

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
ИНСТИТУТ БИООРГАНИЧЕСКОЙ ХИМИИ
им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова
Российской академии наук
(ИБХ РАН)

На правах рукописи

Шохина Арина Геннадиевна

ГЕНЕТИЧЕСКИ КОДИРУЕМЫЙ ИНДИКАТОР ДЛЯ
РЕГИСТРАЦИИ РЕДОКС-СТАТУСА ПУЛА ГЛУТАТИОНА НА
ОСНОВЕ КРАСНОГО ФЛУОРЕСЦЕНТНОГО БЕЛКА mCHERRY

03.01.03 Молекулярная биология

Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук

Научный руководитель:
к.б.н. Билан Дмитрий Сергеевич

Москва – 2019

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	5
1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	8
1.1 Глутатион – общие сведения	8
1.2 Синтез и деградация	9
1.3 Транспорт и компартментализация	11
1.3.1 Глутатион в митохондриях	11
1.3.2 Глутатион в ядре	12
1.3.3 Глутатион в ЭПР	12
1.3.4 Глутатион в пероксисомах	14
1.4 Глутатион и его аналоги в бактериях	14
1.5 Спектр функций глутатиона	15
1.5.1 Глутатион в реакциях неэнзиматического характера	15
1.5.2 Клеточные системы антиоксидантной защиты и роль глутатиона в них	16
1.5.3 Глутатион-опосредованный NO-сигналинг	27
1.5.4 Конъюгаты глутатиона как элемент детоксификации	27
1.5.5 Глутатионилирование как механизм защиты и регуляции клеточных белков	28
1.5.6 Депонирование цистеина	29
1.6 Инструменты для изучения редокс-статуса пула глутатиона	29
1.6.1 Синтетические красители	29
1.6.2 Флуоресцентные белки и генетически кодируемые биосенсоры на их основе	32
1.6.2.а Флуоресцентные белки – общие сведения	32
1.6.2.б Красные флуоресцентные белки	35
1.6.2.в Основные подходы создания сенсорных конструкций на основе флуоресцентных белков	39
1.6.2.г Генетически кодируемые флуоресцентные биосенсоры для регистрации редокс-состояния пула глутатиона	43
1.6.2.д Индикаторы глутатиона для компартментов с высоким редокс-потенциалом	47
1.6.2.е Красные флуоресцентные редокс-индикаторы	49
2. ЦЕЛИ И ЗАДАЧИ	53
3. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	54
3.1 Молекулярно-биологические методы	54
3.1.1 Амплификация ДНК	54
3.1.2 Электрофорез в агарозном геле	54
3.1.3 Выделение ДНК из агарозного геля	54
3.1.4 Рестрикция	54
3.1.5 Лигирование	55
3.1.6 Выделение плазмидной ДНК	55
3.2 Работа с препаратом очищенного белка	55

3.2.1	Получение препарата очищенного белка	55
3.2.2	Определение спектральных характеристик.....	56
3.2.3	Определение pH-чувствительности	57
3.2.4	Оценка чувствительности к GSH.....	57
3.2.5	Оценка специфичности.....	58
3.2.6	Оценка окислительно-восстановительного потенциала	58
3.3	Работа с бактериальными клетками.....	59
3.3.1	Трансформация бактерий.....	59
3.3.2	Анализ флуоресценции суспензий бактериальных клеток	60
3.4	Работа с эукариотическими клетками	60
3.4.1	Ведение культур эукариотических клеток	60
3.4.2	Получение смешанной культуры мышинных первичных эмбриональных кортикальных нейронов.....	60
3.4.3	Временная трансфекция.....	61
3.4.4	Проточная цитометрия	61
3.5	Работа с <i>D. rerio</i>	62
3.5.1	Ведение рыб <i>D. rerio</i>	62
3.5.2	Временная трансфекция и микроинъекции эмбрионов.....	62
3.6	Флуоресцентная микроскопия	62
3.6.1	Микроскопия клеток эукариотических культур.....	62
3.6.2	Неспецифическое окисление внутриклеточного пула глутатиона.....	63
3.6.3	Модуляция ответа клеток на окислительный стресс с помощью DMF.....	63
3.6.4	Стимуляция контролируемой генерации пероксида водорода	63
3.6.5	Модель гипоксии-реоксигенации.....	63
3.6.6	Микроскопия <i>D. rerio</i>	64
4.	РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ	65
4.1	Создание молекулярно-генетической конструкции Grx1-roCherry	65
4.2	Определение характеристик Grx1-roCherry in vitro.....	68
4.2.1	Спектральные характеристики Grx1-roCherry и функциональные тесты <i>in vitro</i>	68
4.2.2	Оценка специфичности Grx1-roCherry	70
4.2.3	Оценка окислительно-восстановительного потенциала Grx1-roCherry	72
4.3	Исследование динамики соотношения 2GSH/GSSG в разных эукариотических системах с помощью биосенсора Grx1-roCherry.....	76
4.3.1	Модуляция окислительного стресса клеток путем воздействия на редокс-статус пула глутатиона	77
4.3.2	Исследование динамики соотношения 2GSH/GSSG в модели гипоксии/реоксигенации	80
4.3.3	Изменения редокс-статуса опухолевых клеток при переключении метаболизма	81
4.3.4	Динамика 2GSH/GSSG при контролируемой генерации H ₂ O ₂ в цитоплазме и митохондриях клеток разного типа	84
4.3.5	Grx1-roCherry в тканях модельного объекта <i>D. rerio</i>	88
5.	ВЫВОДЫ	90
6.	ЗАКЛЮЧЕНИЕ	91

7. СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	93
8. СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	96

ВВЕДЕНИЕ

Редокс-биология изучает механизмы клеточной регуляции, основанные на окислительно-восстановительных процессах. Каждая живая клетка обладает характерным редокс-статусом, который изменяется в силу естественных или патологических причин. Поддержанием внутриклеточного гомеостаза редокс-статуса занимаются специализированные ферментативные системы при участии так называемых редокс-пар. Редокс-пары представляют собой соединения, которые присутствуют в клетках одновременно в окисленном и восстановленном состояниях. Некоторые из таких соединений универсальны, поскольку участвуют в разнообразных биохимических реакциях. Ключевыми редокс-парами являются окисленный/восстановленный глутатион (GSSG/2GSH), НАД (НАД⁺/НАДН) и НАДФ (НАДФ⁺/НАДФН). Изменение редокс-статуса в клетке приводит к сдвигу соотношения между окисленным и восстановленным компонентами в таких парах. Таким образом, изменения перечисленных редокс-параметров служат маркером, который динамично отражает текущее состояние клетки. Регистрация подобных изменений может быть как ключом к пониманию молекулярной природы некоторых фундаментальных процессов, так и послужить основой для разработок специализированных подходов исследований, в том числе для скрининга лекарственных препаратов.

Исследование реакций тиол-дисульфидного обмена является одной из важнейших задач в редокс-биологии, поскольку обратимое формирование межмолекулярных и внутренних дисульфидных связей представляет собой один из главных механизмов регуляции функций белков. Глутатион присутствует в клетках в высоких концентрациях и служит восстанавливающим агентом внутриклеточной среды, поддерживая в восстановленном состоянии большинство тиоловых групп. Восстановленный пул самого глутатиона поддерживается благодаря работе НАДФН-зависимых глутатионредуктаз. Традиционным подходом исследования такого параметра, как соотношение GSSG/2GSH, является использование химических красителей. Однако существенный прорыв в изучении процессов, сопряженных с реакциями тиол-дисульфидного обмена, произошел с появлением генетически кодируемых биосенсоров на базе флуоресцентных белков.

В настоящий момент генетически кодируемые флуоресцентные биосенсоры представляют собой надежный инструментальный для исследования клеточных редокс-процессов. В некоторых случаях, например, при регистрации короткоживущих высоко реакционноспособных соединений, данный подход не имеет альтернатив. Индикаторы такого рода позволяют регистрировать изменения редокс-статуса в живых системах любого уровня сложности в режиме реального времени. Биосенсор такого типа

представляет собой белковую молекулу, состоящую, как правило, из сенсорного и флуоресцентного доменов. Сенсорный домен осуществляет взаимодействие с интересующим соединением или клеточным параметром, а флуоресцентный белок позволяет визуализировать это взаимодействие. К настоящему времени разработана обширная коллекция флуоресцентных биосенсоров, которые позволяют решать разнообразные задачи в медико-биологических исследованиях. В частности, получены биосенсоры для регистрации динамики изменения соотношения ключевых редокс-пар. Для визуализации изменений редокс-состояния пула глутатиона широкую популярность в мировой практике получили так называемые редокс-чувствительные флуоресцентные белки. Принцип их создания основан на том, что в структуру флуоресцентного белка в пространственно близкие положения вводится пара аминокислотных остатков цистеина, которые могут обратимо формировать дисульфидную связь. Полученный белок становится вовлеченным в реакции тиол-дисульфидного обмена исследуемой системы. Формирование дисульфидной связи в структуре белка и ее обратимое восстановление в зависимости от редокс-состояния пула глутатиона приводит к конформационным изменениям в области хромофорного окружения. Таким образом, окисленное и восстановленное состояния такого белка различаются спектрально, а изменение флуоресцентного сигнала отражает динамику изменения редокс-статуса исследуемого объекта.

