitz, Y. Samstag, A.J. Meyer, T.P. Dick. Real-time imaging of the intracellular glutathione redox potential. *Nat Methods* 5 (2008) 553–559. doi: 10.1038/nmeth.1212.
- [524] M. Gutscher, M.C. Sobotta, G.H. Wabnitz, S. Ballikaya, A.J. Meyer, Y. Samstag, T.P. Dick. Proximity-based protein thiol oxidation by H₂O₂-scavenging peroxidases. *J Biol Chem* 284 (2009) 31532–31540. doi: 10.1074/jbc.M109.059246.
- [525] A. Bhaskar, M. Chawla, M. Mehta, P. Parikh, P. Chandra, D. Bhave, D. Kumar, K.S. Carroll, A. Singh. Reengineering redox sensitive GFP to measure mycothiol redox potential of *Mycobacterium tuberculosis* during infection. *PLoS Pathog* 10 (2014) e1003902. doi: 10.1371/journal.ppat.1003902.
- [526] Y. Fan, M. Makar, M.X. Wang, H.-W. Ai. Monitoring thioredoxin redox with a genetically encoded red fluorescent biosensor. *Nat Chem Biol* 13 (2017) 1045–1052. doi: 10.1038/nchembio.2417.
- [527] D.P. Goldenberg, T.E. Creighton. Circular and circularly permuted forms of bovine pancreatic trypsin inhibitor. *J Mol Biol* 165 (1983) 407–413. doi: 10.1016/s0022-2836(83)80265-4.
- [528] K. Luger, U. Hommel, M. Herold, J. Hofsteenge, K. Kirschner. Correct folding of circularly permuted variants of a beta alpha barrel enzyme in vivo. *Science* 243 (1989) 206–210. doi: 10.1126/science.2643160.

- [529] A.R. Viguera, L. Serrano, M. Wilmanns. Different folding transition states may result in the same native structure. *Nat Struct Biol* 3 (1996) 874–880. doi: 10.1038/nsb1096-874.
- [530] J. Hennecke, P. Sebbel, R. Glockshuber. Random circular permutation of DsbA reveals segments that are essential for protein folding and stability. *J Mol Biol* 286 (1999) 1197–1215. doi: 10.1006/jmbi.1998.2531.
- [531] G.S. Baird, D.A. Zacharias, R.Y. Tsien. Circular permutation and receptor insertion within green fluorescent proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96 (1999) 11241–11246. doi: 10.1073/pnas.96.20.11241.
- [532] S. Topell, J. Hennecke, R. Glockshuber. Circularly permuted variants of the green fluorescent protein. *FEBS Lett* 457 (1999) 283–289. doi: 10.1016/s0014-5793(99)01044-3.
- [533] T. Nagai, A. Sawano, E.S. Park, A. Miyawaki. Circularly permuted green fluorescent proteins engineered to sense Ca²⁺. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98 (2001) 3197–3202. doi: 10.1073/pnas.051636098.
- [534] J. Nakai, M. Ohkura, K. Imoto. A high signal-to-noise Ca(2+) probe composed of a single green fluorescent protein. *Nat Biotechnol* 19 (2001) 137–141. doi: 10.1038/84397.
- [535] A. Miyawaki, J. Llopis, R. Heim, J.M. McCaffery, J.A. Adams, M. Ikura, R.Y. Tsien. Fluorescent indicators for Ca²⁺ based on green fluorescent proteins and calmodulin. *Nature* 388 (1997) 882–887. doi: 10.1038/42264.
- [536] H. Takanaga, B. Chaudhuri, W.B. Frommer. GLUT1 and GLUT9 as major contributors to glucose influx in HepG2 cells identified by a high sensitivity intramolecular FRET glucose sensor. *Biochim Biophys Acta* 1778 (2008) 1091–1099. doi: 10.1016/j.bbamem.2007.11.015.
- [537] A. San Martín, S. Ceballo, I. Ruminot, R. Lerchundi, W.B. Frommer, L.F. Barros. A genetically encoded FRET lactate sensor and its use to detect the Warburg effect in single cancer cells. *PLoS One* 8 (2013) e57712. doi: 10.1371/journal.pone.0057712.
- [538] A. San Martín, S. Ceballo, F. Baeza-Lehnert, R. Lerchundi, R. Valdebenito, Y. Contreras-Baeza, K. Alegría, L.F. Barros. Imaging mitochondrial flux in single cells with a FRET sensor for pyruvate. *PLoS One* 9 (2014) e85780. doi: 10.1371/journal.pone.0085780.
- [539] P.V. Lidsky, K.A. Lukyanov, T. Misra, B. Handke, A.S. Mishin, C.F. Lehner. A genetically encoded fluorescent probe for imaging of oxygenation gradients in living *Drosophila*. *Development* 145 (2018). doi: 10.1242/dev.156257.
- [540] M.B. Elowitz, M.G. Surette, P.E. Wolf, J. Stock, S. Leibler. Photoactivation turns green fluorescent protein red. *Curr Biol* 7 (1997) 809–812. doi: 10.1016/s0960-9822(06)00342-3.
- [541] E. Takahashi, M. Sato. Imaging of oxygen gradients in monolayer cultured cells using green fluorescent protein. *Am J Physiol Cell Physiol* 299 (2010) C1318-1323. doi: 10.1152/ajpcell.00254.2010.
- [542] E. Takahashi, T. Takano, Y. Nomura, S. Okano, O. Nakajima, M. Sato. In vivo oxygen imaging using green fluorescent protein. *Am J Physiol Cell Physiol* 291 (2006) C781-787. doi: 10.1152/ajpcell.00067.2006.
- [543] V.L. Dengler, M. Galbraith, J.M. Espinosa. Transcriptional regulation by hypoxia inducible factors. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 49 (2014) 1–15. doi: 10.3109/10409238.2013.838205.
- [544] M.C. Brahimi-Horn. J. Pouyssegur, HIF at a glance. *J Cell Sci* 122 (2009) 1055–1057. doi: 10.1242/jcs.035022.
- [545] P. Danhier, B. Krishnamachary, S. Bharti, S. Kakkad, Y. Mironchik, Z.M. Bhujwala. Combining optical reporter proteins with different half-lives to detect temporal evolution of hypoxia and reoxygenation in tumors. *Neoplasia* 17 (2015) 871–881. doi: 10.1016/j.neo.2015.11.007.
- [546] R. Erapaneedi, V.V. Belousov, M. Schäfers, F. Kiefer. A novel family of fluorescent hypoxia sensors reveal strong heterogeneity in tumor hypoxia at the cellular level. *EMBO J* 35 (2016) 102–113. doi: 10.15252/embj.201592775.
- [547] W. Wang, H. Fang, L. Groom, A. Cheng, W. Zhang, J. Liu, X. Wang, K. Li, P. Han, M. Zheng, J. Yin, W. Wang, M.P. Mattson, J.P.Y. Kao, E.G. Lakatta, S.-S. Sheu, K. Ouyang, J.

- Chen, R.T. Dirksen, H. Cheng. Superoxide flashes in single mitochondria. *Cell* 134 (2008) 279–290. doi: 10.1016/j.cell.2008.06.017.
- [548] E.-Z. Shen, C.-Q. Song, Y. Lin, W.-H. Zhang, P.-F. Su, W.-Y. Liu, P. Zhang, J. Xu, N. Lin, C. Zhan, X. Wang, Y. Shyr, H. Cheng, M.-Q. Dong. Mitoflash frequency in early adulthood predicts lifespan in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 508 (2014) 128–132. doi: 10.1038/nature13012.
- [549] M. Schwarzländer, D.C. Logan, M.D. Fricker, L.J. Sweetlove. The circularly permuted yellow fluorescent protein cpYFP that has been used as a superoxide probe is highly responsive to pH but not superoxide in mitochondria: implications for the existence of superoxide “flashes”. *Biochem J* 437 (2011) 381–387. doi: 10.1042/BJ20110883.
- [550] E. Quatresous, C. Legrand, S. Pouvreau. Mitochondria-targeted cpYFP: pH or superoxide sensor? *J Gen Physiol* 140 (2012) 567–570. doi: 10.1085/jgp.201210863.
- [551] G. Azarias, J.-Y. Chatton. Selective ion changes during spontaneous mitochondrial transients in intact astrocytes. *PLoS One* 6 (2011) e28505. doi: 10.1371/journal.pone.0028505.
- [552] J. Santo-Domingo, M. Giacomello, D. Poburko, L. Scorrano, N. Demaurex. OPA1 promotes pH flashes that spread between contiguous mitochondria without matrix protein exchange. *EMBO J* 32 (2013) 1927–1940. doi: 10.1038/emboj.2013.124.
- [553] M. Schwarzländer, S. Wagner, Y.G. Ermakova, V.V. Belousov, R. Radi, J.S. Beckman, G.R. Buettner, N. Demaurex, M.R. Duchen, H.J. Forman, M.D. Fricker, D. Gems, A.P. Halestrap, B. Halliwell, U. Jakob, I.G. Johnston, N.S. Jones, D.C. Logan, B. Morgan, F.L. Müller, D.G. Nicholls, S.J. Remington, P.T. Schumacker, C.C. Winterbourn, L.J. Sweetlove, A.J. Meyer, T.P. Dick, M.P. Murphy. The “mitoflash” probe cpYFP does not respond to superoxide. *Nature* 514 (2014) E12–14. doi: 10.1038/nature13858.
- [554] H. Cheng, W. Wang, X. Wang, S.-S. Sheu, R.T. Dirksen, M.-Q. Dong. Cheng et al. reply. *Nature* 514 (2014) E14–15. doi: 10.1038/nature13859.
- [555] V.V. Belousov, A.F. Fradkov, K.A. Lukyanov, D.B. Staroverov, K.S. Shakhbazov, A.V. Terskikh, S. Lukyanov. Genetically encoded fluorescent indicator for intracellular hydrogen peroxide. *Nat Methods* 3 (2006) 281–286. doi: 10.1038/nmeth866.
- [556] C. Lee, S.M. Lee, P. Mukhopadhyay, S.J. Kim, S.C. Lee, W.-S. Ahn, M.-H. Yu, G. Storz, S.E. Ryu. Redox regulation of OxyR requires specific disulfide bond formation involving a rapid kinetic reaction path. *Nat Struct Mol Biol* 11 (2004) 1179–1185. doi: 10.1038/nsmb856.
- [557] M. Zheng, F. Aslund, G. Storz. Activation of the OxyR transcription factor by reversible disulfide bond formation. *Science* 279 (1998) 1718–1721. doi: 10.1126/science.279.5357.1718.
- [558] F. Aslund, M. Zheng, J. Beckwith, G. Storz. Regulation of the OxyR transcription factor by hydrogen peroxide and the cellular thiol-disulfide status. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96 (1999) 6161–6165. doi: 10.1073/pnas.96.11.6161.
- [559] B.K. Huang, H.D. Sikes. Quantifying intracellular hydrogen peroxide perturbations in terms of concentration. *Redox Biol* 2 (2014) 955–962. doi: 10.1016/j.redox.2014.08.001.
- [560] K.N. Markvicheva, D.S. Bilan, N.M. Mishina, A.Y. Gorokhovatsky, L.M. Vinokurov, S. Lukyanov, V.V. Belousov. A genetically encoded sensor for H₂O₂ with expanded dynamic range. *Bioorg Med Chem* 19 (2011) 1079–1084. doi: 10.1016/j.bmc.2010.07.014.
- [561] D.S. Bilan, L. Pase, L. Joosen, A.Y. Gorokhovatsky, Y.G. Ermakova, T.W.J. Gadella, C. Grabher, C. Schultz, S. Lukyanov, V.V. Belousov. HyPer-3: a genetically encoded H₂O₂ probe with improved performance for ratiometric and fluorescence lifetime imaging. *ACS Chem Biol* 8 (2013) 535–542. doi: 10.1021/cb300625g.
- [562] V.V. Pak, D. Ezerina, O.G. Lyublinskaya, B. Pedre, P.A. Tyurin-Kuzmin, N.M. Mishina, M. Thauvin, D. Young, K. Wahni, S.A.M. Gache, A.D. Demidovich, Y.G. Ermakova, Y.D. Maslova, A.G. Shokhina, E. Eroglu, D.S. Bilan, I. Bogeski, T. Michel, S. Vriza, J. Messens, V.V. Belousov. Ultrasensitive genetically encoded indicator for hydrogen peroxide

- identifies roles for the oxidant in cell migration and mitochondrial function. *Cell Metab* 31 (2020) 642–653.e6. doi: 10.1016/j.cmet.2020.02.003.
- [563] Y.G. Ermakova, D.S. Bilan, M.E. Matlashov, N.M. Mishina, K.N. Markvicheva, O.M. Subach, F.V. Subach, I. Bogeski, M. Hoth, G. Enikolopov, V.V. Belousov. Red fluorescent genetically encoded indicator for intracellular hydrogen peroxide. *Nat Commun* 5 (2014) 5222. doi: 10.1038/ncomms6222.
- [564] D. Poburko, J. Santo-Domingo, N. Demaurex. Dynamic regulation of the mitochondrial proton gradient during cytosolic calcium elevations. *J Biol Chem* 286 (2011) 11672–11684. doi: 10.1074/jbc.M110.159962.
- [565] M.E. Matlashov, Y.A. Bogdanova, G.V. Ermakova, N.M. Mishina, Y.G. Ermakova, E.S. Nikitin, P.M. Balaban, S. Okabe, S. Lukyanov, G. Enikolopov, A.G. Zaraisky, V.V. Belousov. Fluorescent ratiometric pH indicator SypHer2: Applications in neuroscience and regenerative biology. *Biochim Biophys Acta* 1850 (2015) 2318–2328. doi: 10.1016/j.bbagen.2015.08.002.
- [566] Y.G. Ermakova, V.V. Pak, Y.A. Bogdanova, A.A. Kotlobay, I.V. Yampolsky, A.G. Shokhina, A.S. Panova, R.A. Marygin, D.B. Staroverov, D.S. Bilan, H. Sies, V.V. Belousov. SypHer3s: a genetically encoded fluorescent ratiometric probe with enhanced brightness and an improved dynamic range. *Chem Commun (Camb)* 54 (2018) 2898–2901. doi: 10.1039/c7cc08740c.
- [567] Y. Zhao, S. Araki, J. Wu, T. Teramoto, Y.-F. Chang, M. Nakano, A.S. Abdelfattah, M. Fujiwara, T. Ishihara, T. Nagai, R.E. Campbell. An expanded palette of genetically encoded Ca²⁺ indicators. *Science* 333 (2011) 1888–1891. doi: 10.1126/science.1208592.
- [568] M. Malinouski, Y. Zhou, V.V. Belousov, D.L. Hatfield, V.N. Gladyshev. Hydrogen peroxide probes directed to different cellular compartments. *PLoS One* 6 (2011) e14564. doi: 10.1371/journal.pone.0014564.
- [569] I. Mehmeti, S. Lortz, S. Lenzen. The H₂O₂-sensitive HyPer protein targeted to the endoplasmic reticulum as a mirror of the oxidizing thiol-disulfide milieu. *Free Radic Biol Med* 53 (2012) 1451–1458. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2012.08.010.
- [570] E.P. Melo, C. Lopes, P. Gollwitzer, S. Lortz, S. Lenzen, I. Mehmeti, C.F. Kaminski, D. Ron, E. Avezov. TriPer, an optical probe tuned to the endoplasmic reticulum tracks changes in luminal H₂O₂. *BMC Biology* 15 (2017) 24. doi: 10.1186/s12915-017-0367-5.
- [571] O.M. Subach, T.A. Kunitsyna, O.A. Mineyeva, A.A. Lazutkin, D.V. Bezryadnov, N.V. Barykina, K.D. Piatkevich, Y.G. Ermakova, D.S. Bilan, V.V. Belousov, K.V. Anokhin, G.N. Enikolopov, F.V. Subach. Slowly reducible genetically encoded green fluorescent indicator for in vivo and ex vivo visualization of hydrogen peroxide. *Int J Mol Sci* 20 (2019). doi: 10.3390/ijms20133138.
- [572] M.B. Toledano, A. Delaunay, L. Monceau, F. Tacnet. Microbial H₂O₂ sensors as archetypical redox signaling modules. *Trends Biochem Sci* 29 (2004) 351–357. doi: 10.1016/j.tibs.2004.05.005.
- [573] B. Morgan, K. Van Laer, T.N.E. Owusu, D. Ezeriņa, D. Pastor-Flores, P.S. Amponsah, A. Tursch, T.P. Dick. Real-time monitoring of basal H₂O₂ levels with peroxiredoxin-based probes. *Nat Chem Biol* 12 (2016) 437–443. doi: 10.1038/nchembio.2067.
- [574] P. Kritsiligkou, T.K. Shen, T.P. Dick. A comparison of Prx- and OxyR-based H₂O₂ probes expressed in *S. cerevisiae*. *J Biol Chem* 297 (2021) 100866. doi: 10.1016/j.jbc.2021.100866.
- [575] L. de Cubas, V.V. Pak, V.V. Belousov, J. Ayté, E. Hidalgo. The mitochondria-to-cytosol H₂O₂ gradient is caused by peroxiredoxin-dependent cytosolic scavenging. *Antioxidants (Basel)* 10 (2021). doi: 10.3390/antiox10050731.
- [576] T.F. Langford, B.K. Huang, J.B. Lim, S.J. Moon, H.D. Sikes. Monitoring the action of redox-directed cancer therapeutics using a human peroxiredoxin-2-based probe. *Nat Commun* 9 (2018) 3145. doi: 10.1038/s41467-018-05557-y.