Значительная часть существующих в настоящий момент биосенсоров, в том числе для регистрации GSSG/2GSH, флуоресцирует в зеленой области спектра. Однако расширение цветовой палитры биосенсоров представляется перспективной задачей. Спектрально различающиеся версии индикатора можно использовать совместно в пределах одной системы. Такие мультипараметрические исследования являются более информативными, поскольку позволяют осуществлять мониторинг исследуемого параметра одновременно в нескольких компартментах одной и той же клетки или в разных типах клеток тканей трансгенного организма. Помимо этого, биосенсоры на основе красных флуоресцентных белков обладают рядом преимуществ для использования в системах *in vivo*. Для возбуждения эмиссии зеленых флуоресцентных белков необходимо использовать коротковолновый свет, который способен вызывать необратимые повреждения живых образцов. Свет с большей длиной волны, применяемый для возбуждения флуоресценции красных белков, менее токсичен для клеток. Кроме того, аутофлуоресценция биологических объектов в красном канале регистрации флуоресценции значительно ниже по сравнению с зеленым.

Результатом настоящей работы является создание нового редокс-биосенсора Gtx1-roCherry для регистрации соотношения GSSG/2GSH на основе красного флуоресцентного белка mCherry. Биосенсор Gtx1-roCherry характеризуется высокой яркостью и повышенной стабильностью сигнала к изменениям pH в физиологическом диапазоне. Биосенсор был детально охарактеризован *in vitro*, а также протестирован в культуре живых клеток в режиме мультипараметрической микроскопии при совместном использовании со спектрально различающимися биосенсорами других типов. Gtx1-roCherry в сочетании с имеющимися биосенсорами позволяет осуществлять мониторинг редокс-состояния пула глутатитона одновременно в нескольких компартментах живых клеток в режиме реального времени.

1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Глутатион – общие сведения

Глутатион, или GSH, представляет собой трипептид, в состав которого входят аминокислотные остатки глутамата, цистеина и глицина (рис. 1). Глутатион не токсичен, устойчив [1] по сравнению, например, с цистеином и служит в клетке своеобразным редокс-буфером, основная роль которого заключается в поддержании тиол-дисульфидного окислительно-восстановительного потенциала.

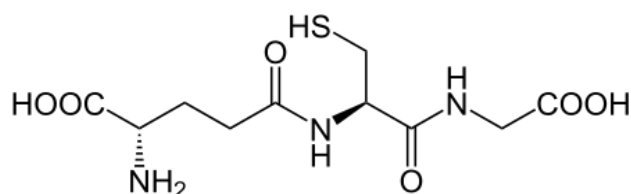
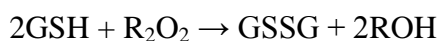


Рис. 1. Структура молекулы восстановленного глутатиона (GSH).

У животных и растений глутатион является самым представленным низкомолекулярным соединением, содержащим SH-группу [2]. В клетке глутатион существует в нескольких формах, самая распространенная из которых – восстановленный глутатион, собственно, GSH. В цитоплазме некоторых животных клеток его концентрация может достигать 10 мМ [3]. Высокая концентрация GSH позволяет поддерживать практически все тиоловые группы клеточных белков в восстановленном состоянии. Вторая по распространенности форма – дисульфид глутатиона, GSSG, являющийся продуктом неферментативного окисления GSH:



В дальнейшем для простоты будем именовать GSSG «окисленный глутатион». Однако следует отметить, что в ходе окисления GSH помимо GSSG образуются также и некоторые минорные формы, например, сульфинаты (GSOOH). Некоторая часть глутатиона присутствует в клетке в связанном виде в составе смешанных дисульфидов (GSSR) с самыми разнообразными внутриклеточными белками. Наконец, метаболизм некоторых ксенобиотиков предполагает формирование их конъюгатов с глутатионом (подробнее далее), которые, однако, быстро деградируют.

Под клеточным пулом глутатиона принято понимать совокупность его основных несвязанных с белками форм, GSH и GSSG. Их концентрации находятся в динамическом равновесии и меняются под действием разнообразных факторов, как внутренних, так и внешних. Соотношение 2GSH/GSSG – общепринятый маркер, отражающий состояние

клетки, ее редокс-статус. Так, в норме 2GSH/GSSG составляет в среднем 100/1, но в результате окислительного стресса может уменьшаться вплоть до 1/1 [4]. 2GSH/GSSG является основной редокс-парой, определяющей способность клетки сопротивляться окислительному стрессу.

1.2 Синтез и деградация

Основная часть глутатиона в клетке синтезируется *de novo*, этот процесс АДФ-зависим и происходит в цитоплазме, в два этапа:

1. L-глутамат + L-цистеин + АДФ \rightarrow γ -глутамил-L-цистеин + АДФ + P_i
2. γ -глутамил-L-цистеин + L-глицин + АДФ \rightarrow GSH + АДФ + P_i

На первом этапе посредством γ -глутамилцистеинсинтетазы образуется связь между остатками глутамата и цистеина. Эта связь нетипичная, поскольку формируется между аминогруппой цистеина и карбоксильной группой боковой цепи глутамата и не может быть разрушена обычными пептидазами. На втором этапе синтеза глутатиона глутатионсинтетаза присоединяет остаток глицина к С-концу полученного ранее дипептида [5]. Нарушения в работе γ -глутамилцистеинсинтетазы имеют тяжелые последствия, и у взрослых пациентов их регистрируют крайне редко. Мыши *GCLC-null*, нокаутные по гену GCLC, кодирующему одну из двух субъединиц γ -глутамилцистеинсинтетазы, нежизнеспособны и погибают на ранних этапах эмбриогенеза [6]. Нокаут гена GCLM, который кодирует вторую субъединицу фермента, менее критичен – животные выживают, однако их клетки крайне чувствительны к разнообразным окислителям [7][8][9][10]. Состояния, ассоциированные с недостаточностью глутатионсинтетазы, в клинической практике встречаются чаще. У таких пациентов наблюдают 5-оксопролинурию (5-оксопролин - один из возможных прекурсоров глутатиона в синтезе *de novo*), гемолитическую анемию и неврологические нарушения [11][12].

Вспомогательным способом образования глутатиона можно считать его рециклизацию после окисления и в результате катаболизма. Основным ферментом, поддерживающим редокс-гомеостаз глутатиона, является НАДФ-зависимая глутатионредуктаза (GR). Именно благодаря активности данного фермента значительная доля глутатиона во внутриклеточном пуле поддерживается в восстановленном состоянии.

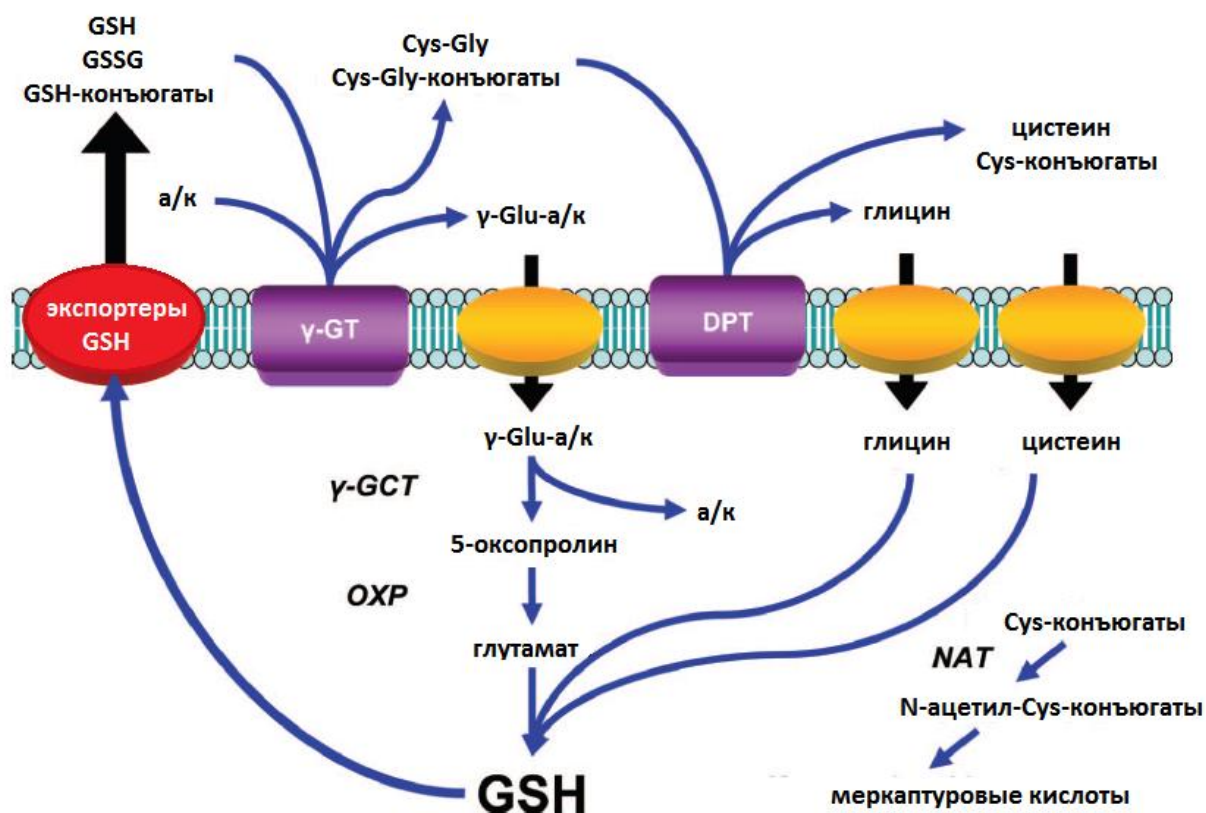


Рис. 2. Пути катаболизма глутатиона в клетке.