- [577] B. Enyedi, M. Zana, Á. Donkó, M. Geiszt. Spatial and temporal analysis of NADPH oxidase-generated hydrogen peroxide signals by novel fluorescent reporter proteins. *Antioxid Redox Signal* 19 (2013) 523–534. doi: 10.1089/ars.2012.4594.
- [578] B.S. Zhao, Y. Liang, Y. Song, C. Zheng, Z. Hao, P.R. Chen. A highly selective fluorescent probe for visualization of organic hydroperoxides in living cells. *J Am Chem Soc* 132 (2010) 17065–17067. doi: 10.1021/ja1071114.
- [579] M. Fuangthong, S. Atichartpongkul, S. Mongkolsuk, J.D. Helmann. OhrR is a repressor of *ohrA*, a key organic hydroperoxide resistance determinant in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* 183 (2001) 4134–4141. doi: 10.1128/JB.183.14.4134-4141.2001.
- [580] K.J. Newberry, M. Fuangthong, W. Panmanee, S. Mongkolsuk, R.G. Brennan. Structural mechanism of organic hydroperoxide induction of the transcription regulator OhrR. *Mol Cell* 28 (2007) 652–664. doi: 10.1016/j.molcel.2007.09.016.
- [581] L.L. Pearce, R.E. Gandle, W. Han, K. Wasserloos, M. Stitt, A.J. Kanai, M.K. McLaughlin, B.R. Pitt, E.S. Levitan. Role of metallothionein in nitric oxide signaling as revealed by a green fluorescent fusion protein. *Proc Nat Acad Sci U S A* 97 (2000) 477–482. doi: 10.1073/pnas.97.1.477.
- [582] M.S. Samuel, S. Datta, R.S. Khandge, E. Selvarajan. A state of the art review on characterization of heavy metal binding metallothioneins proteins and their widespread applications. *Sci Total Environment* 775 (2021) 145829. doi: 10.1016/j.scitotenv.2021.145829.
- [583] A. Krężel, W. Maret. The bioinorganic chemistry of mammalian metallothioneins. *Chem Rev* 121 (2021) 14594–14648. doi: 10.1021/acs.chemrev.1c00371.
- [584] M.C. Kennedy, T. Gan, W.E. Antholine, D.H. Petering. Metallothionein reacts with Fe²⁺ and NO to form products with A g = 2.039 ESR signal. *Biochem Biophys Res Commun* 196 (1993) 632–635. doi: 10.1006/bbrc.1993.2296.
- [585] K.D. Kroncke, K. Fehsel, T. Schmidt, F.T. Zenke, I. Dasting, J.R. Wesener, H. Bettermann, K.D. Breunig, V. Kolbbachofen. Nitric oxide destroys zinc-sulfur clusters inducing zinc release from metallothionein and inhibition of the zinc finger-type yeast transcription activator LAC9. *Biochem Biophys Res Commun* 200 (1994) 1105–1110. doi: 10.1006/bbrc.1994.1564.
- [586] M. Bush, T. Ghosh, N. Tucker, X. Zhang, R. Dixon. Transcriptional regulation by the dedicated nitric oxide sensor, NorR: a route towards NO detoxification. *Biochem Soc Trans* 39 (2011) 289–293. doi: 10.1042/BST0390289.
- [587] E. Eroglu, S. Hallström, H. Bischof, M. Opelt, K. Schmidt, B. Mayer, M. Waldeck-Weiermair, W.F. Graier, R. Malli. Real-time visualization of distinct nitric oxide generation of nitric oxide synthase isoforms in single cells. *Nitric Oxide* 70 (2017) 59–67. doi: 10.1016/j.niox.2017.09.001.
- [588] L.M. Costantini, M. Baloban, M.L. Markwardt, M.A. Rizzo, F. Guo, V.V. Verkhusha, E.L. Snapp. A palette of fluorescent proteins optimized for diverse cellular environments. *Nat Commun* 6 (2015) 7670. doi: 10.1038/ncomms8670.
- [589] C. Montali, S. Abbruzzetti, A. Franzen, G. Casini, S. Bruno, P. Delcanale, S. Burgstaller, J. Ramadani-Muja, R. Malli, T. Gensch, C. Viappiani. Nitric oxide sensing by a blue fluorescent protein. *Antioxidants* 11 (2022). doi: 10.3390/antiox11112229.
- [590] Z. Chen, W. Ren, Q.E. Wright, H. Ai. Genetically encoded fluorescent probe for the selective detection of peroxynitrite. *J Am Chem Soc* 135 (2013) 14940–14943. doi: 10.1021/ja408011q.
- [591] Z. Chen, S. Zhang, X. Li, H.-W. Ai. A high-performance genetically encoded fluorescent biosensor for imaging physiological peroxynitrite. *Cell Chem Biol* 28 (2021) 1542–1553.e5. doi: 10.1016/j.chembiol.2021.01.013.
- [592] Y. Pang, M. Huang, Y. Fan, H.-W. Yeh, Y. Xiong, H.L. Ng, H. Ai. Development, characterization, and structural analysis of a genetically encoded red fluorescent

- peroxynitrite biosensor. *ACS Chem Biol* 18 (2023) 1388–1397. doi: 10.1021/acscchembio.3c00139.
- [593] K.M. Gebendorfer, A. Drazic, Y. Le, J. Gundlach, A. Bepperling, A. Kastenmüller, K.A. Ganzinger, N. Braun, T.M. Franzmann, J. Winter. Identification of a hypochlorite-specific transcription factor from *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 287 (2012) 6892–6903. doi: 10.1074/jbc.M111.287219.
- [594] G.J. Palm, B. Khanh Chi, P. Waack, K. Gronau, D. Becher, D. Albrecht, W. Hinrichs, R.J. Read, H. Antelmann. Structural insights into the redox-switch mechanism of the MarR/DUF24-type regulator HypR. *Nucleic Acids Res* 40 (2012) 4178–4192. doi: 10.1093/nar/gkr1316.
- [595] B.W. Parker, E.A. Schwessinger, U. Jakob, M.J. Gray. The RclR protein is a reactive chlorine-specific transcription factor in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 288 (2013) 32574–32584. doi: 10.1074/jbc.M113.503516.
- [596] M.J. Gray, W.-Y. Wholey, B.W. Parker, M. Kim, U. Jakob. NemR is a bleach-sensing transcription factor. *J Biol Chem* 288 (2013) 13789–13798. doi: 10.1074/jbc.M113.454421.
- [597] L. Tarrago, Z. Péterfi, B.C. Lee, T. Michel, V.N. Gladyshev. Monitoring methionine sulfoxide with stereospecific mechanism-based fluorescent sensors. *Nat Chem Biol* 11 (2015) 332–338. doi: 10.1038/nchembio.1787.
- [598] D.W. Choi, Y.J. Roh, S. Kim, H.M. Lee, M. Kim, D. Shin, J.H. Park, Y. Cho, H.H. Park, Y.S. Ok, D. Kang, J.-H. Kim, L. Tarrago, N.N. Danial, V.N. Gladyshev, P.-K. Min, B.C. Lee. Development of a novel fluorescent biosensor for dynamic monitoring of metabolic methionine redox status in cells and tissues. *Biosens and Bioelectron* 178 (2021) 113031. doi: 10.1016/j.bios.2021.113031.
- [599] N. Kuldyushev, R. Schönherr, I. Coburger, M. Ahmed, R.A. Hussein, E. Wiesel, A. Godbole, T. Pfirrmann, T. Hoshi, S.H. Heinemann. A GFP-based ratiometric sensor for cellular methionine oxidation. *Talanta* 243 (2022) 123332. doi: 10.1016/j.talanta.2022.123332.
- [600] S. Chen, Z. Chen, W. Ren, H. Ai. Reaction-based genetically encoded fluorescent hydrogen sulfide sensors. *J Am Chem Soc* 134 (2012) 9589–9592. doi: 10.1021/ja303261d.
- [601] Z. Chen, H. Ai. A highly responsive and selective fluorescent probe for imaging physiological hydrogen sulfide. *Biochemistry* 53 (2014) 5966–5974. doi: 10.1021/bi500830d.
- [602] S. Youssef, S. Zhang, H.-W. Ai. A genetically encoded, ratiometric fluorescent biosensor for hydrogen sulfide. *ACS Sens* 4 (2019) 1626–1632. doi: 10.1021/acssensors.9b00400.
- [603] T. Kuner, G.J. Augustine. A genetically encoded ratiometric indicator for chloride: capturing chloride transients in cultured hippocampal neurons. *Neuron* 27 (2000) 447–459. doi: 10.1016/s0896-6273(00)00056-8.
- [604] G.T. Hanson, R. Aggeler, D. Oglesbee, M. Cannon, R.A. Capaldi, R.Y. Tsien, S.J. Remington. Investigating mitochondrial redox potential with redox-sensitive green fluorescent protein indicators. *J Biol Chem* 279 (2004) 13044–13053. doi: 10.1074/jbc.M312846200.
- [605] C.T. Dooley, T.M. Dore, G.T. Hanson, W.C. Jackson, S.J. Remington, R.Y. Tsien. Imaging dynamic redox changes in mammalian cells with green fluorescent protein indicators. *J Biol Chem* 279 (2004) 22284–22293. doi: 10.1074/jbc.M312847200.
- [606] M. Schwarzländer, M.D. Fricker, C. Müller, L. Marty, T. Brach, J. Novak, L.J. Sweetlove, R. Hell, A.J. Meyer. Confocal imaging of glutathione redox potential in living plant cells. *J Microsc* 231 (2008) 299–316. doi: 10.1111/j.1365-2818.2008.02030.x.
- [607] A.J. Meyer, T. Brach, L. Marty, S. Kreye, N. Rouhier, J.-P. Jacquot, R. Hell. Redox-sensitive GFP in *Arabidopsis thaliana* is a quantitative biosensor for the redox potential of the cellular glutathione redox buffer. *Plant J* 52 (2007) 973–986. doi: 10.1111/j.1365-313X.2007.03280.x.

- [608] J.R. Lohman, S.J. Remington. Development of a family of redox-sensitive green fluorescent protein indicators for use in relatively oxidizing subcellular environments. *Biochemistry* 47 (2008) 8678–8688. doi: 10.1021/bi800498g.
- [609] I. Aller, N. Rouhier, A.J. Meyer. Development of roGFP2-derived redox probes for measurement of the glutathione redox potential in the cytosol of severely glutathione-deficient *rml1* seedlings. *Front Plant Sci* 4 (2013) 506. doi: 10.3389/fpls.2013.00506.
- [610] J. Birk, M. Meyer, I. Aller, H.G. Hansen, A. Odermatt, T.P. Dick, A.J. Meyer, C. Appenzeller-Herzog. Endoplasmic reticulum: reduced and oxidized glutathione revisited. *J Cell Sci* 126 (2013) 1604–1617. doi: 10.1242/jcs.117218.
- [611] B.C. Campbell, G.A. Petsko, C.F. Liu. Crystal structure of green fluorescent protein clover and design of clover-based redox sensors. *Structure* 26 (2018) 225–237.e3. doi: 10.1016/j.str.2017.12.006.
- [612] K. Sugiura, T. Nagai, M. Nakano, H. Ichinose, T. Nakabayashi, N. Ohta, T. Hisabori. Redox sensor proteins for highly sensitive direct imaging of intracellular redox state. *Biochem Biophys Res Commun* 457 (2015) 242–248. doi: 10.1016/j.bbrc.2014.12.095.
- [613] K. Sugiura, H. Tanaka, G. Kurisu, K. Wakabayashi, T. Hisabori. Multicolor redox sensor proteins can visualize redox changes in various compartments of the living cell. *Biochim Biophys Acta Gen Subj* 1863 (2019) 1098–1107. doi: 10.1016/j.bbagen.2019.01.016.
- [614] T. Lister, P.A. Wright, P.H. Chappell. Optical properties of human skin, *J Biomed Opt* 17 (2012) 090901. doi: 10.1117/1.JBO.17.9.090901.
- [615] K. Toh, K. Nishio, R. Nakagawa, S. Egoshi, M. Abo, A. Perron, S. Sato, N. Okumura, N. Koizumi, K. Dodo, M. Sodeoka, M. Uesugi. Chemoproteomic identification of blue-light-damaged proteins. *J Am Chem Soc* 144 (2022) 20171–20176. doi: 10.1021/jacs.2c07180.
- [616] Y. Fan, Z. Chen, H. Ai. Monitoring redox dynamics in living cells with a redox-sensitive red fluorescent protein. *Anal Chem* 87 (2015) 2802–2810. doi: 10.1021/ac5041988.
- [617] Y. Fan, H. Ai. Development of redox-sensitive red fluorescent proteins for imaging redox dynamics in cellular compartments. *Anal Bioanal Chem* 408 (2016) 2901–2911. doi: 10.1007/s00216-015-9280-3.
- [618] K. Sugiura, S. Mihara, N. Fu, T. Hisabori. Real-time monitoring of the in vivo redox state transition using the ratiometric redox state sensor protein FROG/B. *Proc Natl Acad Sci U S A* 117 (2020) 16019–16026. doi: 10.1073/pnas.1918919117.
- [619] A.J. Meyer, T.P. Dick. Fluorescent protein-based redox probes. *Antioxid Redox Signal* 13 (2010) 621–650. doi: 10.1089/ars.2009.2948.
- [620] H. Østergaard, C. Tachibana, J.R. Winther. Monitoring disulfide bond formation in the eukaryotic cytosol. *J Cell Biol* 166 (2004) 337–345. doi: 10.1083/jcb.200402120.
- [621] M.B. Cannon, S.J. Remington. Re-engineering redox-sensitive green fluorescent protein for improved response rate. *Protein Sci* 15 (2006) 45–57. doi: 10.1110/ps.051734306.
- [622] R.E. Hansen, H. Østergaard, J.R. Winther. Increasing the reactivity of an artificial dithiol–disulfide pair through modification of the electrostatic milieu. *Biochemistry* 44 (2005) 5899–5906. doi: 10.1021/bi0500372.
- [623] O. Björnberg, H. Østergaard, J.R. Winther. Mechanistic insight provided by glutaredoxin within a fusion to redox-sensitive yellow fluorescent protein. *Biochemistry* 45 (2006) 2362–2371. doi: 10.1021/bi0522495.
- [624] V.V. Loi, M. Harms, M. Müller, N.T.T. Huyen, C.J. Hamilton, F. Hochgräfe, J. Pané-Farré, H. Antelmann. Real-time imaging of the bacillithiol redox potential in the human pathogen *Staphylococcus aureus* using a genetically encoded bacilliredoxin-fused redox biosensor. *Antioxid Redox Signal* 26 (2017) 835–848. doi: 10.1089/ars.2016.6733.
- [625] S. Ebersoll, M. Bogacz, L.M. Günter, T.P. Dick, R.L. Krauth-Siegel. A tryparedoxin-coupled biosensor reveals a mitochondrial trypanothione metabolism in trypanosomes. *eLife* 9 (2020) e53227. doi: 10.7554/eLife.53227.
- [626] V.L. Kolossov, B.Q. Spring, R.M. Clegg, J.J. Henry, A. Sokolowski, P.J.A. Kenis, H.R. Gaskins. Development of a high-dynamic range, GFP-based FRET probe sensitive to

- oxidative microenvironments. *Exp Biol Med* (Maywood) 236 (2011) 681–691. doi: 10.1258/ebm.2011.011009.
- [627] T. Yano, M. Oku, N. Akeyama, A. Itoyama, H. Yurimoto, S. Kuge, Y. Fujiki, Y. Sakai. A novel fluorescent sensor protein for visualization of redox states in the cytoplasm and in peroxisomes. *Mol Cell Biol* 30 (2010) 3758–3766. doi: 10.1128/MCB.00121-10.
- [628] M. Ahmad, N.A. Anjum, A. Asif, A. Ahmad. Real-time monitoring of glutathione in living cells using genetically encoded FRET-based ratiometric nanosensor. *Scientific Reports* 10 (2020) 992. doi: 10.1038/s41598-020-57654-y.
- [629] X. Hu, H. Li, X. Zhang, Z. Chen, R. Zhao, N. Hou, J. Liu, L. Xun, H. Liu. Developing polysulfide-sensitive GFPs for real-time analysis of polysulfides in live cells and subcellular organelles. *Anal Chem* 91 (2019) 3893–3901. doi: 10.1021/acs.analchem.8b04634.
- [630] Z. Li, Q. Wang, Y. Xia, L. Xun, H. Liu. A red fluorescent protein-based probe for detection of intracellular reactive sulfane sulfur. *Antioxidants* 9 (2020). doi: 10.3390/antiox9100985.
- [631] Y. Pang, H. Zhang, H. Ai. Improved red fluorescent redox indicators for monitoring cytosolic and mitochondrial thioredoxin redox dynamics. *Biochemistry* 61 (2022) 377–384. doi: 10.1021/acs.biochem.1c00634.
- [632] K. Sugiura, Y. Yokochi, N. Fu, Y. Fukaya, K. Yoshida, S. Mihara, T. Hisabori. The thioredoxin (Trx) redox state sensor protein can visualize Trx activities in the light/dark response in chloroplasts. *J Biol Chem* 294 (2019) 12091–12098. doi: 10.1074/jbc.RA119.007616.
- [633] N. Wedel, J. Soll, B.K. Paap. CP12 provides a new mode of light regulation of Calvin cycle activity in higher plants. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94 (1997) 10479–10484. doi: 10.1073/pnas.94.19.10479.
- [634] L. Marri, M. Zaffagnini, V. Collin, E. Issakidis-Bourguet, S.D. Lemaire, P. Pupillo, F. Sparla, M. Miginiac-Maslow, P. Trost. Prompt and easy activation by specific thioredoxins of calvin cycle enzymes of *Arabidopsis thaliana* associated in the GAPDH/CP12/PRK supramolecular complex. *Mol Plant* 2 (2009) 259–269. doi: 10.1093/mp/ssn061.
- [635] E.E. Price, F. Román-Rodríguez, J.M. Boyd. Bacterial approaches to sensing and responding to respiration and respiration metabolites. *Mol Microbiol* 116 (2021) 1009–1021. doi: 10.1111/mmi.14795.
- [636] Y.P. Hung, J.G. Albeck, M. Tantama, G. Yellen. Imaging cytosolic NADH-NAD(+) redox state with a genetically encoded fluorescent biosensor. *Cell Metab* 14 (2011) 545–554. doi: 10.1016/j.cmet.2011.08.012.
- [637] Y. Zhao, J. Jin, Q. Hu, H.-M. Zhou, J. Yi, Z. Yu, L. Xu, X. Wang, Y. Yang, J. Loscalzo. Genetically encoded fluorescent sensors for intracellular NADH detection. *Cell Metab* 14 (2011) 555–566. doi: 10.1016/j.cmet.2011.09.004.
- [638] Y. Zhao, Y. Yang. Real-time and high-throughput analysis of mitochondrial metabolic states in living cells using genetically encoded NAD⁺/NADH sensors. *Free Radic Biol Med* 100 (2016) 43–52. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2016.05.027.
- [639] S. Wilkening, F.-J. Schmitt, M. Horch, I. Zebger, O. Lenz, T. Friedrich. Characterization of Frex as an NADH sensor for in vivo applications in the presence of NAD⁺ and at various pH values. *Photosynth Res* 133 (2017) 305–315. doi: 10.1007/s11120-017-0348-0.
- [640] D.S. Bilan, M.E. Matlashov, A.Y. Gorokhovatsky, C. Schultz, G. Enikolopov, V.V. Belousov. Genetically encoded fluorescent indicator for imaging NAD(+)/NADH ratio changes in different cellular compartments. *Biochim Biophys Acta* 1840 (2014) 951–957. doi: 10.1016/j.bbagen.2013.11.018.
- [641] Y. Zhao, Q. Hu, F. Cheng, N. Su, A. Wang, Y. Zou, H. Hu, X. Chen, H.-M. Zhou, X. Huang, K. Yang, Q. Zhu, X. Wang, J. Yi, L. Zhu, X. Qian, L. Chen, Y. Tang, J. Loscalzo, Y. Yang. SoNar, a highly responsive NAD⁺/NADH sensor, allows high-throughput metabolic screening of anti-tumor agents. *Cell Metab* 21 (2015) 777–789. doi: 10.1016/j.cmet.2015.04.009.

- [642] Y. Zou, A. Wang, L. Huang, X. Zhu, Q. Hu, Y. Zhang, X. Chen, F. Li, Q. Wang, H. Wang, R. Liu, F. Zuo, T. Li, J. Yao, Y. Qian, M. Shi, X. Yue, W. Chen, Z. Zhang, C. Wang, Y. Zhou, L. Zhu, Z. Ju, J. Loscalzo, Y. Yang, Y. Zhao. Illuminating NAD(+) metabolism in live cells and in vivo using a genetically encoded fluorescent sensor. *Dev Cell* 53 (2020) 240–252.e7. doi: 10.1016/j.devcel.2020.02.017.
- [643] X.A. Cambronne, M.L. Stewart, D. Kim, A.M. Jones-Brunette, R.K. Morgan, D.L. Farrens, M.S. Cohen, R.H. Goodman. Biosensor reveals multiple sources for mitochondrial NAD⁺. *Science* 352 (2016) 1474–1477. doi: 10.1126/science.aad5168.
- [644] F.-L. Zhao, C. Zhang, C. Zhang, Y. Tang, B.-C. Ye. A genetically encoded biosensor for in vitro and in vivo detection of NADP⁺. *Biosens Bioelectron* 77 (2016) 901–906. doi: 10.1016/j.bios.2015.10.063.
- [645] W.D. Cameron, C.V. Bui, A. Hutchinson, P. Loppnau, S. Gräslund, J.V. Rocheleau. Apollo-NADP(+): a spectrally tunable family of genetically encoded sensors for NADP(+). *Nat Methods* 13 (2016) 352–358. doi: 10.1038/nmeth.3764.
- [646] H.H. Chang, A.M. Bennett, W.D. Cameron, E. Floro, A. Au, C.M. McFaul, C.M. Yip, J.V. Rocheleau. Targeting apollo-NADP+ to image NADPH generation in pancreatic beta-cell organelles. *ACS Sens* 7 (2022) 3308–3317. doi: 10.1021/acssensors.2c01174.
- [647] R. Tao, Y. Zhao, H. Chu, A. Wang, J. Zhu, X. Chen, Y. Zou, M. Shi, R. Liu, N. Su, J. Du, H.-M. Zhou, L. Zhu, X. Qian, H. Liu, J. Loscalzo, Y. Yang. Genetically encoded fluorescent sensors reveal dynamic regulation of NADPH metabolism. *Nat Methods* 14 (2017) 720–728. doi: 10.1038/nmeth.4306.
- [648] P.E. Molinari, A.R. Krapp, A. Weiner, H.M. Beyer, A.K. Kondadi, T. Blomeier, M. López, P. Bustos-Sanmamed, E. Tevere, W. Weber, A.S. Reichert, N.B. Calcaterra, M. Beller, N. Carrillo, M.D. Zurbriggen. NERNST: a genetically-encoded ratiometric non-destructive sensing tool to estimate NADP(H) redox status in bacterial, plant and animal systems, *Nat Commun* 14 (2023) 3277. doi: 10.1038/s41467-023-38739-4.
- [649] M.P. Murphy, H. Bayir, V. Belousov, C.J. Chang, K.J.A. Davies, M.J. Davies, T.P. Dick, T. Finkel, H.J. Forman, Y. Janssen-Heininger, D. Gems, V.E. Kagan, B. Kalyanaraman, N.-G. Larsson, G.L. Milne, T. Nyström, H.E. Poulsen, R. Radi, H. Van Remmen, P.T. Schumacker, P.J. Thornalley, S. Toyokuni, C.C. Winterbourn, H. Yin, B. Halliwell. Guidelines for measuring reactive oxygen species and oxidative damage in cells and in vivo, *Nat Metab* 4 (2022) 651–662. doi: 10.1038/s42255-022-00591-z.
- [650] A. Gomes, E. Fernandes, J.L.F.C. Lima. Fluorescence probes used for detection of reactive oxygen species. *J Biochem Biophys Methods* 65 (2005) 45–80. doi: 10.1016/j.jbbm.2005.10.003.
- [651] M. Freitas, J.L.F.C. Lima, E. Fernandes. Optical probes for detection and quantification of neutrophils' oxidative burst. A review. *Anal Chim Acta* 649 (2009) 8–23. doi: 10.1016/j.aca.2009.06.063.
- [652] S.G. Rhee, T.-S. Chang, W. Jeong, D. Kang. Methods for detection and measurement of hydrogen peroxide inside and outside of cells. *Mol Cells* 29 (2010) 539–549. doi: 10.1007/s10059-010-0082-3.
- [653] K.C. Heimsch, C.G.W. Gertzen, A.K. Schuh, T. Nietzel, S. Rahlfs, J.M. Przyborski, H. Gohlke, M. Schwarzländer, K. Becker, K. Fritz-Wolf. Structure and function of redox-sensitive superfolder green fluorescent protein variant. *Antioxid Redox Signal* 37 (2022) 1–18. doi: 10.1089/ars.2021.0234.
- [654] A. Müller, J.F. Schneider, A. Degrossoli, N. Lupilova, T.P. Dick, L.I. Leichert. Systematic in vitro assessment of responses of roGFP2-based probes to physiologically relevant oxidant species. *Free Radic Biol Med* 106 (2017) 329–338. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2017.02.044.
- [655] A.G. Shokhina, A.I. Kostyuk, Y.G. Ermakova, A.S. Panova, D.B. Staroverov, E.S. Egorov, M.S. Baranov, G.J. van Belle, D.M. Katschinski, V.V. Belousov, D.S. Bilan. Red fluorescent

- redox-sensitive biosensor Grx1-roCherry. *Redox Biol* 21 (2019) 101071. doi: 10.1016/j.redox.2018.101071.
- [656] C.V. Piattoni, F. Sardi, F. Klein, S. Pantano, M. Bollati-Fogolin, M. Comini. New red-shifted fluorescent biosensor for monitoring intracellular redox changes. *Free Radic Biol Med* 134 (2019) 545–554. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2019.01.035.
- [657] Y. Yang, Y. Zhou, J. Li, H. Yu, N. Takaya, P. Wang, S. Zhou. Novel peroxiredoxin-based sensor for sensitive detection of hydrogen peroxide. *Biochem Biophys Res Commun* 517 (2019) 260–265. doi: 10.1016/j.bbrc.2019.07.062.
- [658] S. Li, B. Yang, T. Kobayashi, B. Yu, J. Liu, L. Wang. Genetically encoding thyronine for fluorescent detection of peroxynitrite. *Bioorg Med Chem* 28 (2020) 115665. doi: 10.1016/j.bmc.2020.115665.
- [659] R. Penjweini, M.P. Mori, P.M. Hwang, D.L. Sackett, J.R. Knutson. Fluorescence lifetime imaging of metMyoglobin formation due to nitric oxide stress. *Proc SPIE Int Soc Opt Eng* 11965 (2022) 119650H. doi: 10.1117/12.2608888.
- [660] R. Penjweini, B. Roarke, G. Alspaugh, K.A. Link, A. Andreoni, M.P. Mori, P.M. Hwang, D.L. Sackett, J.R. Knutson. Intracellular imaging of metmyoglobin and oxygen using new dual purpose probe EYFP-Myoglobin-mCherry. *J Biophotonics* 15 (2022) e202100166. doi: 10.1002/jbio.202100166.
- [661] A.I. Kostyuk, M.-A. Tossounian, A.S. Panova, M. Thauvin, R.I. Raevskii, D. Ezeriņa, K. Wahni, I. Van Molle, A.D. Sergeeva, D. Vertommen, A.Yu. Gorokhovatsky, M.S. Baranov, S. Vriza, J. Messens, D.S. Bilan, V.V. Belousov. Hypocrates is a genetically encoded fluorescent biosensor for (pseudo)hypohalous acids and their derivatives. *Nat Commun* 13 (2022) 171. doi: 10.1038/s41467-021-27796-2.
- [662] M. Schwarzländer, T.P. Dick, A.J. Meyer, B. Morgan. Dissecting redox biology using fluorescent protein sensors. *Antioxid Redox Signal* 24 (2016) 680–712. doi: 10.1089/ars.2015.6266.
- [663] A. Ayer, J. Sanwald, B.A. Pillay, A.J. Meyer, G.G. Perrone, I.W. Dawes. Distinct redox regulation in sub-cellular compartments in response to various stress conditions in *Saccharomyces cerevisiae*. *PLoS One* 8 (2013) e65240. doi: 10.1371/journal.pone.0065240.
- [664] G. Calabrese, E. Peker, P.S. Amponsah, M.N. Hoehne, T. Riemer, M. Mai, G.P. Bienert, M. Deponte, B. Morgan, J. Riemer. Hyperoxidation of mitochondrial peroxiredoxin limits H₂O₂-induced cell death in yeast. *EMBO J* 38 (2019) e101552. doi: 10.15252/embj.2019101552.
- [665] S.C. Albrecht, A.G. Barata, J. Grosshans, A.A. Teleman, T.P. Dick. In vivo mapping of hydrogen peroxide and oxidized glutathione reveals chemical and regional specificity of redox homeostasis. *Cell Metab* 14 (2011) 819–829. doi: 10.1016/j.cmet.2011.10.010.
- [666] C. Rogers, B. Davis, P.D. Neuffer, M.P. Murphy, E.J. Anderson, J. Robidoux. A transient increase in lipid peroxidation primes preadipocytes for delayed mitochondrial inner membrane permeabilization and ATP depletion during prolonged exposure to fatty acids. *Free Radic Biol Med* 67 (2014) 330–341. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2013.11.012.
- [667] J. Hu, L. Dong, C.E. Outten. The redox environment in the mitochondrial intermembrane space is maintained separately from the cytosol and matrix. *J Biol Chem* 283 (2008) 29126–29134. doi: 10.1074/jbc.M803028200.
- [668] K. Kojer, V. Peleh, G. Calabrese, J.M. Herrmann, J. Riemer. Kinetic control by limiting glutaredoxin amounts enables thiol oxidation in the reducing mitochondrial intermembrane space. *Mol Biol Cell* 26 (2015) 195–204. doi: 10.1091/mbc.E14-10-1422.
- [669] P.I. Merksamer, A. Trusina, F.R. Papa. Real-time redox measurements during endoplasmic reticulum stress reveal interlinked protein folding functions. *Cell* 135 (2008) 933–947. doi: 10.1016/j.cell.2008.10.011.
- [670] M. Delic, C. Rebnegger, F. Wanka, V. Puxbaum, C. Haberhauer-Troyer, S. Hann, G. Köllensperger, D. Mattanovich, B. Gasser. Oxidative protein folding and unfolded protein