Метаболизм глутатиона опосредован γ -глутамилтранспептидазой (γ -GT), которая способна переносить γ -глутамил, отщепляя его от молекул глутатиона либо конъюгатов глутатиона и перенося на свободные аминокислотные остатки (а/к). Судьба продуктов данной реакции различна. Цистеинилглицин/конъюгат цистеинилглицина подвергается действию пептидаз (DPT) во внеклеточном пространстве. Полученные в результате свободные аминокислоты и цистеинил-конъюгаты захватываются клеткой: свободные аминокислотные остатки служат для дальнейшего синтеза глутатиона *de novo*, а цистеинил-конъюгаты ацетируются N-ацетилтрансферазами (NAT), образуя меркаптуровые кислоты. В то время как второй продукт γ -глутамилтранспептидазы – γ -глутамил, связанный со свободным аминокислотным остатком (γ -Glu-а/к), импортируется в цитоплазму и претерпевает ряд превращений при участии γ -глутамилциклотрансферазы (γ -GCT) и 5-оксипролиназы (OXP), в конечном счете приводящим к получению глутамата, который также может быть вновь использован в синтезе глутатиона *de novo*. Из [13] с изменениями.

Катаболизм глутатиона протекает во внеклеточной среде (рис. 2). Ключевую роль в этом процессе играет мембранный фермент γ -глутамилтранспептидаза (γ -GT), которая экспрессируется преимущественно на апикальной поверхности клеток [14]. В результате

функционального цикла γ -GT в молекуле глутатиона разрушается нетипичная связь между остатком глутамата и цистеина [3], после чего глутамил переносится на другой акцептор (аминокислоту или дипептид [15][16]), а цистеинилглицин высвобождается во внеклеточное пространство, где разрушается пептидазами [17]. Следует отметить, что γ -GT способна метаболизировать не только сам глутатион, но и различные его конъюгаты [13]. Все продукты функциональной активности γ -GT могут быть импортированы в клетку специализированными транспортерами и использованы для синтеза глутатиона *de novo* [18].

1.3 Транспорт и компартментализация

Большая часть глутатиона эукариот (85-90%) сконцентрирована в цитозоле [19], однако он присутствует также и в других клеточных компартментах: в матриксе ядра, митохондриях, эндоплазматическом ретикулуме и пероксисомах [20].

1.3.1 Глутатион в митохондриях

Так как молекула глутатиона несет отрицательный заряд, она не может беспрепятственно пересекать клеточную мембрану – ее транспорт через липидный бислой осуществляют переносчики или каналы. В межмембранное пространство митохондрий глутатион, как и прочие молекулы менее 5 кДа, попадает через порины, преимущественно Por1, расположенные на внешней мембране [21]. В настоящий момент считается, что пул глутатиона межмембранного пространства митохондрий и цитоплазматический находятся в динамическом равновесии. Соотношение 2GSH/GSSG в обоих опосредовано активностью цитоплазматической глутатионредуктазы, поскольку в межмембранном пространстве митохондрий подобных ферментов нет, и избыток GSSG оттуда оттекает в цитозоль [21]. Напротив, пул глутатиона в матриксе митохондрий в значительной степени обособлен от цитоплазматического. Среди белков, участвующих в транспорте GSH через внутреннюю мембрану митохондрий, называют DIC Slc25a10 и OGC Slc25a11, относящиеся к семействам дикарбоксилатного и 2-оксоглутаратного переносчиков [22]. При их ингибировании, однако, не наблюдали полной блокировки импорта GSH, что свидетельствует в пользу существования и других переносчиков [23]. В настоящий момент участие дикарбоксилатной и 2-оксоглутаратной систем транспорта в трансмембранном переносе глутатиона оспаривают [24], а вопрос механизма данного переноса остается открытым.

1.3.2 Глутатион в ядре

Давно известно, что паттерн распределения GSH между ядром и цитоплазмой поддерживается активно [25] и является объектом тонкой регуляции в процессе пролиферации. Уровень GSH локально повышается в матриксе ядра во время G1 и S-фаз клеточного цикла [26], а сдвиги клеточного редокс-статуса в значительной степени обуславливают переходы между фазами [27]. Показано, что изменения окислительно-восстановительного потенциала глутатиона влияют на активность теломеразы [28][29][30], которая, в свою очередь, не только участвует в репликации ДНК, но и модулирует работу белков Id2 и E2F4, играющих критическую роль в регуляции клеточного цикла (показано на фибробластах 3T3) [31].

У животных среди предположительных участников транслокации глутатиона в матрикс ядра из цитоплазмы называют белок Vcl-2 [32][26], формирующий пору в ядерной мембране перед клеточным делением [33]. В пользу этого предположения говорит повышение уровня экспрессии Vcl-2 у пролиферирующих фибробластов 3T3 по сравнению с находящимися в покое [33]. Этот факт соотносят с данными о повышении уровня GSH в ядре во время S-фазы. Однако кроме того известно, что Vcl-2 опосредует транспорт глутатиона и в митохондриях, являясь партнером 2-оксоглутаратного переносчика [34], что также может быть причиной усиленной экспрессии данного белка в ходе клеточного деления. Каких-либо данных, напрямую подтверждающих участие Vcl-2 в импорте GSH в ядро, на настоящий момент нет, равно как и данных о других возможных белках-переносчиках.

1.3.3 Глутатион в ЭПР

Редокс-статус эндоплазматического ретикулума отличает его от остальных клеточных компартментов и в значительной степени определяет его роль в посттрансляционных модификациях синтезируемых там белков. Окислительно-восстановительный потенциал люмена ЭПР оценивают как значительно более «окисляющий» по сравнению с цитоплазматическим – известно, что соотношение 2GSH/GSSG в ЭПР меньше, чем в цитоплазме [35]. Довольно долгое время полагали, что именно из-за сравнительно высокой концентрации GSSG образование дисульфидных связей в молекулах белков в ЭПР облегчено [36]. Однако в настоящее время множество исследований свидетельствуют в пользу того, что GSSG не является окислителем белковых SH-групп в ЭПР напрямую, но влияет на активность соответствующих ферментативных комплексов (см. далее).

Ключевыми ферментами ЭПР, благодаря которым происходит формирование и изомеризация дисульфидных связей в белках, являются представители семейства PDI и тиолоксидаза Ero1 [37]. В структуре всех PDI содержится по два активных сайта с консервативной последовательностью CxxC [38]. Взаимодействие PDI с тиоловыми группами вновь синтезированных белков обуславливает реакции тиол-дисульфидного обмена между последними и цистеинами активных сайтов PDI. Причем в результате функционального цикла фермента возможно как образование дисульфидной связи в молекуле белка, так и ее изомеризация. Направление реакции зависит от состояния PDI – в случае, если цистеины ее активных сайтов предокислены, превалировать будет окисление тиоловых групп белка-субстрата. И наоборот, если редокс-чувствительные цистеины фермента восстановлены, его активность приведет к изомеризации дисульфидной связи в молекуле субстрата [39]. Изомеризации такого рода подвергаются связи, возникшие в результате ошибок сворачивания белковых глобул.

В результате тиолоксидазной активности PDI восстанавливается, и для ее рециклизации требуется окисление цистеинов в активных сайтах. Эту задачу в ЭПР выполняет несколько ферментов, среди которых Ero1 и Prxd4 [40][41]. Известно, что сама Ero1 окисляется O₂, при этом в качестве побочных продуктов могут образовываться АФК [42]. Следует отметить, на текущий момент общепринятым является мнение, что GSSG конкурирует с Ero1 при регуляции редокс-состояния PDI [43]. В этом и заключается основной вклад глутатиона в формирование нативных дисульфидных связей в синтезируемых белках в ЭПР: не являясь окислителем SH-групп напрямую, он влияет на активность PDI. Любопытно, что до сих пор нет достоверных данных о роли GSH. Предполагают, что GSH может служить редокс-буфером для АФК, образующихся при окислении Ero1 кислородом [37]. Также есть сведения, согласно которым GSH в ЭПР никак не модулирует тиолредуктазную активность PDI. Так, при избыточной экспрессии Chac1, деградирующей глутатион, концентрация GSH в ЭПР значительно снижается, однако, это не приводит к учащению мисфолдинга белков [44]. На основании этих данных сложно сделать сколь бы то ни было однозначные выводы, поскольку, как продукт функциональной активности Chac1, в клетке накапливается дипептид, который содержит редокс-чувствительный тиол и может компенсировать нехватку глутатиона.

Много вопросов также остается открытыми касательно того, каким образом поддерживается гомеостаз глутатиона в ЭПР, как устроен его транспорт в люмен из цитоплазмы и обратно. На текущий момент полагают, что из цитоплазмы в ЭПР глутатион переносится преимущественно в восстановленной форме посредством облегченного транспорта [45][46], при этом посредником является белок Sec61 [47]. Возможно, что в

условиях окислительного стресса избыток GSSG из ЭПР транслоцируется в цитоплазму, где восстанавливается с помощью НАДФН-зависимой глутатионредуктазы. Однако все перечисленные проблемы требуют дальнейшего детального изучения.

1.3.4 Глутатион в пероксисомах

Основными, общими среди всех типов организмов функциями пероксисом являются окисление жирных кислот и генерация/утилизация пероксида водорода. Нормальный каталитический цикл данных органелл приводит к образованию различных АФК и АФА [48]. Поэтому основная роль глутатиона в пероксисомах заключается в донорстве электронов различным ферментам, элиминирующим АФК/АФА и последствия их взаимодействия с белками.

Считается, что мембрана пероксисом млекопитающих проницаема для низкомолекулярных соединений менее 300 Да, поэтому GSH (но не GSSG) свободно диффундирует в них из цитоплазмы по градиенту концентрации. Также установлено, что избыток GSSG в пероксисомах млекопитающих элиминируется не с помощью специфической глутатион редуктазы, а транслоцируется в цитоплазму [49][50].

1.4 Глутатион и его аналоги в бактериях

Во всех эукариотических организмах, обладающих митохондриями и/или пластидами, присутствует глутатион. Обнаружен он также в циано-, протеобактериях и в некоторых штаммах грамм-положительных бактерий [51]. У прочих групп прокариот, у которых глутатион отсутствует, его роль, судя по всему, берут на себя другие низкомолекулярные тиолсодержащие вещества. Например, микотиол у актиномицетов [51], дипептид γ -глутамилцистеин у аэробных фототрофных галобактерий [52], амид глутатиона у анаэробных тиобактерий [53].

У бактерий, как и у эукариот, глутатион выполняет функцию редокс-буфера, поддерживающего окислительно-восстановительный потенциал, а также участвует в клеточном ответе на стресс в условиях закисления среды [54], осмотического шока [55] и воздействия хлоросодержащих токсичных веществ [56]. Модуляция активности бактериальных белков посредством глутатионилирования имеет место быть, хоть и не так распространена, как у эукариот. Например, у *E.coli* известно минимум два белка, функционирование которых во время окислительного стресса определено глутатионилированием – метионинсинтаза [57] и PAPS редуктаза [58]. Глутатионилирование приводит к тому, что оба фермента становятся функционально

неактивными (обратимо), однако, позволяет защитить их тиоловые группы от переокисления.

1.5 Спектр функций глутатиона

Окислительно-восстановительные реакции влияют на широкий круг клеточных процессов. Ранее ошибочно полагали, что окисление в клетке всегда в основе своей паталогической природы и приводит исключительно к нежелательным последствиям. Сейчас нет никаких сомнений, что редокс-модификации являются мощнейшим инструментом регуляции внутриклеточных событий как в отдельных микродоменах, так и на уровне клетки в целом. Несмотря на то, что изначально глутатион был описан, как восстанавливающий агент, быстро стало понятно, что этим его роль в клетке не ограничивается. Глутатион зачастую является ключевой молекулой во всем разнообразии клеточных процессов, ассоциированных с изменениями окислительно-восстановительного свойства – от редокс-сигналинга до метаболизма ксенобиотиков. Молекулярной основой, которая обуславливает особое место глутатиона в общей антиоксидантной системе клетки, является способность его тиоловой группы участвовать в формировании дисульфидной связи, глутатиил-радикала ($GS\cdot$), а также, реже – тио-/тиоловых эфиров ($GSR/ROSR$, соответственно) и S-нитрозоглутатиона ($GSNO$). Далее рассмотрим подробнее некоторые аспекты этих процессов.

1.5.1 Глутатион в реакциях неэнзиматического характера

Глутатион, благодаря наличию редокс-чувствительной тиоловой группы, по природе своей является восстановителем и способен выполнять протекторную функцию в клетке, напрямую реагируя с различными оксидантами и обезвреживая их. Например, с пероксидом водорода, гидроксил-радикалом, супероксид-анионом, пероксинитритом и пероксильными радикалами липидов. Однако, в силу того, что pK_a тиоловой группы глутатиона в клетке составляет около 8.5-8.8, эффективность такого прямого элиминирования оксидантов нельзя назвать высокой [59]. Гораздо выраженнее протекторная роль глутатиона раскрывается в реакциях, где он служит донором электронов специализированным ферментативным системам, поддерживающим редокс-гомеостаз (подробнее далее).

1.5.2 Клеточные системы антиоксидантной защиты и роль глутатиона в них

Неконтролируемая генерация свободных радикалов и так называемых «активных форм» неразрывно связана с генерализованным окислительным стрессом. Революционным стало открытие факта целенаправленного синтеза клеткой некоторых видов подобных короткоживущих, чрезвычайно реакционноспособных соединений для последующего использования в сигнальных каскадах. В зависимости от состава выделяют:

- активные формы кислорода (АФК) – супероксид-анион радикал (O_2^-), гидроксил-радикал ($\cdot OH$), пероксид водорода (H_2O_2);
- активные формы азота (АФА) – пероксинитрит (NOO^-), оксид азота ($\cdot NO$), диоксид азота ($\cdot NO_2$);
- активные формы хлора (АФХ) – гипохлорит-анион (ClO^-);
- различные высокоактивные производные липидов – $LO\cdot$, $L\cdot$, LOO^- .

Образование всех перечисленных форм лимитировано доступностью кислорода [60].

Схема, иллюстрирующая основные внутриклеточные пути генерации свободных радикалов и других «активных форм», изображена на рис. 3. **Супероксид-анион радикал** может быть синтезирован в клетке несколькими способами: НАДФН-оксидазами (при окислении НАДФН), ксантинооксидазой (при окислении ксантина либо гипоксантина); в ЭТЦ митохондрий (при окислении разнообразных восстановительных эквивалентов: НАДН, НАДФН, ФАДН); в результате самопроизвольного окисления в аэробных условиях гемоглобина, флавинов и моноаминов (допамина, эпинефрина, норэпинефрина); а также при одноэлектронном восстановлении O_2 цитохромами P450 либо некоторыми NO-синтазами [61][62][60][63]. Кроме того, продукцию O_2^- в присутствии H_2O и O_2 может индуцировать ионизирующее излучение [64].