- response elicit differing redox regulation in endoplasmic reticulum and cytosol of yeast. *Free Radic Biol Med* 52 (2012) 2000–2012. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2012.02.048.
- [671] A. Igbaria, P.I. Merksamer, A. Trusina, F. Tilahun, J.R. Johnson, O. Brandman, N.J. Krogan, J.S. Weissman, F.R. Papa. Chaperone-mediated reflux of secretory proteins to the cytosol during endoplasmic reticulum stress. *Proc Natl Acad Sci U S A* 116 (2019) 11291–11298. doi: 10.1073/pnas.1904516116.
- [672] R.-F. Wu, Z. Ma, Z. Liu, L.S. Terada. Nox4-derived H₂O₂ mediates endoplasmic reticulum signaling through local Ras activation. *Mol Cell Biol* 30 (2010) 3553–3568. doi: 10.1128/MCB.01445-09.
- [673] M. Dardalhon, C. Kumar, I. Iraqui, L. Vernis, G. Kienda, A. Banach-Latapy, T. He, R. Chanet, G. Faye, C.E. Outten, M.-E. Huang. Redox-sensitive YFP sensors monitor dynamic nuclear and cytosolic glutathione redox changes. *Free Radic Biol Med* 52 (2012) 2254–2265. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2012.04.004.
- [674] G. Hajas, A. Bacsı, L. Aguilera-Aguirre, M.L. Hegde, K.H. Tapas, S. Sur, Z. Radak, X. Ba, I. Boldogh. 8-Oxoguanine DNA glycosylase-1 links DNA repair to cellular signaling via the activation of the small GTPase Rac1. *Free Radic Biol Med* 61 (2013) 384–394. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2013.04.011.
- [675] W. Gehrman, M. Elsner. A specific fluorescence probe for hydrogen peroxide detection in peroxisomes. *Free Radic Res* 45 (2011) 501–506. doi: 10.3109/10715762.2011.560148.
- [676] Y. Han, S. Ishibashi, J. Iglesias-Gonzalez, Y. Chen, N.R. Love, E. Amaya. Ca²⁺-induced mitochondrial ROS regulate the early embryonic cell cycle. *Cell Rep* 22 (2018) 218–231. doi: 10.1016/j.celrep.2017.12.042.
- [677] C. Gauron, F. Meda, E. Dupont, S. Albadri, N. Quenech’Du, E. Ipendey, M. Volovitch, F. Del Bene, A. Joliot, C. Rampon, S. Vriz. Hydrogen peroxide (H₂O₂) controls axon pathfinding during zebrafish development. *Dev Biol* 414 (2016) 133–141. doi: 10.1016/j.ydbio.2016.05.004.
- [678] S. Yadav, B. Chawla, M.A. Khursheed, R. Ramachandran, A.K. Bachhawat. The glutathione degrading enzyme, Chac1, is required for calcium signaling in developing zebrafish: redox as an upstream activator of calcium. *Biochem J* 476 (2019) 1857–1873. doi: 10.1042/BCJ20190077.
- [679] D. Knoefler, M. Thamsen, M. Koniczek, N.J. Niemuth, A.-K. Diederich, U. Jakob. Quantitative in vivo redox sensors uncover oxidative stress as an early event in life. *Mol Cell* 47 (2012) 767–776. doi: 10.1016/j.molcel.2012.06.016.
- [680] P. Back, W.H. De Vos, G.G. Depuydt, F. Matthijssens, J.R. Vanfleteren, B.P. Braeckman. Exploring real-time in vivo redox biology of developing and aging *Caenorhabditis elegans*. *Free Radic Biol Med* 52 (2012) 850–859. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2011.11.037.
- [681] H.-C. Jiang, J.-M. Hsu, C.-P. Yen, C.-C. Chao, R.-H. Chen, C.-L. Pan. Neural activity and CaMKII protect mitochondria from fragmentation in aging *Caenorhabditis elegans* neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 112 (2015) 8768–8773. doi: 10.1073/pnas.1501831112.
- [682] P. Niethammer, C. Grabher, A.T. Look, T.J. Mitchison. A tissue-scale gradient of hydrogen peroxide mediates rapid wound detection in zebrafish. *Nature* 459 (2009) 996–999. doi: 10.1038/nature08119.
- [683] L. Pase, J.E. Layton, C. Wittmann, F. Ellett, C.J. Nowell, C.C. Reyes-Aldasoro, S. Varma, K.L. Rogers, C.J. Hall, M.C. Keightley, P.S. Crosier, C. Grabher, J.K. Heath, S.A. Renshaw, G.J. Lieschke. Neutrophil-delivered myeloperoxidase dampens the hydrogen peroxide burst after tissue wounding in zebrafish. *Curr Biol* 22 (2012) 1818–1824. doi: 10.1016/j.cub.2012.07.060.
- [684] Q. Deng, E.A. Harvie, A. Huttenlocher. Distinct signalling mechanisms mediate neutrophil attraction to bacterial infection and tissue injury. *Cell Microbiol* 14 (2012) 517–528. doi: 10.1111/j.1462-5822.2011.01738.x.
- [685] P. Han, X.-H. Zhou, N. Chang, C.-L. Xiao, S. Yan, H. Ren, X.-Z. Yang, M.-L. Zhang, Q. Wu, B. Tang, J.-P. Diao, X. Zhu, C. Zhang, C.-Y. Li, H. Cheng, J.-W. Xiong. Hydrogen

- peroxide primes heart regeneration with a derepression mechanism. *Cell Research* 24 (2014) 1091–1107. doi: 10.1038/cr.2014.108.
- [686] N.R. Love, Y. Chen, S. Ishibashi, P. Kritsiligkou, R. Lea, Y. Koh, J. L. Gallop, K. Dorey, E. Amaya. Amputation-induced reactive oxygen species are required for successful *Xenopus* tadpole tail regeneration. *Nat Cell Biol.* 15 (2013) 222–228. doi: 10.1038/ncb2659.
- [687] C.M. Díaz-García, R. Mongeon, C. Lahmann, D. Koveal, H. Zucker, G. Yellen. Neuronal stimulation triggers neuronal glycolysis and not lactate uptake. *Cell Metab* 26 (2017) 361–374.e4. doi: 10.1016/j.cmet.2017.06.021.
- [688] H.C. Wong, Q. Zhang, A.J. Beirl, R.S. Petralia, Y.-X. Wang, K. Kindt. Synaptic mitochondria regulate hair-cell synapse size and function. *eLife* 8 (2019) e48914. doi: 10.7554/eLife.48914.
- [689] K.C. O'Donnell, M.E. Vargas, A. Sagasti. WldS and PGC-1 α regulate mitochondrial transport and oxidation state after axonal injury. *J Neurosci* 33 (2013) 14778–14790. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1331-13.2013.
- [690] C. Seiler, G. Davuluri, J. Abrams, F.J. Byfield, P.A. Janmey, M. Pack. Smooth muscle tension induces invasive remodeling of the zebrafish intestine. *PLoS Biol* 10 (2012) e1001386. doi: 10.1371/journal.pbio.1001386.
- [691] C.A. Reissaus, A.R. Piñeros, A.N. Twigg, K.S. Orr, A.M. Conteh, M.M. Martinez, M.M. Kamocka, R.N. Day, S.A. Tersey, R.G. Mirmira, K.W. Dunn, A.K. Linnemann. A versatile, portable intravital microscopy platform for studying beta-cell biology in vivo. *Sci Rep* 9 (2019) 8449. doi: 10.1038/s41598-019-44777-0.
- [692] A.M. Wolf, K. Nishimaki, N. Kamimura, S. Ohta. Real-time monitoring of oxidative stress in live mouse skin. *J Invest Dermatol* 134 (2014) 1701–1709. doi: 10.1038/jid.2013.428.
- [693] T.-H. Liu, M.A. Yaghmour, M.-H. Lee, T.M. Gradziel, J.H.J. Leveau, R.M. Bostock. An roGFP2-based bacterial bioreporter for redox sensing of plant surfaces. *Phytopathology* 110 (2020) 297–308. doi: 10.1094/PHYTO-07-19-0237-R.
- [694] E. Andrio, D. Marino, A. Marmeys, M.D. de Segonzac, I. Damiani, A. Genre, S. Huguet, P. Frendo, A. Puppo, N. Pauly. Hydrogen peroxide-regulated genes in the *Medicago truncatula*-*Sinorhizobium meliloti* symbiosis. *New Phytol* 198 (2013) 179–189. doi: 10.1111/nph.12120.
- [695] X. Wang, C. Schwarzer, K. Hybiske, T.E. Machen, R.S. Stephens. Developmental stage oxidoreductive states of *Chlamydia* and infected host cells. *mBio* 5 (2014) e01924. doi: 10.1128/mBio.01924-14.
- [696] A. Nandy, A.K. Mondal, R. Pandey, P. Arumugam, S. Dawa, N. Jaisinghani, V. Rao, D. Dash, S. Gandotra. Adipocyte model of *Mycobacterium tuberculosis* infection reveals differential availability of iron to bacilli in the lipid-rich caseous environment. *Infect Immun* 86 (2018). doi: 10.1128/IAI.00041-18.
- [697] J. van der Heijden, E.S. Bosman, L.A. Reynolds, B.B. Finlay. Direct measurement of oxidative and nitrosative stress dynamics in *Salmonella* inside macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A* 112 (2015) 560–565. doi: 10.1073/pnas.1414569112.
- [698] K. Huang, J. Caplan, J.A. Sweigard, K.J. Czymmek, N.M. Donofrio. Optimization of the HyPer sensor for robust real-time detection of hydrogen peroxide in the rice blast fungus. *Mol Plant Pathol* 18 (2017) 298–307. doi: 10.1111/mpp.12392.
- [699] M. Mentges, J. Bormann. Real-time imaging of hydrogen peroxide dynamics in vegetative and pathogenic hyphae of *Fusarium graminearum*. *Sci Rep* 5 (2015) 14980. doi: 10.1038/srep14980.
- [700] M. Samalova, A.J. Meyer, S.J. Gurr, M.D. Fricker. Robust anti-oxidant defences in the rice blast fungus *Magnaporthe oryzae* confer tolerance to the host oxidative burst. *New Phytol* 201 (2014) 556–573. doi: 10.1111/nph.12530.
- [701] S.N. Ho, H.D. Hunt, R.M. Horton, J.K. Pullen, L.R. Pease. Site-directed mutagenesis by overlap extension using the polymerase chain reaction. *Gene* 77 (1989) 51–59. doi: 10.1016/0378-1119(89)90358-2.

- [702] W.W. Ward. Biochemical and physical properties of green fluorescent protein. *Methods Biochem Anal* 47 (2006) 39–65.
- [703] X. Liu, A. Zheng, D. Luan, X. Wang, F. Kong, L. Tong, K. Xu, B. Tang. High-quantum-yield mitochondria-targeting near-infrared fluorescent probe for imaging native hypobromous acid in living cells and in vivo. *Anal Chem* 89 (2017) 1787–1792. doi: 10.1021/acs.analchem.6b04094.
- [704] A.E. Lane, J.T.M. Tan, C.L. Hawkins, A.K. Heather, M.J. Davies. The myeloperoxidase-derived oxidant HOSCN inhibits protein tyrosine phosphatases and modulates cell signalling via the mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathway in macrophages. *Biochem J* 430 (2010) 161–169. doi: 10.1042/BJ20100082.
- [705] R.M. Uppu. Synthesis of peroxyxynitrite using isoamyl nitrite and hydrogen peroxide in a homogeneous solvent system. *Anal Biochem* 354 (2006) 165–168. doi: 10.1016/j.ab.2005.11.003.
- [706] S. Kügler, E. Kilic, M. Bähr. Human synapsin 1 gene promoter confers highly neuron-specific long-term transgene expression from an adenoviral vector in the adult rat brain depending on the transduced area. *Gene Ther* 10 (2003) 337–347. doi: 10.1038/sj.gt.3301905.
- [707] R. Rizzuto, H. Nakase, B. Darras, U. Francke, G.M. Fabrizi, T. Mengel, F. Walsh, B. Kadenbach, S. DiMauro, E.A. Schon. A gene specifying subunit VIII of human cytochrome c oxidase is localized to chromosome 11 and is expressed in both muscle and non-muscle tissues. *J Biol Chem* 264 (1989) 10595–10600.
- [708] Y. Lee, A. Messing, M. Su, M. Brenner. GFAP promoter elements required for region-specific and astrocyte-specific expression. *Glia* 56 (2008) 481–493. doi: 10.1002/glia.20622.
- [709] K.-M.R. Prasad, Y. Xu, Z. Yang, S.T. Acton, B.A. French. Robust cardiomyocyte-specific gene expression following systemic injection of AAV: in vivo gene delivery follows a Poisson distribution. *Gene Ther* 18 (2011) 43–52. doi: 10.1038/gt.2010.105.
- [710] W. Zhang, A.W. Lohman, Y. Zhuravlova, X. Lu, M.D. Wiens, H. Hoi, S. Yaganoglu, M.A. Mohr, E.N. Kitova, J.S. Klassen, P. Pantazis, R.J. Thompson, R.E. Campbell. Optogenetic control with a photocleavable protein. *PhoCl. Nat Methods* 14 (2017) 391–394. doi: 10.1038/nmeth.4222.
- [711] W. Kabsch. XDS. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 66 (2010) 125–132. doi: 10.1107/S09074444909047337.
- [712] A.J. McCoy, R.W. Grosse-Kunstleve, P.D. Adams, M.D. Winn, L.C. Storoni, R.J. Read. Phaser crystallographic software. *J Appl Crystallogr* 40 (2007) 658–674. doi: 10.1107/S0021889807021206.
- [713] P.D. Adams, P.V. Afonine, G. Bunkóczi, V.B. Chen, I.W. Davis, N. Echols, J.J. Headd, L.-W. Hung, G.J. Kapral, R.W. Grosse-Kunstleve, A.J. McCoy, N.W. Moriarty, R. Oeffner, R.J. Read, D.C. Richardson, J.S. Richardson, T.C. Terwilliger, P.H. Zwart. PHENIX: a comprehensive Python-based system for macromolecular structure solution. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 66 (2010) 213–221. doi: 10.1107/S09074444909052925.
- [714] P. Emsley, K. Cowtan. Coot: model-building tools for molecular graphics. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 60 (2004) 2126–2132. doi: 10.1107/S09074444904019158.
- [715] P.V. Afonine, R.W. Grosse-Kunstleve, N. Echols, J.J. Headd, N.W. Moriarty, M. Mustyakimov, T.C. Terwilliger, A. Urzhumtsev, P.H. Zwart, P.D. Adams. Towards automated crystallographic structure refinement with phenix.refine. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 68 (2012) 352–367. doi: 10.1107/S09074444912001308.
- [716] M. Rupadevi, S. Parasuraman, R. Raveendran. Protocol for middle cerebral artery occlusion by an intraluminal suture method. *J Pharmacol Pharmacother* 2 (2011) 36–39. doi: 10.4103/0976-500X.77113.
- [717] B.L. Furman. Streptozotocin-induced diabetic models in mice and rats. *Curr Protoc* 1 (2021) e78. doi: 10.1002/cpz1.78.

- [718] A.J. Lam, F. St-Pierre, Y. Gong, J.D. Marshall, P.J. Cranfill, M.A. Baird, M.R. McKeown, J. Wiedenmann, M.W. Davidson, M.J. Schnitzer, R.Y. Tsien, M.Z. Lin. Improving FRET dynamic range with bright green and red fluorescent proteins. *Nat Methods* 9 (2012) 1005–1012. doi: 10.1038/nmeth.2171.
- [719] C. Hoffmann, M. Dietrich, A.-K. Herrmann, T. Schacht, P. Albrecht, A. Methner. Dimethyl fumarate induces glutathione recycling by upregulation of glutathione reductase. *Oxid Med Cell Longev* 2017 (2017) 6093903. doi: 10.1155/2017/6093903.
- [720] R. Rizzuto, M. Brini, P. Pizzo, M. Murgia, T. Pozzan. Chimeric green fluorescent protein as a tool for visualizing subcellular organelles in living cells. *Curr Biol* 5 (1995) 635–642. doi: 10.1016/s0960-9822(95)00128-x.
- [721] M.V. Liberti, J.W. Locasale. The Warburg effect: how does it benefit cancer cells? *Trends Biochem Sci* 41 (2016) 211–218. doi: 10.1016/j.tibs.2015.12.001.
- [722] M. Diehn, R.W. Cho, N.A. Lobo, T. Kalisky, M.J. Dorie, A.N. Kulp, D. Qian, J.S. Lam, L.E. Ailles, M. Wong, B. Joshua, M.J. Kaplan, I. Wapnir, F.M. Dirbas, G. Somlo, C. Garberoglio, B. Paz, J. Shen, S.K. Lau, S.R. Quake, J.M. Brown, I.L. Weissman, M.F. Clarke. Association of reactive oxygen species levels and radioresistance in cancer stem cells. *Nature* 458 (2009) 780–783. doi: 10.1038/nature07733.
- [723] V. Sosa, T. Moliné, R. Somoza, R. Paciucci, H. Kondoh, M.E. LLeonart. Oxidative stress and cancer: an overview. *Ageing Res Rev* 12 (2013) 376–390. doi: 10.1016/j.arr.2012.10.004.
- [724] S. Bonnet, S.L. Archer, J. Allalunis-Turner, A. Haromy, C. Beaulieu, R. Thompson, C.T. Lee, G.D. Lopaschuk, L. Puttagunta, S. Bonnet, G. Harry, K. Hashimoto, C.J. Porter, M.A. Andrade, B. Thebaud, E.D. Michelakis. A mitochondria-K⁺ channel axis is suppressed in cancer and its normalization promotes apoptosis and inhibits cancer growth. *Cancer Cell* 11 (2007) 37–51. doi: 10.1016/j.ccr.2006.10.020.
- [725] L. Pollegioni, K. Diederichs, G. Molla, S. Umhau, W. Welte, S. Ghisla, M.S. Pilone. Yeast D-amino acid oxidase: structural basis of its catalytic properties. *J Mol Biol* 324 (2002) 535–546. doi: 10.1016/s0022-2836(02)01062-8.
- [726] Y.A. Bogdanova, C. Schultz, V.V. Belousov. Local generation and imaging of hydrogen peroxide in living cells. *Curr Protoc Chem Biol* 9 (2017) 117–127. doi: 10.1002/cpch.20.
- [727] E.S.J. Arnér, A. Holmgren. The thioredoxin system in cancer. *Semin Cancer Biol* 16 (2006) 420–426. doi: 10.1016/j.semcancer.2006.10.009.
- [728] J. Zhang, X. Li, X. Han, R. Liu, J. Fang. Targeting the thioredoxin system for cancer therapy. *Trends Pharmacol Sci* 38 (2017) 794–808. doi: 10.1016/j.tips.2017.06.001.
- [729] O. Rackham, A.-M.J. Shearwood, R. Thyer, E. McNamara, S.M.K. Davies, B.A. Callus, A. Miranda-Vizuete, S.J. Berners-Price, Q. Cheng, E.S.J. Arnér, A. Filipovska. Substrate and inhibitor specificities differ between human cytosolic and mitochondrial thioredoxin reductases: Implications for development of specific inhibitors. *Free Radic Biol Med* 50 (2011) 689–699. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2010.12.015.
- [730] W.A. Prütz. Hypochlorous acid interactions with thiols, nucleotides, DNA, and other biological substrates. *Arch Biochem Biophys* 332 (1996) 110–120. doi: 10.1006/abbi.1996.0322.
- [731] D.A. Ford. Lipid oxidation by hypochlorous acid: chlorinated lipids in atherosclerosis and myocardial ischemia. *Clin Lipidol* 5 (2010) 835–852. doi: 10.2217/clp.10.68.
- [732] M.B. Hampton, A.J. Kettle, C.C. Winterbourn. Inside the neutrophil phagosome: oxidants, myeloperoxidase, and bacterial killing. *Blood* 92 (1998) 3007–3017.
- [733] A.W. Segal. How neutrophils kill microbes. *Annu Rev Immunol* 23 (2005) 197–223. doi: 10.1146/annurev.immunol.23.021704.115653.
- [734] A.N. Mayeno, A.J. Curran, R.L. Roberts, C.S. Foote. Eosinophils preferentially use bromide to generate halogenating agents. *J Biol Chem* 264 (1989) 5660–5668.
- [735] G.E. Conner, M. Salathe, R. Forteza. Lactoperoxidase and hydrogen peroxide metabolism in the airway. *Am J Respir Crit Care Med* 166 (2002) S57-61. doi: 10.1164/rccm.2206018.

- [736] J.D. Chandler, B.J. Day. Thiocyanate: a potentially useful therapeutic agent with host defense and antioxidant properties. *Biochem Pharmacol* 84 (2012) 1381–1387. doi: 10.1016/j.bcp.2012.07.029.
- [737] S. Tzikas, D. Schlak, K. Sopova, A. Gatsiou, D. Stakos, K. Stamatelopoulos, K. Stellos, C. Laske. Increased myeloperoxidase plasma levels in patients with Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* 39 (2014) 557–564. doi: 10.3233/JAD-131469.
- [738] L.K. Stamp, I. Khalilova, J.M. Tarr, R. Senthilmohan, R. Turner, R.C. Haigh, P.G. Winyard, A.J. Kettle. Myeloperoxidase and oxidative stress in rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford)* 51 (2012) 1796–1803. doi: 10.1093/rheumatology/kes193.
- [739] N. Anatoliotakis, S. Deftereos, G. Bouras, G. Giannopoulos, D. Tsounis, C. Angelidis, A. Kaoukis, C. Stefanadis. Myeloperoxidase: expressing inflammation and oxidative stress in cardiovascular disease. *Curr Top Med Chem* 13 (2013) 115–138. doi: 10.2174/1568026611313020004.
- [740] R. Zhang, M.L. Brennan, X. Fu, R.J. Aviles, G.L. Pearce, M.S. Penn, E.J. Topol, D.L. Sprecher, S.L. Hazen. Association between myeloperoxidase levels and risk of coronary artery disease. *JAMA* 286 (2001) 2136–2142. doi: 10.1001/jama.286.17.2136.
- [741] A.V. Peskin, C.C. Winterbourn. Taurine chloramine is more selective than hypochlorous acid at targeting critical cysteines and inactivating creatine kinase and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *Free Radic Biol Med* 40 (2006) 45–53. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2005.08.019.
- [742] R.G. Midwinter, F.-C. Cheah, J. Moskovitz, M.C. Vissers, C.C. Winterbourn. IkappaB is a sensitive target for oxidation by cell-permeable chloramines: inhibition of NF-kappaB activity by glycine chloramine through methionine oxidation. *Biochem J* 396 (2006) 71–78. doi: 10.1042/BJ20052026.
- [743] J. Fan, H. Mu, H. Zhu, J. Du, N. Jiang, J. Wang, X. Peng. Recognition of HClO in live cells with separate signals using a ratiometric fluorescent sensor with fast response. *Ind Eng Chem Res* 54 (2015) 8842–8846. doi: 10.1021/acs.iecr.5b01904.
- [744] L. Wu, I.-C. Wu, C.C. DuFort, M.A. Carlson, X. Wu, L. Chen, C.-T. Kuo, Y. Qin, J. Yu, S.R. Hingorani, D.T. Chiu. Photostable ratiometric PdOT probe for in vitro and in vivo imaging of hypochlorous acid. *J Am Chem Soc* 139 (2017) 6911–6918. doi: 10.1021/jacs.7b01545.
- [745] L.-L. Xi, X.-F. Guo, C.-L. Wang, W.-L. Wu, M.-F. Huang, J.-Y. Miao, B.-X. Zhao. A near-infrared ratiometric fluorescent probe for rapid and selective detection of hypochlorous acid in aqueous solution and living cells. *Sensors and Actuators B: Chemical* 255 (2018) 666–671. doi: 10.1016/j.snb.2017.08.073.
- [746] M. Ren, B. Deng, K. Zhou, X. Kong, J.-Y. Wang, G. Xu, W. Lin. A lysosome-targeted and ratiometric fluorescent probe for imaging exogenous and endogenous hypochlorous acid in living cells. *J Mater Chem B* 4 (2016) 4739–4745. doi: 10.1039/c6tb01085g.
- [747] C. Xu, Y. Qian. The α , β -unsaturated pyrazolone-based fluorescent sensor with red emission and its application for real-time monitoring hypochlorite in cancer cells and zebrafish. *Dyes and Pigments* 161 (2019) 303–312. doi: 10.1016/j.dyepig.2018.09.063.
- [748] P. Zhang, H. Wang, Y. Hong, M. Yu, R. Zeng, Y. Long, J. Chen. Selective visualization of endogenous hypochlorous acid in zebrafish during lipopolysaccharide-induced acute liver injury using a polymer micelles-based ratiometric fluorescent probe. *Biosens Bioelectron* 99 (2018) 318–324. doi: 10.1016/j.bios.2017.08.001.
- [749] X. Chen, K.-A. Lee, X. Ren, J.-C. Ryu, G. Kim, J.-H. Ryu, W.-J. Lee, J. Yoon. Synthesis of a highly HOCl-selective fluorescent probe and its use for imaging HOCl in cells and organisms. *Nat Protoc* 11 (2016) 1219–1228. doi: 10.1038/nprot.2016.062.
- [750] I. Verrastro, K. Tveen-Jensen, C.M. Spickett, A.R. Pitt. The effect of HOCl-induced modifications on phosphatase and tensin homologue (PTEN) structure and function. *Free Radic Res* 52 (2018) 232–247. doi: 10.1080/10715762.2018.1424333.

- [751] A. Perkins, D.A. Tudorica, M.R. Amieva, S.J. Remington, K. Guillemin. *Helicobacter pylori* senses bleach (HOCl) as a chemoattractant using a cytosolic chemoreceptor. *PLoS Biol* 17 (2019) e3000395. doi: 10.1371/journal.pbio.3000395.
- [752] M.J. Gray, Y. Li, L.I.-O. Leichert, Z. Xu, U. Jakob. Does the transcription factor NemR use a regulatory sulfenamide bond to sense bleach? *Antioxid Redox Signal* 23 (2015) 747–754. doi: 10.1089/ars.2015.6346.
- [753] V.V. Loi, T. Busche, K. Tedin, J. Bernhardt, J. Wollenhaupt, N.T.T. Huyen, C. Weise, J. Kalinowski, M.C. Wahl, M. Fulde, H. Antelmann. Redox-sensing under hypochlorite stress and infection conditions by the Rrf2-family repressor HypR in *Staphylococcus aureus*. *Antioxid Redox Signal* 29 (2018) 615–636. doi: 10.1089/ars.2017.7354.
- [754] Q.N. Tung, T. Busche, V. Van Loi, J. Kalinowski, H. Antelmann. The redox-sensing MarR-type repressor HypS controls hypochlorite and antimicrobial resistance in *Mycobacterium smegmatis*. *Free Radic Biol Med* 147 (2020) 252–261. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2019.12.032.
- [755] S. El Hajj, C. Henry, C. Andrieu, A. Vergnes, L. Loiseau, G. Brasseur, R. Barré, L. Aussel, B. Ezraty. HprSR is a reactive chlorine species-sensing, two-component system in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 204 (2022) e0044921. doi: 10.1128/JB.00449-21.
- [756] C. Lee, J. Shin, C. Park. Novel regulatory system nemRA-gloA for electrophile reduction in *Escherichia coli* K-12. *Mol Microbiol* 88 (2013) 395–412. doi: 10.1111/mmi.12192.
- [757] H. Ripps, W. Shen. Review: taurine: a “very essential” amino acid. *Mol Vis* 18 (2012) 2673–2686.
- [758] M.C.M. Vissers, C.C. Winterbourn. Oxidative damage to fibronectin: I. The effects of the neutrophil myeloperoxidase system and HOCl. *Arch Biochem Biophys* 285 (1991) 53–59. doi: 10.1016/0003-9861(91)90327-F.
- [759] A.M. O’Connell, S.P. Gieseg, K.K. Stanley. Hypochlorite oxidation causes cross-linking of Lp(a). *Biochim Biophys Acta* 1225 (1994) 180–186. doi: 10.1016/0925-4439(94)90076-0.
- [760] J.M. Davies, D.A. Horwitz, K.J. Davies. Potential roles of hypochlorous acid and N-chloroamines in collagen breakdown by phagocytic cells in synovitis. *Free Radic Biol Med* 15 (1993) 637–643. doi: 10.1016/0891-5849(93)90167-s.
- [761] C. Storkey, M.J. Davies, D.I. Pattison. Reevaluation of the rate constants for the reaction of hypochlorous acid (HOCl) with cysteine, methionine, and peptide derivatives using a new competition kinetic approach. *Free Radic Biol Med* 73 (2014) 60–66. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2014.04.024.
- [762] C.N. Hall, J. Garthwaite. What is the real physiological NO concentration in vivo? *Nitric Oxide* 21 (2009) 92–103. doi: 10.1016/j.niox.2009.07.002.
- [763] T. Malinski, F. Bailey, Z.G. Zhang, M. Chopp. Nitric oxide measured by a porphyrinic microsensor in rat brain after transient middle cerebral artery occlusion. *J Cereb Blood Flow Metab* 13 (1993) 355–358. doi: 10.1038/jcbfm.1993.48.
- [764] J. Yang, R. Ji, Y. Cheng, J.-Z. Sun, L.K. Jennings, C. Zhang. L-arginine chlorination results in the formation of a nonselective nitric-oxide synthase inhibitor. *J Pharmacol Exp Ther* 318 (2006) 1044–1049. doi: 10.1124/jpet.106.104422.
- [765] J. R.Foote, A. P. Levine, P. Behe, M. R. Duchon, A. W. Segal. Imaging the neutrophil phagosome and cytoplasm using a ratiometric pH indicator. *J Vis Exp* (2017) 55107. doi: 10.3791/55107.
- [766] A.P. Levine, M.R. Duchon, S. de Villiers, P.R. Rich, A.W. Segal. Alkalinity of neutrophil phagocytic vacuoles is modulated by HVCN1 and has consequences for myeloperoxidase activity. *PLoS One* 10 (2015) e0125906. doi: 10.1371/journal.pone.0125906.
- [767] P.-S. Chen, W.-T. Chiu, P.-L. Hsu, S.-C. Lin, I.-C. Peng, C.-Y. Wang, S.-J. Tsai. Pathophysiological implications of hypoxia in human diseases. *J Biomed Sci* 27 (2020) 63. doi: 10.1186/s12929-020-00658-7.