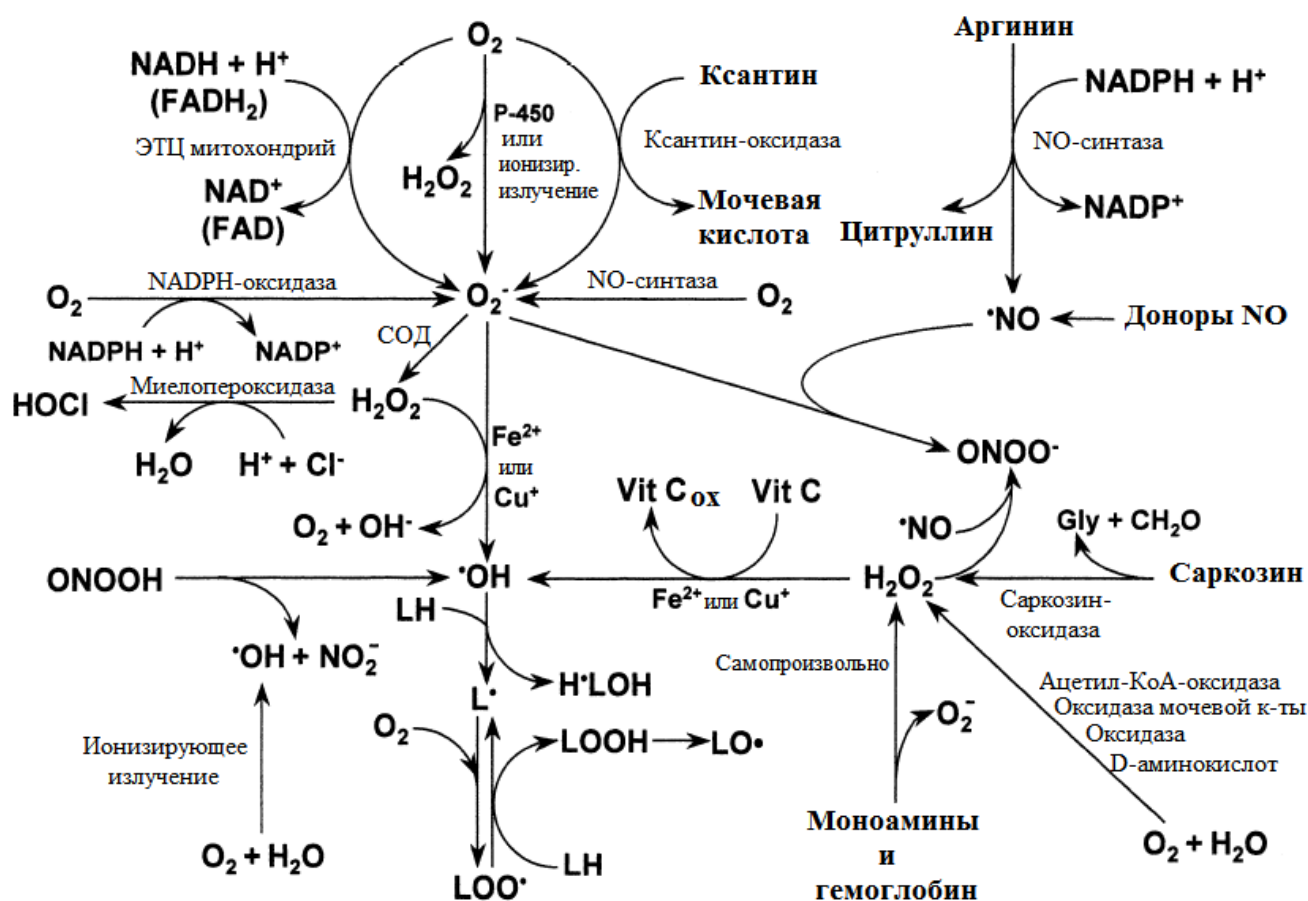


Рис. 3. Основные реакции генерации активных форм кислорода, азота, хлора и липидов в клетке.

Пояснения в тексте. Из [64] с изменениями.

Основными источниками **пероксида водорода** в клетке, вероятно, являются митохондрии и пероксисомы [64]. Т.е. утечка электронов, рутинно происходящая в ЭТЦ митохондрий при перевосстановлении O_2 , приводит к продукции некоторых активных форм, преобладающей среди которых является $O_2^{\cdot-}$ (о чем было упомянуто ранее). Затем супероксид быстро превращается в H_2O_2 в реакции, катализируемой супероксиддисмутазой (СОД). В качестве побочного продукта H_2O_2 генерируется в митохондриях также при двухэлектронном восстановлении O_2 в ходе функционального цикла белков семейства цитохромов Р450 [64]. Один из этапов метаболизма глицина, а именно, окисление саркозина в митохондриях саркозиноксидазой, также ассоциирован с образованием H_2O_2 [64]. Пероксисомы, основная биологическая роль которых заключается в окислении жирных кислот и некоторых других органических соединений, содержат множество ферментов-оксидаз, производящих H_2O_2 . К ним относятся, например, ацетил-КоА-оксидазы, а также оксидазы D-аминокислот и мочевой кислоты [62][60].

Стабильно высокий уровень H_2O_2 в пероксисомах требует специфической антиоксидантной защиты, которую в данном компартменте обеспечивает каталаза. Целенаправленная продукция H_2O_2 характерна для некоторых ферментов-участников сигнальных каскадов, в которых пероксид служит для трансдукции и усиления сигнала. Ярчайшими представителями такого рода ферментов являются НАДФН-оксидазы (NOXs). Масштабная генерация АФК НАДФН-оксидазой NOX2, получившая название окислительного взрыва, была описана на примере фагоцитов, элиминирующих антигены. В этом случае генерируемые АФК служат медиаторами воспалительного ответа [65][66].

Единственными продуцентами **оксида азота (NO)** в клетке в данный момент признаны белки семейства NO-синтаз (NOS). Это семейство объединяет три изофермента: нейрон-специфическую nNOS (или NOS-1), индуцируемую цитокинами iNOS (она же – NOS-2) и эндотелиальную eNOS (или NOS-3) [63]. Оксид азота способен взаимодействовать с O_2^- или H_2O_2 , формируя **пероксинитрит $ONOO^-$** , обладающий значительно большей реакционной способностью, чем исходные АФК [67][60].

Одна из наиболее токсичных АФК, **гидроксил-анион ($\cdot OH$)**, может формироваться в присутствии H_2O и O_2 под действием ионизирующего излучения [64]. Другой сильный окислитель, **гипохлорит-анион (OCl^-)**, образуется в результате функционального цикла миелопероксидазы в активированных фагоцитах и служит для элиминации антигенов [68].

Атака ненасыщенных жирных кислот различными активными формами (преимущественно, активными формами кислорода) приводит к возникновению разных **переокисленных форм липидов (L^\cdot , LOO^\cdot , LO^\cdot)**, которые, в свою очередь, могут вызывать радикализацию интактных жирных кислот, находящихся поблизости. Этот процесс имеет место в клетках при развитии масштабного окислительного стресса и, оставленный без внимания, приводит к необратимым последствиям [69].

Взаимодействие с различными окислителями, в основном, АФК и АФА, приводит к появлению различных производных сульфгидрильных групп (рис. 4). Как продукт первого этапа окисления сульфгидрила пероксидом водорода (H_2O_2), органическими гидроперекисями ($ROOH$) либо пероксинитритом ($ONOO^-$) образуется сульфеновая кислота ($-SOH$) [70]. Этот процесс полностью обратим. Есть множество сведений о том, что окисление сульфгидрилов некоторых белков до сульфеновых кислот – важная посттрансляционная модификация, косвенно регулирующая их активность [71][72][73][74]. $-SOH$ – короткоживущая форма, спонтанно переходящая в дисульфид, который изомеризуется до исходного сульфгидрила силами ферментативных систем тиол-дисульфидной регуляции (подробнее о них – далее) [70].

В условиях интенсивного либо хронического окислительного стресса $-SOH$ может окисляться дальше, с образованием сульфеновой кислоты ($-SO_2H$), а затем – и сульфоновой ($-SO_3H$) [75]. Частичное восстановление $-SO_2H$ возможно силами сульфиредоксинов и пероксиредоксинов, работающих в комплексе, и тиоредоксинредуктазы, тогда как окисление до $-SO_3H$ является необратимым. Некоторые белки эукариот в ходе эволюции приобрели исключительную чувствительность к окислению [76] и склонны к формированию $-SO_2H$, что, судя по всему, обуславливает их роль в клеточной регуляции. Среди таких белков, например, пероксиредоксины [77]. Переокисление пероксиредоксинов приводит к потере ими функциональной активности, что, согласно «модели шлюза» [78], делает возможным H_2O_2 -опосредованный сигналинг в их микроокружении, потенциально необходимый для дальнейшей мобилизации и защиты от окислительного стресса.

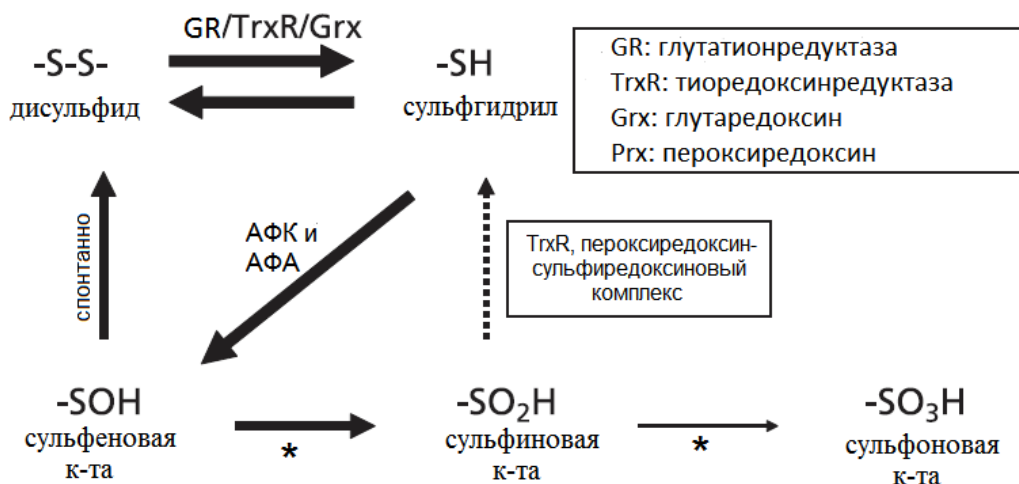


Рис. 4. Возможные направления окисления и рециклизации сульфгидрильных групп в клетке.

* - интенсивный/хронический окислительный стресс. Из [79] с изменениями.

Представители семейства **пероксиредоксинов (Prxs)** обнаружены во всех живых организмах, как прокариотических, так и эукариотических. Данные белки существуют в виде строгих гомодимеров массой 20-30 кДа [80], они вовлечены в процесс элиминации перекисей разного происхождения и пероксинитрита [81]. Уникальность пероксиредоксинов, выделяющая их среди прочих пероксидаз, обусловлена наличием двух функционально отличных друг от друга цистеинов в активном сайте. В то время как другие ферменты антиоксидантной защиты обычно содержат гем, флаavin или ион металла. Один из этих консервативных редокс-чувствительных цистеинов, так

называемый «peroxidatic Cys» (C_p), окисляется разнообразными субстратами Prx до сульфеновой формы C_p -SOH. Второй, «resolving Cys» (C_r), взаимодействует с C_p -SOH, формируя дисульфид, который в дальнейшем подлежит восстановлению сульфиредоксинами [82].

В клетках млекопитающих описано несколько изоформ Prx, отличающихся друг от друга внутриклеточной локализацией и количеством/характером взаимодействия активных цистеинов (рис. 5). Подсемейство *типичных* пероксиредоксинов характеризуется наличием C_p и C_r у каждой из двух субъединиц фермента и включает в себя 4 представителя – Prx с I по IV [78]. У пероксиредоксинов этого подсемейства в ходе каталитического цикла образование дисульфидной связи происходит между C_p -SOH и C_r разных субъединиц [83]. Также у млекопитающих присутствует один *атипичный* PrxV [84] и один *одноцистеиновый* PrxVI [85]. Атипичность PrxV заключается в том, что дисульфидная связь замыкается между активными цистеинами в пределах одной субъединицы. У PrxVI в активном сайте располагается только один C_p , из-за чего его функциональный цикл ассоциирован с сульфгидрильными группами низкомолекулярных тиолосодержащих редокс-партнеров [86][87]. Среди всех упомянутых пероксиредоксинов в цитозоле экспрессируются изоформы I, II и VI; в митохондриях – III и в ЭПР – IV. Изоформа V обнаружена одновременно в цитозоле, митохондриях и пероксисомах [88].

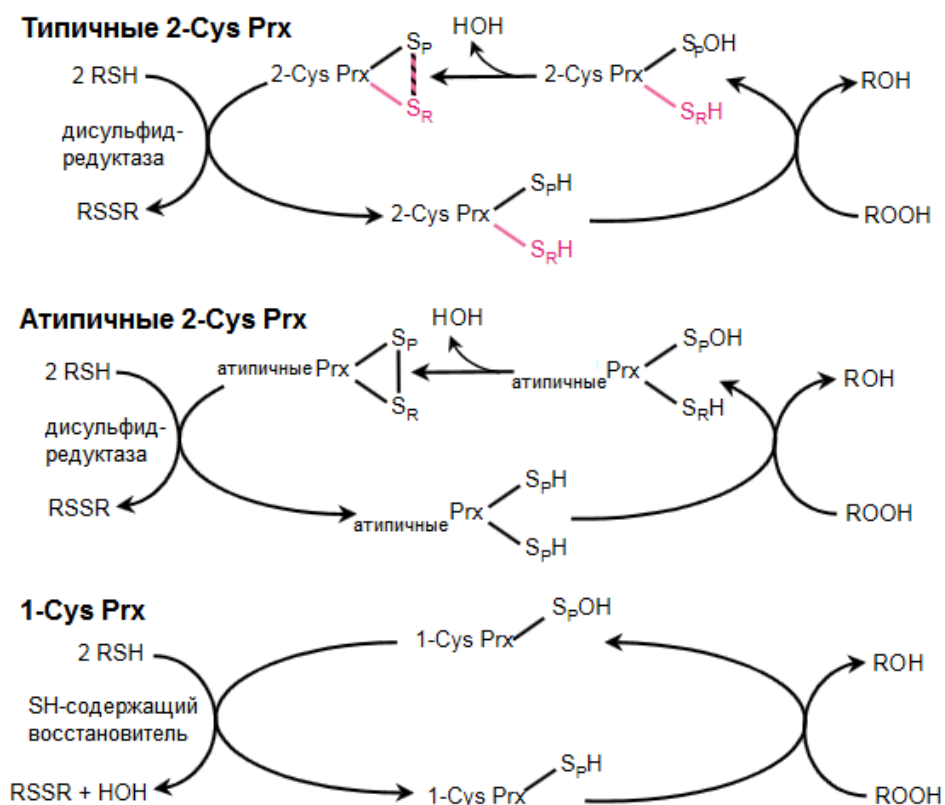


Рис. 5. Функциональный цикл пероксиредоксинов разных подсемейств.

В роли дисульфидредуктазы типичных и атипичных Prx обычно выступает тиоредоксинредуктаза. Из [89] с изменениями.

Сульфиредоксины (Srxs) обнаружены во всех эукариотических организмах и у некоторых прокариот, например, у цианобактерий [90]. Исходно Srx были охарактеризованы как АТФ-зависимые редуктазы переокисленных (до $-\text{SO}_2\text{H}$) цистеинов, специфичные исключительно к типичным 2-Cys пероксиредоксинам [91]. Позднее было также выявлено, что сульфиредоксины способны опосредовать реакцию деглутатионилирования представителей того же семейства пероксиредоксинов [92]. Биологическая значимость Srx-опосредованной регуляции белков семейства Prx до конца не ясна.

Тиоредоксин-зависимая система тиол-дисульфидной регуляции состоит из тиоредоксина, который восстанавливает ненативные дисульфидные связи в клеточных белках, и НАДФН-зависимой тиоредоксинредуктазы, которая рециклизует тиоредоксин (рис. 6).

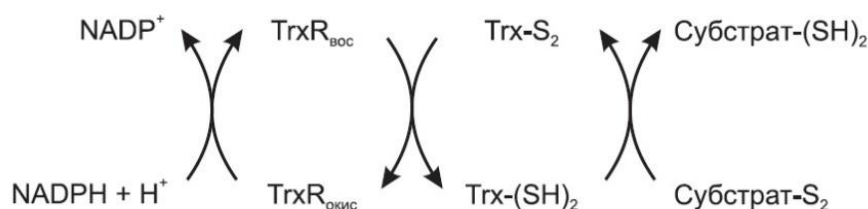


Рис. 6. Схема реакций, катализируемых тиоредоксин-зависимой системой.

Пояснения в тексте. Из [93].

Тиоредоксины (Trxs) – низкомолекулярные белки, в структуре которых присутствует два остатка Cys, способных обратимо окисляться при восстановлении белка-субстрата, содержащего дисульфидную связь. Trx существует в двух формах – цитозольной Trx1 и митохондриальной Trx2. Активный центр обоих белков имеет консервативную последовательность (Trp–Cys–Gly–Pro–Cys–Lys), в которой у Trx1 активные цистеины находятся в положении 32 и 35, а у Trx2 – 90 и 93. Обе изоформы белка восстанавливают пероксиредоксины и глутатионпероксидазы, элиминирующие H_2O_2 [94]. Кроме того, Trx1 способна восстанавливать H_2O_2 и GSSG напрямую [95].

Тиоредоксинредуктаза (TrxR) представляет собой димерный флавопротеин, для которого характерно наличие селеноцистеина в активном центре. Помимо селеноцистеина там расположены также два остатка Cys (положения 59 и 64), способные образовывать дисульфидную связь при окислении. Функциональный цикл TrxR начинается с переноса электрона с НАДФН на эту дисульфидную связь, в результате чего образуется дитиол. Затем селеноцистеин одной субъединицы димерного фермента захватывает электроны от дитиола, образовавшегося на соседней субъединице. В результате селеноцистеин восстанавливается, после чего может принимать участие в восстановлении белка-субстрата [96].

Тиоредоксинредуктаза представлена в клетках тремя изоформами: цитозольной (TrxR1), митохондриальной (TrxR2) и тиоредоксин/глутатион редуктазой (TGR) [97]. Субстратами для TrxR1 может служить множество разнообразных молекул, в том числе низкомолекулярные, небелковые и даже не содержащие дисульфидной связи. Так, TrxR1 принимает участие в восстановлении гидроперекисей липидов, а в случае повышения в клетке уровня H_2O_2 – и его [98][99]. Среди низкомолекулярных соединений TrxR1 может восстанавливать антибактериальные полипептиды [100], аллоксан [101] и витамин К [102]. TrxR играет важную роль в поддержании редокс-статуса клетки, также восстанавливая дегидроаскорбиновую кислоту, которая участвует в метаболизме

аскорбата, одного из важнейших элементов антиоксидантной защиты [103]. TrxR2 выполняет те же функции в митохондриях. TGR тканеспецифична, обнаружена в семенниках, где она участвует в восстановлении тиоредоксинов и GSSG, косвенно влияя на созревание гамет [104][105][106].

Глутаредоксин-зависимая система тиол-дисульфидной регуляции представлена тремя компонентами: глутаредоксином, глутатионом и НАДФН-зависимой глутатионредуктазой. Глутаредоксин ответственен за восстановление дисульфидных связей в молекуле белка-субстрата, глутатион – за восстановление окисленного в ходе каталитического цикла глутаредоксина, а глутатионредуктаза поддерживает GSH/GSSG (рис. 7).

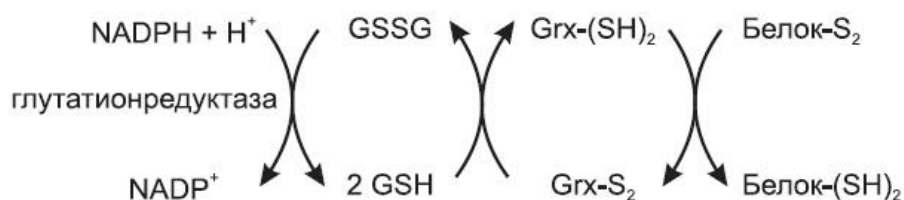


Рис. 7. Схема реакций, катализируемых глутаредоксин-зависимой системой.