- [768] S. Manzanero, T. Santro, T.V. Arumugam. Neuronal oxidative stress in acute ischemic stroke: Sources and contribution to cell injury. *Neurochem Int* 62 (2013) 712–718. doi: 10.1016/j.neuint.2012.11.009.
- [769] D.-H. Choi, J.-H. Kim, K.-H. Lee, H.-Y. Kim, Y.-S. Kim, W.S. Choi, J. Lee. Role of neuronal NADPH oxidase 1 in the peri-infarct regions after stroke. *PLoS One* 10 (2015) e0116814. doi: 10.1371/journal.pone.0116814.
- [770] T. Kahles, R.P. Brandes. Which NADPH oxidase isoform is relevant for ischemic stroke? The case for nox 2. *Antioxid Redox Signal* 18 (2013) 1400–1417. doi: 10.1089/ars.2012.4721.
- [771] H. Chen, G.S. Kim, N. Okami, P. Narasimhan, P.H. Chan. NADPH oxidase is involved in post-ischemic brain inflammation. *Neurobiol Dis* 42 (2011) 341–348. doi: 10.1016/j.nbd.2011.01.027.
- [772] X.N. Tang, Z. Zheng, R.G. Giffard, M.A. Yenari. Significance of marrow-derived nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase in experimental ischemic stroke. *Ann Neurol* 70 (2011) 606–615. doi: 10.1002/ana.22476.
- [773] T.M. De Silva, V.H. Brait, G.R. Drummond, C.G. Sobey, A.A. Miller. Nox2 oxidase activity accounts for the oxidative stress and vasomotor dysfunction in mouse cerebral arteries following ischemic stroke. *PLoS One* 6 (2011) e28393. doi: 10.1371/journal.pone.0028393.
- [774] C. Kleinschnitz, H. Grund, K. Wingler, M.E. Armitage, E. Jones, M. Mittal, D. Barit, T. Schwarz, C. Geis, P. Kraft, K. Barthel, M.K. Schuhmann, A.M. Herrmann, S.G. Meuth, G. Stoll, S. Meurer, A. Schrewe, L. Becker, V. Gailus-Durner, H. Fuchs, T. Klopstock, M.H. de Angelis, K. Jandeleit-Dahm, A.M. Shah, N. Weissmann, H.H.H.W. Schmidt. Post-stroke inhibition of induced NADPH oxidase type 4 prevents oxidative stress and neurodegeneration. *PLoS Biol* 8 (2010) e1000479. doi: 10.1371/journal.pbio.1000479.
- [775] A.I. Casas, E. Geuss, P.W.M. Kleikers, S. Mencl, A.M. Herrmann, I. Buendia, J. Egea, S.G. Meuth, M.G. Lopez, C. Kleinschnitz, H.H.H.W. Schmidt. NOX4-dependent neuronal autotoxicity and BBB breakdown explain the superior sensitivity of the brain to ischemic damage. *Proc Natl Acad Sci U S A* 114 (2017) 12315–12320. doi: 10.1073/pnas.1705034114.
- [776] A.I. Casas, P.W. Kleikers, E. Geuss, F. Langhauser, T. Adler, D.H. Busch, V. Gailus-Durner, M.H. de Angelis, J. Egea, M.G. Lopez, C. Kleinschnitz, H.H. Schmidt. Calcium-dependent blood-brain barrier breakdown by NOX5 limits postreperfusion benefit in stroke. *J Clin Invest* 129 (2019) 1772–1778. doi: 10.1172/JCI124283.
- [777] Z.V. Niatsetskaya, S.A. Sosunov, D. Matsiukevich, I.V. Utkina-Sosunova, V.I. Ratner, A.A. Starkov, V.S. Ten. The oxygen free radicals originating from mitochondrial complex I contribute to oxidative brain injury following hypoxia-ischemia in neonatal mice. *J Neurosci* 32 (2012) 3235–3244. doi: 10.1523/JNEUROSCI.6303-11.2012.
- [778] O. Garofalo, D.W. Cox, H.S. Bachelard. Brain levels of NADH and NAD⁺ under hypoxic and hypoglycaemic conditions in vitro. *J Neurochem* 51 (1988) 172–176. doi: 10.1111/j.1471-4159.1988.tb04851.x.
- [779] A. Mayevsky. Brain NADH redox state monitored in vivo by fiber optic surface fluorometry. *Brain Res* 319 (1984) 49–68. doi: 10.1016/0165-0173(84)90029-8.
- [780] T.P. Keeley, G.E. Mann. Defining physiological normoxia for improved translation of cell physiology to animal models and humans. *Physiol Rev* 99 (2019) 161–234. doi: 10.1152/physrev.00041.2017.
- [781] M.R. Warden, J.A. Cardin, K. Deisseroth. Optical neural interfaces. *Annu Rev Biomed Eng* 16 (2014) 103–129. doi: 10.1146/annurev-bioeng-071813-104733.
- [782] L.V. Doronina-Amitonova, I.V. Fedotov, O.I. Ivashkina, M.A. Zots, A.B. Fedotov, K.V. Anokhin, A.M. Zheltikov. Implantable fiber-optic interface for parallel multisite long-term optical dynamic brain interrogation in freely moving mice. *Sci Rep* 3 (2013) 3265. doi: 10.1038/srep03265.

- [783] C.K. Kim, S.J. Yang, N. Pichamoorthy, N.P. Young, I. Kauvar, J.H. Jennings, T.N. Lerner, A. Berndt, S.Y. Lee, C. Ramakrishnan, T.J. Davidson, M. Inoue, H. Bito, K. Deisseroth. Simultaneous fast measurement of circuit dynamics at multiple sites across the mammalian brain. *Nat Methods* 13 (2016) 325–328. doi: 10.1038/nmeth.3770.
- [784] Y. Sych, M. Chernysheva, L.T. Sumanovski, F. Helmchen. High-density multi-fiber photometry for studying large-scale brain circuit dynamics. *Nat Methods* 16 (2019) 553–560. doi: 10.1038/s41592-019-0400-4.
- [785] H. Kalimo, S. Rehncrona, B. Söderfeldt, Y. Olsson, B.K. Siesjö. Brain lactic acidosis and ischemic cell damage: 2. Histopathology. *J Cereb Blood Flow Metab* 1 (1981) 313–327. doi: 10.1038/jcbfm.1981.35.
- [786] M. Chopp, S. Frinak, D.R. Walton, M.B. Smith, K.M. Welch. Intracellular acidosis during and after cerebral ischemia: in vivo nuclear magnetic resonance study of hyperglycemia in cats. *Stroke* 18 (1987) 919–923. doi: 10.1161/01.str.18.5.919.
- [787] K. Katsura, A. Ekholm, B. Asplund, B.K. Siesjö. Extracellular pH in the brain during ischemia: relationship to the severity of lactic acidosis. *J Cereb Blood Flow Metab* 11 (1991) 597–599. doi: 10.1038/jcbfm.1991.109.
- [788] P.W. Hochachka, T.P. Mommsen. Protons and anaerobiosis. *Science* 219 (1983) 1391–1397. doi: 10.1126/science.6298937.
- [789] W. Paschen, B. Djuricic, G. Mies, R. Schmidt-Kastner, F. Linn. Lactate and pH in the brain: association and dissociation in different pathophysiological states. *J Neurochem* 48 (1987) 154–159. doi: 10.1111/j.1471-4159.1987.tb13140.x.
- [790] D.J. Combs, R.J. Dempsey, M. Maley, D. Donaldson, C. Smith. Relationship between plasma glucose, brain lactate, and intracellular pH during cerebral ischemia in gerbils. *Stroke* 21 (1990) 936–942. doi: 10.1161/01.str.21.6.936.
- [791] C. Li, R.M. Jackson. Reactive species mechanisms of cellular hypoxia-reoxygenation injury. *Am J Physiol Cell Physiol* 282 (2002) C227–241. doi: 10.1152/ajpcell.00112.2001.
- [792] R. Chen, U.H. Lai, L. Zhu, A. Singh, M. Ahmed, N.R. Forsyth. Reactive oxygen species formation in the brain at different oxygen levels: the role of hypoxia inducible factors. *Front Cell Dev Biol* 6 (2018) 132. doi: 10.3389/fcell.2018.00132.
- [793] D.N. Granger, P.R. Kvietys. Reperfusion injury and reactive oxygen species: The evolution of a concept. *Redox Biol* 6 (2015) 524–551. doi: 10.1016/j.redox.2015.08.020.
- [794] W.P. Dubinsky, E. Racker. The mechanism of lactate transport in human erythrocytes. *The J Membr Biol* 44 (1978) 25–36. doi: 10.1007/BF01940571.
- [795] M. Serteser, T. Ozben, S. Gumuslu, S. Balkan, E. Balkan. Lipid peroxidation in rat brain during focal cerebral ischemia: prevention of malondialdehyde and lipid conjugated diene production by a novel antiepileptic, lamotrigine. *Neurotoxicology* 23 (2002) 111–119. doi: 10.1016/s0161-813x(02)00018-9.
- [796] T.K. Makar, M. Nedergaard, A. Preuss, A.S. Gelbard, A.S. Perumal, A.J.L. Cooper. Vitamin E, ascorbate, glutathione, glutathione disulfide, and enzymes of glutathione metabolism in cultures of chick astrocytes and neurons: evidence that astrocytes play an important role in antioxidative processes in the brain. *J Neurochem* 62 (1994) 45–53. doi: 10.1046/j.1471-4159.1994.62010045.x.
- [797] X.-Y. Shen, Z.-K. Gao, Y. Han, M. Yuan, Y.-S. Guo, X. Bi. Activation and role of astrocytes in ischemic stroke. *Front Cell Neurosci* 15 (2021) 755955. doi: 10.3389/fncel.2021.755955.
- [798] S. Griffin, J.B. Clark, L. Canevari. Astrocyte-neurone communication following oxygen-glucose deprivation. *J Neurochem* 95 (2005) 1015–1022. doi: 10.1111/j.1471-4159.2005.03418.x.
- [799] Y. Chen, N.E. Vartiainen, W. Ying, P.H. Chan, J. Koistinaho, R.A. Swanson. Astrocytes protect neurons from nitric oxide toxicity by a glutathione-dependent mechanism. *J Neurochem* 77 (2001) 1601–1610. doi: 10.1046/j.1471-4159.2001.00374.x.

- [800] Y. Chen, C. Qin, J. Huang, X. Tang, C. Liu, K. Huang, J. Xu, G. Guo, A. Tong, L. Zhou. The role of astrocytes in oxidative stress of central nervous system: A mixed blessing. *Cell Prolif* 53 (2020) e12781. doi: 10.1111/cpr.12781.
- [801] X.F. Wang, M.S. Cynader. Astrocytes provide cysteine to neurons by releasing glutathione. *J Neurochem* 74 (2000) 1434–1442. doi: 10.1046/j.1471-4159.2000.0741434.x.
- [802] K.F. Bell, B. Al-Mubarak, J.H. Fowler, P.S. Baxter, K. Gupta, T. Tsujita, S. Chowdhry, R. Patani, S. Chandran, K. Horsburgh, J.D. Hayes, G.E. Hardingham. Mild oxidative stress activates Nrf2 in astrocytes, which contributes to neuroprotective ischemic preconditioning. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108 (2011) E1-2; author reply E3-4. doi: 10.1073/iti0111108.
- [803] K. Hayakawa, E. Esposito, X. Wang, Y. Terasaki, Y. Liu, C. Xing, X. Ji, E.H. Lo. Transfer of mitochondria from astrocytes to neurons after stroke. *Nature* 535 (2016) 551–555. doi: 10.1038/nature18928.
- [804] Y.M. Morizawa, Y. Hirayama, N. Ohno, S. Shibata, E. Shigetomi, Y. Sui, J. Nabekura, K. Sato, F. Okajima, H. Takebayashi, H. Okano, S. Koizumi. Reactive astrocytes function as phagocytes after brain ischemia via ABCA1-mediated pathway. *Nat Commun* 8 (2017) 28. doi: 10.1038/s41467-017-00037-1.
- [805] H. Min, J. Hong, I.-H. Cho, Y.H. Jang, H. Lee, D. Kim, S.-W. Yu, S. Lee, S.J. Lee. TLR2-induced astrocyte MMP9 activation compromises the blood brain barrier and exacerbates intracerebral hemorrhage in animal models. *Mol Brain* 8 (2015) 23. doi: 10.1186/s13041-015-0116-z.
- [806] C. Rakers, M. Schleif, N. Blank, H. Matušková, T. Ulas, K. Händler, S.V. Torres, T. Schumacher, K. Tai, J.L. Schultze, W.S. Jackson, G.C. Petzold. Stroke target identification guided by astrocyte transcriptome analysis. *Glia* 67 (2019) 619–633. doi: 10.1002/glia.23544.
- [807] Z. Liu, M. Chopp. Astrocytes, therapeutic targets for neuroprotection and neurorestoration in ischemic stroke. *Prog Neurobiol* 144 (2016) 103–120. doi: 10.1016/j.pneurobio.2015.09.008.
- [808] M.J.A. Luitse, G.J. Biessels, G.E.H.M. Rutten, L.J. Kappelle. Diabetes, hyperglycaemia, and acute ischaemic stroke. *Lancet Neurol* 11 (2012) 261–271. doi: 10.1016/S1474-4422(12)70005-4.
- [809] N.N. Tun, G. Arunagirinathan, S.K. Munshi, J.M. Pappachan. Diabetes mellitus and stroke: A clinical update. *World J Diabetes* 8 (2017) 235–248. doi: 10.4239/wjd.v8.i6.235.
- [810] E.I. González-Moreno, C.R. Cámara-Lemarroy, J.G. González-González, F. Góngora-Rivera. Glycemic variability and acute ischemic stroke: the missing link? *Transl Stroke Res* 5 (2014) 638–646. doi: 10.1007/s12975-014-0365-7.
- [811] P.J. Lindsberg, R.O. Roine. Hyperglycemia in acute stroke. *Stroke* 35 (2004) 363–364. doi: 10.1161/01.STR.0000115297.92132.84.
- [812] A.K. Rehni, A. Liu, M.A. Perez-Pinzon, K.R. Dave. Diabetic aggravation of stroke and animal models. *Exp Neurol* 292 (2017) 63–79. doi: 10.1016/j.expneurol.2017.03.004.
- [813] M.C. Deeds, J.M. Anderson, A.S. Armstrong, D.A. Gastineau, H.J. Hiddinga, A. Jahangir, N.L. Eberhardt, Y.C. Kudva. Single dose streptozotocin-induced diabetes: considerations for study design in islet transplantation models. *Lab Anim* 45 (2011) 131–140. doi: 10.1258/la.2010.010090.
- [814] P. Venditti, P. Masullo, S. Di Meo. Effects of myocardial ischemia and reperfusion on mitochondrial function and susceptibility to oxidative stress. *Cell Mol Life Sci* 58 (2001) 1528–1537. doi: 10.1007/PL00000793.
- [815] P. Venditti, R. De Rosa, L. Cigliano, C. Agnisola, S. Di Meo. Role of nitric oxide in the functional response to ischemia-reperfusion of heart mitochondria from hyperthyroid rats. *Cell Mol Life Sci* 61 (2004) 2244–2252. doi: 10.1007/s00018-004-4125-9.
- [816] D.J. Hausenloy, D.M. Yellon. Myocardial ischemia-reperfusion injury: a neglected therapeutic target. *J Clin Invest* 123 (2013) 92–100. doi: 10.1172/JCI62874.

- [817] I. Ostadalova, B. Ostadal, F. Kolár, J.R. Parratt, S. Wilson. Tolerance to ischaemia and ischaemic preconditioning in neonatal rat heart. *J Mol Cell Cardiol* 30 (1998) 857–865. doi: 10.1006/jmcc.1998.0653.
- [818] J. Girard, P. Ferré, J.P. Pégorier, P.H. Duée. Adaptations of glucose and fatty acid metabolism during perinatal period and suckling-weaning transition. *Physiol Rev* 72 (1992) 507–562. doi: 10.1152/physrev.1992.72.2.507.
- [819] J. Piquereau, R. Ventura-Clapier. Maturation of cardiac energy metabolism during perinatal development. *Front Physiol* 9 (2018) 959. doi: 10.3389/fphys.2018.00959.
- [820] G.D. Lopaschuk, M.A. Spafford, D.R. Marsh. Glycolysis is predominant source of myocardial ATP production immediately after birth. *Am J Physiol* 261 (1991) H1698–1705. doi: 10.1152/ajpheart.1991.261.6.H1698.
- [821] G.D. Lopaschuk, J.R. Ussher, C.D.L. Folmes, J.S. Jaswal, W.C. Stanley. Myocardial fatty acid metabolism in health and disease. *Physiol Rev* 90 (2010) 207–258. doi: 10.1152/physrev.00015.2009.
- [822] N.A. Brazhe, M. Treiman, B. Faricelli, J.H. Vestergaard, O. Sosnovtseva. In situ Raman study of redox state changes of mitochondrial cytochromes in a perfused rat heart., *PLoS One* 8 (2013) e70488. doi: 10.1371/journal.pone.0070488.
- [823] N.A. Brazhe, M. Treiman, A.R. Brazhe, N.L. Find, G.V. Maksimov, O.V. Sosnovtseva. Mapping of redox state of mitochondrial cytochromes in live cardiomyocytes using Raman microspectroscopy. *PLoS One* 7 (2012) e41990. doi: 10.1371/journal.pone.0041990.
- [824] T. Yamamoto, T. Minamikawa, Y. Harada, Y. Yamaoka, H. Tanaka, H. Yaku, T. Takamatsu. Label-free evaluation of myocardial infarct in surgically excised ventricular myocardium by Raman spectroscopy. *Sci Rep* 8 (2018) 14671. doi: 10.1038/s41598-018-33025-6.
- [825] D.T. Love, C. Guo, E.I. Nikelshparg, N.A. Brazhe, O. Sosnovtseva, C.L. Hawkins. The role of the myeloperoxidase-derived oxidant hypothiocyanous acid (HOSCN) in the induction of mitochondrial dysfunction in macrophages. *Redox Biol* 36 (2020) 101602. doi: 10.1016/j.redox.2020.101602.
- [826] P. Bazylewski, R. Divigalpitiya, G. Fanchini. In situ Raman spectroscopy distinguishes between reversible and irreversible thiol modifications in l-cysteine. *RSC Adv.* 7 (2017) 2964–2970. doi: 10.1039/C6RA25879D.
- [827] Y. Sun, V. Karunakaran, P.M. Champion. Investigations of the low-frequency spectral density of cytochrome c upon equilibrium unfolding. *J Phys Chem B* 117 (2013) 9615–9625. doi: 10.1021/jp404881k.
- [828] R.V. Chertkova, N.A. Brazhe, T.V. Bryantseva, A.N. Nekrasov, D.A. Dolgikh, A.I. Yusipovich, O. Sosnovtseva, G.V. Maksimov, A.B. Rubin, M.P. Kirpichnikov. New insight into the mechanism of mitochondrial cytochrome c function. *PLoS One* 12 (2017) e0178280. doi: 10.1371/journal.pone.0178280.
- [829] M. Adhish, I. Manjubala. Effectiveness of zebrafish models in understanding human diseases-A review of models. *Heliyon* 9 (2023) e14557. doi: 10.1016/j.heliyon.2023.e14557.
- [830] T.-Y. Choi, T.-I. Choi, Y.-R. Lee, S.-K. Choe, C.-H. Kim. Zebrafish as an animal model for biomedical research. *Exp Mol Med* 53 (2021) 310–317. doi: 10.1038/s12276-021-00571-5.
- [831] P.-Y. Lam, R.T. Peterson. Developing zebrafish disease models for in vivo small molecule screens. *Curr Opin Chem Biol* 50 (2019) 37–44. doi: 10.1016/j.cbpa.2019.02.005.
- [832] E.E. Patton, L.I. Zon, D.M. Langenau. Zebrafish disease models in drug discovery: from preclinical modelling to clinical trials. *Nat Rev Drug Discov* 20 (2021) 611–628. doi: 10.1038/s41573-021-00210-8.
- [833] M.M. Braga, E.P. Rico, S.D. Córdova, C.B. Pinto, R.E. Blaser, R.D. Dias, D.B. Rosemberg, D.L. Oliveira, D.O. Souza. Evaluation of spontaneous recovery of behavioral and brain injury profiles in zebrafish after hypoxia. *Behav Brain Res* 253 (2013) 145–151. doi: 10.1016/j.bbr.2013.07.019.

- [834] X. Zou, Q. Liu, S. Guo, J. Zhu, J. Han, Z. Xia, Y. Du, L. Wei, J. Shang. A novel zebrafish larvae hypoxia/reoxygenation model for assessing myocardial ischemia/reperfusion injury. *Zebrafish* 16 (2019) 434–442. doi: 10.1089/zeb.2018.1722.
- [835] Z. Cao, L.D. Jensen, P. Rouhi, K. Hosaka, T. Länne, J.F. Steffensen, E. Wahlberg, Y. Cao. Hypoxia-induced retinopathy model in adult zebrafish. *Nat Protoc* 5 (2010) 1903–1910. doi: 10.1038/nprot.2010.149.
- [836] X. Yu, Y.V. Li. Zebrafish (*Danio rerio*) developed as an alternative animal model for focal ischemic stroke. *Acta Neurochir Suppl* 121 (2016) 115–119. doi: 10.1007/978-3-319-18497-5_20.
- [837] H. Kamei, C. Duan. Hypoxic treatment of zebrafish embryos and larvae. *Methods Mol Biol* 1742 (2018) 195–203. doi: 10.1007/978-1-4939-7665-2_17.
- [838] M.E. Hale. Developmental change in the function of movement systems: transition of the pectoral fins between respiratory and locomotor roles in zebrafish. *Integr Comp Biol* 54 (2014) 238–249. doi: 10.1093/icb/icu014.
- [839] C.K. Sen, S. Roy. Redox signals in wound healing. *Biochim Biophys Acta* 1780 (2008) 1348–1361. doi: 10.1016/j.bbagen.2008.01.006.
- [840] A. Mayevsky, B. Chance. Oxidation–reduction states of NADH in vivo: From animals to clinical use. *Mitochondrion* 7 (2007) 330–339. doi: 10.1016/j.mito.2007.05.001.
- [841] L.N.M. Duysens, J. Amesz. Fluorescence spectrophotometry of reduced phosphopyridine nucleotide in intact cells in the near-ultraviolet and visible region. *Biochim et Biophys Acta* 24 (1957) 19–26. doi: 10.1016/0006-3002(57)90141-5.
- [842] B. Chance, P. Cohen, F. Jobsis, B. Schoener. Intracellular oxidation-reduction states in vivo. *Science* 137 (1962) 499–508. doi: 10.1126/science.137.3529.499.
- [843] T.S. Blacker, M.R. Duchon. Investigating mitochondrial redox state using NADH and NADPH autofluorescence. *Free Radic Biol Med* 100 (2016) 53–65. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2016.08.010.
- [844] A. Ulfig, L.I. Leichert. The effects of neutrophil-generated hypochlorous acid and other hypohalous acids on host and pathogens. *Cell Mol Life Sci* 78 (2021) 385–414. doi: 10.1007/s00018-020-03591-y.
- [845] A. Patt, A.H. Harken, L.K. Burton, T.C. Rodell, D. Piermattei, W.J. Schorr, N.B. Parker, E.M. Berger, I.R. Horesh, L.S. Terada. Xanthine oxidase-derived hydrogen peroxide contributes to ischemia reperfusion-induced edema in gerbil brains. *J Clin Invest* 81 (1988) 1556–1562. doi: 10.1172/JCI113488.
- [846] E. Kumura, T. Yoshimine, K.I. Iwatsuki, K. Yamanaka, S. Tanaka, T. Hayakawa, T. Shiga, H. Kosaka. Generation of nitric oxide and superoxide during reperfusion after focal cerebral ischemia in rats. *Am J Physiol* 270 (1996) C748–752. doi: 10.1152/ajpcell.1996.270.3.C748.
- [847] M. Kim, A. Stepanova, Z. Niatetskaya, S. Sosunov, S. Arndt, M.P. Murphy, A. Galkin, V.S. Ten. Attenuation of oxidative damage by targeting mitochondrial complex I in neonatal hypoxic-ischemic brain injury. *Free Radic Biol Med* 124 (2018) 517–524. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2018.06.040.
- [848] S. Matsushima, H. Tsutsui, J. Sadoshima. Physiological and pathological functions of NADPH oxidases during myocardial ischemia-reperfusion. *Trends Cardiovasc Med* 24 (2014) 202–205. doi: 10.1016/j.tcm.2014.03.003.
- [849] E.T. Chouchani, V.R. Pell, A.M. James, L.M. Work, K. Saeb-Parsy, C. Frezza, T. Krieg, M.P. Murphy. A unifying mechanism for mitochondrial superoxide production during ischemia-reperfusion injury. *Cell Metab* 23 (2016) 254–263. doi: 10.1016/j.cmet.2015.12.009.
- [850] X. Zhu, L. Zuo. Characterization of oxygen radical formation mechanism at early cardiac ischemia. *Cell Death Dis* 4 (2013) e787. doi: 10.1038/cddis.2013.313.
- [851] B.N. Puente, W. Kimura, S.A. Muralidhar, J. Moon, J.F. Amatruda, K.L. Phelps, D. Grinsfelder, B.A. Rothermel, R. Chen, J.A. Garcia, C.X. Santos, S. Thet, E. Mori, M.T. Kinter, P.M. Rindler, S. Zacchigna, S. Mukherjee, D.J. Chen, A.I. Mahmoud, M. Giacca,

- P.S. Rabinovitch, A. Aroumougame, A.M. Shah, L.I. Szweda, H.A. Sadek. The oxygen-rich postnatal environment induces cardiomyocyte cell-cycle arrest through DNA damage response. *Cell* 157 (2014) 565–579. doi: 10.1016/j.cell.2014.03.032.
- [852] A.J. Patterson, L. Zhang. Hypoxia and fetal heart development. *Curr Mol Med* 10 (2010) 653–666. doi: 10.2174/156652410792630643.
- [853] M.C. Brahim-Horn, J. Pouysségur. Oxygen, a source of life and stress. *FEBS Lett* 581 (2007) 3582–3591. doi: 10.1016/j.febslet.2007.06.018.
- [854] C. Mas-Bargues, J. Sanz-Ros, A. Román-Domínguez, M. Inglés, L. Gimeno-Mallench, M. El Alami, J. Viña-Almunia, J. Gambini, J. Viña, C. Borrás. Relevance of oxygen concentration in stem cell culture for regenerative medicine. *Int J Mol Sci* 20 (2019). doi: 10.3390/ijms20051195.
- [855] G.W. Miller, J.P. 3rd Mugler, T.A. Altes, J. Cai, J.F. Mata, E.E. de Lange, W.A. Tobias, G.D. Cates, J.R. Brookeman. A short-breath-hold technique for lung pO₂ mapping with ³He MRI. *Magn Reson Med* 63 (2010) 127–136. doi: 10.1002/mrm.22181.
- [856] D.M. Hirai, T.D. Colburn, J.C. Craig, K. Hotta, Y. Kano, T.I. Musch, D.C. Poole. Skeletal muscle interstitial O₂ pressures: bridging the gap between the capillary and myocyte. *Microcirculation* 26 (2019) e12497. doi: 10.1111/micc.12497.
- [857] W.J. Whalen, P. Nair, D. Buerk, C.A. Thuning. Tissue PO₂ in normal and denervated cat skeletal muscle. *Am J Physiol* 227 (1974) 1221–1225. doi: 10.1152/ajplegacy.1974.227.6.1221.
- [858] M. Erecińska, I.A. Silver. Tissue oxygen tension and brain sensitivity to hypoxia. *Respir Physiol* 128 (2001) 263–276. doi: 10.1016/s0034-5687(01)00306-1.
- [859] J. Dings, J. Meixensberger, A. Jäger, K. Roosen. Clinical experience with 118 brain tissue oxygen partial pressure catheter probes. *Neurosurgery* 43 (1998) 1082–1095. doi: 10.1097/00006123-199811000-00045.
- [860] S. Sakadžić, E. Roussakis, M.A. Yaseen, E.T. Mandeville, V.J. Srinivasan, K. Arai, S. Ruvinskaya, A. Devor, E.H. Lo, S.A. Vinogradov, D.A. Boas. Two-photon high-resolution measurement of partial pressure of oxygen in cerebral vasculature and tissue. *Nat Methods* 7 (2010) 755–759. doi: 10.1038/nmeth.1490.
- [861] A. Mohyeldin, T. Garzón-Muvdi, A. Quiñones-Hinojosa. Oxygen in stem cell biology: a critical component of the stem cell niche. *Cell Stem Cell* 7 (2010) 150–161. doi: 10.1016/j.stem.2010.07.007.
- [862] J.A. Spencer, F. Ferraro, E. Roussakis, A. Klein, J. Wu, J.M. Runnels, W. Zaher, L.J. Mortensen, C. Alt, R. Turcotte, R. Yusuf, D. Côté, S.A. Vinogradov, D.T. Scadden, C.P. Lin. Direct measurement of local oxygen concentration in the bone marrow of live animals. *Nature* 508 (2014) 269–273. doi: 10.1038/nature13034.
- [863] C. Michiels. Physiological and pathological responses to hypoxia. *Am J Pathol* 164 (2004) 1875–1882. doi: 10.1016/S0002-9440(10)63747-9.
- [864] K.J. Dunham-Snary, D. Wu, E.A. Sykes, A. Thakrar, L.R.G. Parlow, J.D. Mewburn, J.L. Parlow, S.L. Archer. Hypoxic pulmonary vasoconstriction: from molecular mechanisms to medicine. *Chest* 151 (2017) 181–192. doi: 10.1016/j.chest.2016.09.001.
- [865] V.H. Haase. Regulation of erythropoiesis by hypoxia-inducible factors. *Blood Rev* 27 (2013) 41–53. doi: 10.1016/j.blre.2012.12.003.
- [866] B.L. Krock, N. Skuli, M.C. Simon. Hypoxia-induced angiogenesis: good and evil. *Genes Cancer* 2 (2011) 1117–1133. doi: 10.1177/1947601911423654.
- [867] S. Kulandavelu, W. Balkan, J.M. Hare. Regulation of oxygen delivery to the body via hypoxic vasodilation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 112 (2015) 6254–6255. doi: 10.1073/pnas.1506523112.
- [868] K. Uluç, A. Miranpuri, G. C. Kujoth, E. Aktüre, M. K Başkaya. Focal cerebral ischemia model by endovascular suture occlusion of the middle cerebral artery in the rat. *J Vis Exp* 5 (2011) 1978. doi: 10.3791/1978.