Пояснения в тексте. Из [93].

Глутаредоксины (Grx) представляют собой GSH-зависимые оксидоредуктазы с молекулярной массой 9-14 кДа. В качестве субстрата белки семейства Grx могут использовать глутатионилированные белки и смешанные дисульфиды. У млекопитающих обнаружены три изоформы Grx: цитоплазматический Grx1 с CPYC последовательностью в активном центре и митохондриальные Grx2 и Grx5, активный центр которых содержит CSYC и CGPS, соответственно [107][108]. Специфика функциональной активности глутаредоксинов зависит от их внутриклеточной локализации. Разные компартменты клетки определяют как доступность субстратов, так и химическое окружение, т.е. близость различных «сигнальных факторов», которые могут модулировать активность фермента. Среди таких факторов следует отметить разные киназы, активные формы кислорода и азота.

Среди всех участников тиол-дисульфидной регуляции Grx1 является наиболее эффективным для изомеризации дисульфидной связи глутатионилированных белков [109]. Среди субстратов Grx1 можно выделить, например, гемоглобин, папаин и актин [110][111]. Опосредованное Grx1 деглутатионилирование Ras [112], SERCA [113], IκB-

киназы [114] и фосфотирозин-специфичной фосфатазы 1B [115] играет значительную роль в регуляции таких процессов как митоз, поддержание кальциевого гомеостаза, клеточная дифференцировка, индукция апоптоза, а также передача сигнала в сигнальном пути инсулина. Широкий спектр субстратов и высокое сродство к ним делает Grx1 основным ферментом де-/глутатионирования в клетке.

Grx2 локализуется в матриксе митохондрий, причем это был один из первых обнаруженных в тиоредоксиновом суперсемействе белков, содержащий Fe-S-кластеры [116]. В активном сайте Grx2 расположена необычная для данной группы белков последовательность Cys–Ser–Tyr–Cys, а высокое сродство к смешанным дисульфидам «белок-глутатион» делает Grx2 эффективным деглутатионирующим агентом [107]. Предполагают, что Fe-S-кластеры выполняют роль редокс-чувствительных сенсоров для активации Grx2 в ходе окислительного стресса. Было показано, что в митохондриях каждый подобный Fe-S-кластер скоординирован двумя молекулами Grx2 (через N-концевой остаток цистеина активного сайта белка) и двумя молекулами глутатиона [116]. В таком случае Grx2 неактивен. Однако при окислительном стрессе восстановленный глутатион становится лимитирующим фактором координации подобных кластеров, и молекулы Grx2 высвобождаются и, таким образом, активируются.

Функциональная активность Grx5, расположенного в матриксе митохондрий, также ассоциирована с Fe-S-кластерами. Было установлено, что у дрожжей Grx5 необходим для связывания новообразованных Fe-S-кластеров с апоферментами, а нокаут по гену *grx5* приводит к деградации ферментов, содержащих подобные кластеры [117]. У рыб *D. rerio* недостаточность Grx5 приводит к развитию анемии [118]. В то время как в клетках человека Grx5 опосредует биогенез Fe-S-кластеров в митохондриях [119].

Глутатионредуктазы (GRs) существуют в виде гомодимерных флавопротеинов, причем для формирования активного сайта необходимо участие редокс-чувствительных цистеинов обеих субъединиц. Простетическая группа в составе холофермента представлена ФАД [120], [121]. Структура GRs высоко консервативна у глутатион-содержащих организмов [122][121][123]. Внутриклеточно глутатионредуктаза локализована в компартментах, где особенно активен ток электронов. У эукариот она обнаружена в цитоплазме и матриксе митохондрий [124], ядре [125] и лизосомах [126]. У растений GR найдена также в хлоропластах [127], а у прокариот – в периплазматическом пространстве [128]. Показано, что у человека и дрожжей цитоплазматическая и митохондриальная формы фермента транскрибируются с одного гена посредством альтернативных старт-кодонов [129], [130].

В человеческой популяции случаи глутатионредуктазной недостаточности регистрируют редко. Нарушения такого рода, вызванные мутациями в кодирующем гене, по всей видимости, приводят к летальному исходу еще на этапе эмбрионального развития. Сниженная активность фермента может быть вызвана рационом, бедным витамином В₂ (прекурсором ФАД) и приводить к развитию катаракты, фавизма и укорочению времени жизни эритроцитов. Расстройства такого рода компенсируют путем приема названного витамина [131].

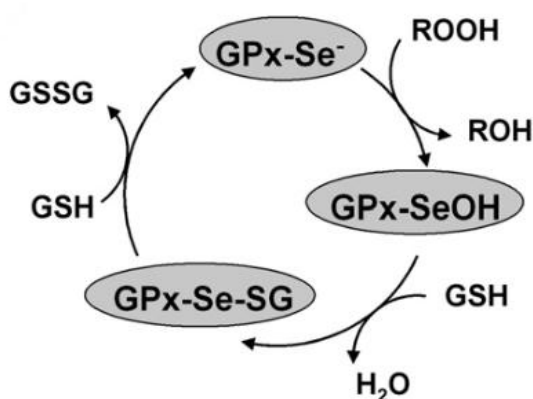


Рис. 8. Схема каталитического цикла селеносодержащих глутатионпероксидаз.

Пояснения в тексте. Из [132] с изменениями.

Под «глутатионпероксидазами» (GPxs) понимают гетерогенное семейство белков, катализирующих восстановление H_2O_2 и органических гидроперекисей с образованием воды и соответствующих спиртов. При этом в качестве донора восстановительных эквивалентов большая часть из них использует глутатион (рис. 8) [133].

Охарактеризованные первыми GPx (GPx1-4) содержат остаток селеноцистеина в активном сайте, который обуславливает высокую реакционную способность данных ферментов. GPx1 экспрессируется повсеместно в цитоплазме и митохондриях, в условиях нехватки глутатиона она способна акцептировать электроны прекурсора GSH – γ -глутамилцистеина [134]. На мышах, нокаутных по гену *gpx1* (-/-), было показано, что никакой другой селеносодержащий фермент антиоксидантной защиты не может компенсировать отсутствия GPx1 в условиях генерализованного окислительного стресса [135]. Помимо антиоксидантных, GPx1 выполняет также сигнальные функции, косвенно влияя на развитие воспалительного ответа [136], инсулин-резистентности [137][138], и злокачественных перерождений клеток [139].

GPx2 обнаружена в эпителии желудочно-кишечного тракта, где она, предположительно, элиминирует перекиси, образующиеся в ходе переваривания пищи [139]. Эксперименты на мышах *gpx2*^{-/-} позволяют заключить, что функция GPx2 в эпителиальных клетках ворсинок кишечника уникальна (хоть и не до конца ясна) и не может быть компенсирована ни селеносодержащими белками других семейств, ни обладающей высокой степенью гомологии GPx1 [140].

GPx3 найдена в плазме крови [141] и некоторых других внеклеточных жидкостях [142][143][144][145]. Любопытно, что некоторые клетки, например, в канальцах коркового вещества почек [146], эпителии кишечника, эпидидимиса и бронхов способны аккумулировать GPx3 на базальной мембране [147]. Механизм связывания и его биологическая значимость, однако, не установлены. Отсутствие GPx3 мало влияет на способность мышей выживать в условиях окислительного стресса [146]. Однако выдвинута гипотеза, согласно которой GPx3 может опосредовать детерминацию всех поступающих в клетку провоспалительных стимулов на значимые и нет [148]. Это теоретически возможно благодаря пероксидазной активности GPx3, позволяющей блокировать H₂O₂-индуцированную активацию липооксигеназ (LOXs). Активация LOX индуцирует амплификацию пероксидного сигнала, вызывая дополнительную генерацию H₂O₂ НАДФН-оксидазами (NOXs), что, в конечном счете, приводит к масштабному воспалительному ответу. Элиминирование пероксида водорода в примембранном слое цитоплазмы посредством GPx3 позволяет поддерживать пул мембраносвязанных LOX в неактивном состоянии. В случае острого либо хронического окислительного стресса, когда клетка подвергается воздействию сравнительно высоких концентраций H₂O₂, GPx3 не успевает рециклизоваться, т.к. в плазме и прочих внеклеточных жидкостях концентрация ее восстановителя, глутатиона, очень низка [148]. В результате происходит активация LOX, приводящая к интегральному воспалительному ответу.