- [869] E.Z. Longa, P.R. Weinstein, S. Carlson, R. Cummins. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats. *Stroke* 20 (1989) 84–91. doi: 10.1161/01.str.20.1.84.
- [870] F. Tian, K. Deguchi, T. Yamashita, Y. Ohta, N. Morimoto, J. Shang, X. Zhang, N. Liu, Y. Ikeda, T. Matsuura, K. Abe. In vivo imaging of autophagy in a mouse stroke model. *Autophagy* 6 (2010) 1107–1114. doi: 10.4161/auto.6.8.13427.
- [871] R. Ni, M. Vaas, W. Ren, J. Klohs. Noninvasive detection of acute cerebral hypoxia and subsequent matrix-metalloproteinase activity in a mouse model of cerebral ischemia using multispectral-optoacoustic-tomography. *Neurophotonics* 5 (2018) 015005. doi: 10.1117/1.NPh.5.1.015005.
- [872] L.M. Palmer, G.J. Stuart. Membrane potential changes in dendritic spines during action potentials and synaptic input. *J Neurosci* 29 (2009) 6897–6903. doi: 10.1523/JNEUROSCI.5847-08.2009.
- [873] C. Stosiek, O. Garaschuk, K. Holthoff, A. Konnerth. In vivo two-photon calcium imaging of neuronal networks. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100 (2003) 7319–7324. doi: 10.1073/pnas.1232232100.
- [874] S. Witte, A. Negrean, J.C. Lodder, C.P.J. de Kock, G. Testa Silva, H.D. Mansvelder, M. Louise Groot. Label-free live brain imaging and targeted patching with third-harmonic generation microscopy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108 (2011) 5970–5975. doi: 10.1073/pnas.1018743108.
- [875] B.A. Flusberg, A. Nimmerjahn, E.D. Cocker, E.A. Mukamel, R.P.J. Barretto, T.H. Ko, L.D. Burns, J.C. Jung, M.J. Schnitzer. High-speed, miniaturized fluorescence microscopy in freely moving mice. *Nat Methods* 5 (2008) 935–938. doi: 10.1038/nmeth.1256.
- [876] A. de Groot, B.J. van den Boom, R.M. van Genderen, J. Coppens, J. van Veldhuijzen, J. Bos, H. Hoedemaker, M. Negrello, I. Willuhn, C.I. De Zeeuw, T.M. Hoogland. NINscope, a versatile miniscope for multi-region circuit investigations. *Elife* 9 (2020) e49987. doi: 10.7554/eLife.49987.
- [877] S. Rehncrona, I. Rosén, B.K. Siesjö. Brain lactic acidosis and ischemic cell damage: 1. Biochemistry and neurophysiology. *J Cereb Blood Flow Metab* 1 (1981) 297–311. doi: 10.1038/jcbfm.1981.34.
- [878] X. Sun, Y. Wang, S. Chen, W. Luo, P. Li, Q. Luo. Simultaneous monitoring of intracellular pH changes and hemodynamic response during cortical spreading depression by fluorescence-corrected multimodal optical imaging. *Neuroimage* 57 (2011) 873–884. doi: 10.1016/j.neuroimage.2011.05.040.
- [879] B. Bo, Y. Li, W. Li, Y. Wang, S. Tong. Optogenetic translocation of protons out of penumbral neurons is protective in a rodent model of focal cerebral ischemia. *Brain Stimul* 13 (2020) 881–890. doi: 10.1016/j.brs.2020.03.008.
- [880] M. Senda, N.M. Alpert, B.C. Mackay, R.B. Buxton, J.A. Correia, S.B. Weise, R.H. Ackerman, D. Dorer, F.S. Buonanno. Evaluation of the $^{11}\text{C}\text{CO}_2$ positron emission tomographic method for measuring brain pH. II. Quantitative pH mapping in patients with ischemic cerebrovascular diseases. *J Cereb Blood Flow Metab* 9 (1989) 859–873. doi: 10.1038/jcbfm.1989.120.
- [881] K.E. Henry, A.M. Chaney, V.L. Nagle, H.C. Cropper, S. Mozaffari, G. Slaybaugh, K. Parang, O.A. Andreev, Y.K. Reshetnyak, M.L. James, J.S. Lewis. Demarcation of sepsis-induced peripheral and central acidosis with pH (Low) insertion cycle peptide. *J Nucl Med* 61 (2020) 1361–1368. doi: 10.2967/jnumed.119.233072.
- [882] L. Yu, Y. Chen, M. Chen, X. Luo, S. Jiang, Y. Zhang, H. Chen, T. Gong, J. Zhou, C. Li. Amide proton transfer MRI signal as a surrogate biomarker of ischemic stroke recovery in patients with supportive treatment. *Front Neurol* 10 (2019) 104. doi: 10.3389/fneur.2019.00104.
- [883] G.W.J. Harston, Y.K. Tee, N. Blockley, T.W. Okell, S. Thandeswaran, G. Shaya, F. Sheerin, M. Cellerini, S. Payne, P. Jezzard, M. Chappell, J. Kennedy. Identifying the ischaemic

- penumbra using pH-weighted magnetic resonance imaging. *Brain* 138 (2015) 36–42. doi: 10.1093/brain/awu374.
- [884] J. Zhou, J.-F. Payen, D.A. Wilson, R.J. Traystman, P.C.M. van Zijl. Using the amide proton signals of intracellular proteins and peptides to detect pH effects in MRI. *Nat Med* 9 (2003) 1085–1090. doi: 10.1038/nm907.
- [885] A. Almeida, D. Jimenez-Blasco, J.P. Bolaños. Cross-talk between energy and redox metabolism in astrocyte-neuron functional cooperation. *Essays Biochem* 67 (2023) 17–26. doi: 10.1042/EBC20220075.
- [886] K.H. Lee, M. Cha, B.H. Lee. Crosstalk between neuron and glial cells in oxidative injury and neuroprotection. *Int J Mol Sci* 22 (2021). doi: 10.3390/ijms222413315.
- [887] P.S. Baxter, G.E. Hardingham. Adaptive regulation of the brain's antioxidant defences by neurons and astrocytes. *Free Radic Biol Med* 100 (2016) 147–152. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2016.06.027.
- [888] C. Djupsjö, J. Kuhl, T. Andersson, M. Lundbäck, M.J. Holzmann, T. Nyström. Admission glucose as a prognostic marker for all-cause mortality and cardiovascular disease. *Cardiovasc Diabetol* 21 (2022) 258. doi: 10.1186/s12933-022-01699-y.
- [889] H. Kamada, F. Yu, C. Nito, P.H. Chan. Influence of hyperglycemia on oxidative stress and matrix metalloproteinase-9 activation after focal cerebral ischemia/reperfusion in rats: relation to blood-brain barrier dysfunction. *Stroke* 38 (2007) 1044–1049. doi: 10.1161/01.STR.0000258041.75739.cb.
- [890] C. Bémeur, L. Ste-Marie, J. Montgomery. Increased oxidative stress during hyperglycemic cerebral ischemia. *Neurochem Int* 50 (2007) 890–904. doi: 10.1016/j.neuint.2007.03.002.
- [891] S.W. Suh, B.S. Shin, H. Ma, M. Van Hoecke, A.M. Brennan, M.A. Yenari, R.A. Swanson. Glucose and NADPH oxidase drive neuronal superoxide formation in stroke. *Ann Neurol* 64 (2008) 654–663. doi: 10.1002/ana.21511.
- [892] I. Kusaka, G. Kusaka, C. Zhou, M. Ishikawa, A. Nanda, D.N. Granger, J.H. Zhang, J. Tang. Role of AT1 receptors and NAD(P)H oxidase in diabetes-aggravated ischemic brain injury. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 286 (2004) H2442–2451. doi: 10.1152/ajpheart.01169.2003.
- [893] T. Inoguchi, P. Li, F. Umeda, H.Y. Yu, M. Kakimoto, M. Imamura, T. Aoki, T. Etoh, T. Hashimoto, M. Naruse, H. Sano, H. Utsumi, H. Nawata. High glucose level and free fatty acid stimulate reactive oxygen species production through protein kinase C--dependent activation of NAD(P)H oxidase in cultured vascular cells. *Diabetes* 49 (2000) 1939–1945. doi: 10.2337/diabetes.49.11.1939.
- [894] F. Cosentino, M. Eto, P. De Paolis, B. van der Loo, M. Bachschmid, V. Ullrich, A. Kouroedov, C. Delli Gatti, H. Joch, M. Volpe, T.F. Lüscher. High glucose causes upregulation of cyclooxygenase-2 and alters prostanoid profile in human endothelial cells: role of protein kinase C and reactive oxygen species. *Circulation* 107 (2003) 1017–1023. doi: 10.1161/01.cir.0000051367.92927.07.
- [895] P. Liu, X. Yang, J. Niu, C. Hei. Hyperglycemia aggravates ischemic brain damage via ERK1/2 activated cell autophagy and mitochondrial fission. *Front Endocrinol (Lausanne)* 13 (2022) 928591. doi: 10.3389/fendo.2022.928591.
- [896] P.C. Schulze, J. Yoshioka, T. Takahashi, Z. He, G.L. King, R.T. Lee. Hyperglycemia promotes oxidative stress through inhibition of thioredoxin function by thioredoxin-interacting protein. *J Biol Chem* 279 (2004) 30369–30374. doi: 10.1074/jbc.M400549200.
- [897] P.-O. Koh. Hyperglycemia decreases preoxidized-2 expression in a middle cerebral artery occlusion model. *Lab Anim Res* 33 (2017) 98–104. doi: 10.5625/lar.2017.33.2.98.
- [898] W.H. Koppenol. The basic chemistry of nitrogen monoxide and peroxyxynitrite. *Free Radic Biol Med* 25 (1998) 385–391. doi: 10.1016/s0891-5849(98)00093-8.
- [899] N. Fukuyama, S. Takizawa, H. Ishida, K. Hoshiai, Y. Shinohara, H. Nakazawa. Peroxyxynitrite formation in focal cerebral ischemia-reperfusion in rats occurs predominantly in the peri-

- infarct region. *J Cereb Blood Flow Metab* 18 (1998) 123–129. doi: 10.1097/00004647-199802000-00001.
- [900] M.P. Mattson. Roles of the lipid peroxidation product 4-hydroxynonenal in obesity, the metabolic syndrome, and associated vascular and neurodegenerative disorders. *Exp Gerontol* 44 (2009) 625–633. doi: 10.1016/j.exger.2009.07.003.
- [901] M. Kuss, A.J. Crawford, O.A. Alimi, M.A. Hollingsworth, B. Duan. Three-dimensional printed abdominal imaging windows for in vivo imaging of deep-lying tissues. *Machines* 10 (2022), 697. doi: 10.3390/machines10080697.
- [902] R. Matsuura, S. Miyagawa, S. Fukushima, T. Goto, A. Harada, Y. Shimosaki, K. Yamaki, S. Sanami, J. Kikuta, M. Ishii, Y. Sawa. Intravital imaging with two-photon microscopy reveals cellular dynamics in the ischemia-reperfused rat heart. *Sci Rep* 8 (2018) 15991. doi: 10.1038/s41598-018-34295-w.
- [903] J.S. Jones, D.M. Small, N. Nishimura. In vivo calcium imaging of cardiomyocytes in the beating mouse heart with multiphoton microscopy. *Front Physiol* 9 (2018) 969. doi: 10.3389/fphys.2018.00969.
- [904] K.A. Lukyanov, V.V. Belousov. Genetically encoded fluorescent redox sensors, *Biochim Biophys Acta* 1840 (2014) 745–756. doi: 10.1016/j.bbagen.2013.05.030.
- [905] Y. Pang, H. Zhang, H. Ai. Genetically encoded fluorescent redox indicators for unveiling redox signaling and oxidative toxicity. *Chem Res Toxicol* 34 (2021) 1826–1845. doi: 10.1021/acs.chemrestox.1c00149.

БЛАГОДАРНОСТИ

Я работаю в одной из сильнейших и слаженных научных команд нашей страны. Технологии и исследования, которые я представляю в этой работе, являются результатом многолетнего упорного и очень интересного труда огромного коллектива. Я горячо благодарю всех моих коллег на всех этапах пути, с кем делали первые шаги и с кем продолжаем достигать новых горизонтов. В особенности я благодарю Александра Костюка, Илью Кельмансона, Дарью Котову, Арину Шохину, Александру Иванову, Анастасию Панову, Анастасию Сергееву, Юлию Храмову, Александру Кокову, Веронику Катруху, Викторину Чебаненко, Диану Рапоту, Юлию Ермакову, Валерия Пака, Елену Фетисову.

Я благодарю коллектив лаборатории фотоники и нелинейный спектроскопии физического факультета МГУ им. Ломоносова А.М. Желтикова, И.В. Федотова, А.А. Ланина, А.Б. Федотова, М. Почечуева, А. Чеботарева, М. Солотенкова, Е. Степанова за долгие годы плодотворной работы, за их светлые идеи и технические возможности, которые позволяют проводить исследования на уровне сложных систем *in vivo*. Огромное спасибо Н.А. Браже и ее команде (МГУ, ИБХ) за высочайший профессионализм в области Рамановской микроспектроскопии, за теплую и интересную атмосферу в совместных экспериментах и просто в общении. Огромное спасибо А. Мощенко (ФЦМН), наши *in vivo* эксперименты реализованы во многом благодаря доставке генов биосенсоров в живые системы с помощью AAV частиц, которые он производит в высоком качестве. Я благодарен Joris Messens и Maria-Armineh Tossounian из Vrije Universiteit Brussel (Бельгия) за их помощь в исследовании свойств биосенсора Hupocrates, а также Sophie Vrız и Marion Thauvin из Collège de France (Франция) – они очень многому нас научили в работе с объектом *Danio rerio*, с которым мы продолжаем работать в ИБХ. Благодарю всех соавторов совместных публикаций за исследования, помощь и советы, хочется отметить А.В. Семьянова и его коллектив (ИБХ), А. Гороховатского (ИБХ), М. Баранова (ИБХ), Н. Мишину (ИБХ), Д. Староверова (ИБХ), А.Г. Катруху (МГУ), Д. Серебряную (МГУ), П.М. Балабана (ИВНД), А. Бородинову (ИВНД), В.С. Тарабыкина (Charitre), В.А. Олейникова (ИБХ), DM Katschinski (University of Göttingen), D Ezeriņa (Un.Brussel).

Я благодарю сотрудников отдела метаболизма и редокс-биологии ИБХ РАН за вклад каждого в поддержание духа сплоченной команды. Лично благодарю руководителя группы редокс-биологии Подгорного Олега за дискуссии о науке и жизни, за товарищество и вклад в развитие нашего отдела.

Спасибо моим учителям Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова за неугасимый интерес к познанию.

Отдельную признательность я выражаю моему учителю Белоусову Всеволоду Вадимовичу за то, что научил двигаться вперед в любых условиях, ставить и реализовывать самые смелые цели.

Я могу плодотворно работать, потому что рядом моя замечательная семья. Спасибо моим родителям за теплоту и участие, брату за веселый настрой всегда и везде. Спасибо моим детям и моей супруге за ежедневное вдохновение и радость, за помощь и поддержку.