GPx4 – единственная глутатионпероксидаза из рассматриваемой группы, перманентно связанная с плазматической мембраной. Любопытно, что помимо глутатиона, восстановителями GPx4 могут быть тиолы клеточных белков, например, белков хроматина [149]; связанного с митохондриями сперматозоидов белка, богатого цистеином (SMCP) [150]; и даже самой GPx4 [151][152]. Таким образом, в зависимости от доступности субстрата GPx4 может функционировать как глутатионпероксидаза либо тиолпероксидаза. Доказано участие GPx4 в регуляции апоптоза [153] и пролиферации клеток [154]. На мышинной модели болезни Альцгеймера показано нейропротекторное действие GPx4, обусловленное ее способностью к элиминации гидроперекисей липидов и контролю апоптоза [155]. У млекопитающих данный фермент представлен тремя

изоформами: цитозольной cGPx4, митохондриальной mGPx4, ядерной сперматозоидной snGPx4 [156]. Причем последние две экспрессируются преимущественно в тканях, функционально ассоциированных со сперматогенезом. У мышей нокаут по cGPx4 несовместим с жизнью, по mGPx4 приводит к стерильности самцов [157], по snGPx4 выраженных фенотипических проявлений не имеет [158][159]. Сейчас полагают, что основной функцией snGPx4 в гаметогенезе является поддержание интегральной стабильности структуры хроматина созревающих гамет путем удаления избытка гидроперекисей. Предположительно она даже участвует в формировании субкомпарментов внутри ядра, что ранее было показано для митохондрий [152].

К настоящему моменту описано еще 4 глутатионпероксидазы, которые существенно отличаются от традиционных по ряду признаков. Так, у GPx5 в активном сайте вместо селеноцистеина – цистеин, и экспрессируют ее исключительно клетки эпидидимиса. Предположительно, она выполняет те же функции, что и snGPx4, только в не связанном с мембраной виде [160]. GPx6 специфична для обонятельного эпителия, причем у человека она содержит остаток селеноцистеина в активном центре, а у мышей и крыс – нет [161]. Достоверных данных касательно ее специфических функций до сих пор нет. Отличительной чертой цистеин-содержащих GPx7 и GPx8 является низкая пероксидазная активность. Обсуждается участие этих пероксидаз в регуляции фолдинга белков в ЭПР [162].

1.5.3 Глутатион-опосредованный NO-сигналинг

Таргетирование NO для выполнения им сигнальной функции в некоторых случаях может быть опосредовано глутатионом [163]. GSH формирует конъюгат с NO, т.н. S-нитрозоглутатион (GSNO), который служит своеобразным «депо» оксида азота. Молекулярные механизмы этого процесса и потенциальные редокс-партнеры остаются невыясненными [164]. Среди ферментов, теоретически способных к генерации GSNO, называют белки семейств пероксидаз, например, миелопероксидазу [165]. Деградация GSNO в клетке может быть локально осуществлена тиоредоксиновой системой с высвобождением NO и GSH [64]. Транснитрозилирование GSNO в плазме крови показано при вазодилатации [166].

1.5.4 Конъюгаты глутатиона как элемент детоксификации

Метаболизм некоторых гидрофобных и малорастворимых соединений внутри клетки протекает через стадию формирования конъюгата с GSH. Данный процесс имеет место как в норме, так и при необходимости элиминировать нежелательные ксенобиотики [69]. При этом конъюгация с глутатионом может происходить как самопроизвольно, так и при

участии глутатион-S-трансфераз [167]. В общем случае конъюгаты подобного рода после образования могут быть захвачены и экспортированы за пределы клетки белками множественной устойчивости (MDR). В физиологических условиях в рамках естественной регуляции конъюгаты с глутатионом образуют, например, эстроген [168], меланин [169], простагландины [170], лейкотриены [171]. Среди экзогенных потенциально токсичных соединений, претерпевающих конъюгацию с глутатионом перед экспортом, называют, например, гидрохинон [172], метаболит стирена – фенилоксиран [173], афлатоксины [174] и акролеин [175]. Усиленная экспрессия глутатион-S-трансфераз обнаружена у раковых клеток, которые используют данный фермент, чтобы противостоять лекарственной терапии [176].

1.5.5 Глутатионилирование как механизм защиты и регуляции клеточных белков

Тиол-дисульфидный обмен между глутатионом и цистеинами клеточных белков представляет собой один из важных механизмов редокс-регуляции последних. Динамика глутатионилирования/деглутатионилирования детерминирована редокс-статусом клетки, который напрямую зависит от соотношения GSH/GSSG [20]. Усиленное формирование смешанных дисульфидов (белок-SSG) всегда происходит в условиях окислительного стресса, когда концентрация GSSG возрастает [177], например, при ишемии [178]. Любопытно, что в норме, при эндогенной генерации АФК в ходе клеточного сигналинга, например, при действии факторов роста [112] или ангиотензина II [179], также наблюдают увеличение количества глутатионилированных белков. Обратимое S-глутатионилирование цистеинов, во-первых, маскирует их, защищая от необратимого окисления, а во-вторых, в некоторых случаях представляет собой ключевой этап регуляции ферментов и транскрипционных факторов, участвующих в клеточном ответе на окислительный стресс [180][181]. К транскрипционным факторам, активность которых зависит от глутатионилирования, относят, например, AP-1 [182], NFκB [183] и p53 [184]. В условиях физиологической нормы в интактной клетке есть ряд белков, которые находятся в перманентно глутатионилированном состоянии. Среди них, в частности, β-актин [179] и митохондриальный комплекс II [185]. Глутатионилирование является критичным событием в некоторых ключевых точках жизненного цикла клетки и ее апоптоза, а также для некоторых киназ, ферментов метаболизма и антиоксидантных систем [186][187][188].

Глутатионилирование может влиять на активность редокс-чувствительных белков двумя способами. Напрямую, в случае, если глутатионилированию подвергаются цистеины в активном сайте фермента, либо косвенно, если модификация затрагивает

остатки, расположенные за пределами активного сайта. Во втором случае глутатионилирование индуцирует конформационные изменения в структуре белковой глобулы, которые отражаются на функциональной активности. Конъюгация глутатиона с белками может происходить как самопроизвольно, так и с участием специализированных ферментов – глутатион-S-трансфераз, особенно Р-изоформ (GSTP) [189]. Обратимость S-глутатионилирования обеспечивает глутаредоксиновая система [190] (см. п.1.5.2).

1.5.6 Депонирование цистеина

Помимо прочих функций, внутриклеточный пул глутатиона служит и своеобразным депо цистеина. Цистеин очень нестабилен в физиологических условиях и самопроизвольно окисляется до цистина. Постоянный приток не окисленного цистеина, необходимого для биосинтезов, в клетке поддерживается в том числе посредством γ -глутамилового цикла, активность которого зависит от доступности глутатиона [3]. В ходе данного цикла GSH экспортируется из клетки и расщепляется до γ -глутамила и цистеинилглицина ферментом γ -GT. Это единственный клеточный фермент, способный к расщеплению нестандартной связи GSH. Затем γ -GT присоединяет полученный на первом этапе γ -глутамил к какому-либо аминокислотному остатку, после чего дипептид импортируется в клетку, где метаболизируется с образованием аминокислоты и 5-оксопролина, который может быть конвертирован в глутамат и использован для дальнейших биосинтезов. Второй продукт функционального цикла γ -GT, цистеинилглицин, подвергается деградации пептидазами. Освободившийся при этом цистеин немедленно захватывается клеткой, которая использует его для синтеза GSH, синтеза белка либо метаболизирует до таурина или сульфата [3][20].

1.6 Инструменты для изучения редокс-статуса пула глутатиона

1.6.1 Синтетические красители

На протяжении долгого времени спектр флуоресцентных инструментов для оценки окислительно-восстановительного статуса был ограничен синтетическими красителями и основан на их способности так или иначе взаимодействовать с совокупностью всех клеточных тиолов. По механизму действия подобные хемосенсоры разделяют на несколько групп. Часть из них по принципу нуклеофильного замещения образует флуоресцирующие конъюгаты с тиолами (mBrB [191], ABD-F [192], SBD-F [192], 5-IAF [193]) либо конъюгаты, поглощающие УФ-излучение (CMPI [194] и CMQT [195]). Другие же представляют собой Михаэлевские акцепторы, с которыми тиолы легко, и, что важно –

быстро (в течение 2-5 минут), вступают в реакцию нуклеофильного присоединения (ThioGlo™1 [196], 3 [197] и 5 [198]). Пробы такого рода зачастую используют для флуоресцентного/колориметрического мечения тиолов и их последующей количественной оценки методом высокоэффективной жидкостной хроматографии. Существуют также хемосенсоры, принцип работы которых основан на расщеплении дисульфидной связи (например, реактив Элмана [199]). Они также позволяют оценить тотальное количество тиолов в белковом препарате. Дизайн флуоресцентных проб, специфически взаимодействующих с молекулами глутатиона среди всех внутриклеточных тиолсодержащих белков, представлялась перспективным направлением, особенно в таких областях исследований, как редокс-биология. При этом к ним предъявляли следующие требования: селективность, быстрый ответ и максимум возбуждения, предпочтительно расположенный в длинноволновой области.

К настоящему моменту создан ряд флуоресцентных проб, позволяющих совокупно оценить окислительно-восстановительный статус внутриклеточных низкомолекулярных тиолсодержащих соединений, таких как цистеин, гомоцистеин и глутатион. В основе таких условно специфических синтетических красителей могут быть самые разнообразные флуорофоры: родамин [200], флуоресцеин [201], кумарин [202], скварин [203], BODIPY [204] или т.н. флуорофор для двухфотонной микроскопии [205]. Однако разработка проб, специфичных к глутатиону, до сих пор в затруднительном положении. Есть сведения, что созданный посредством метода DOFLA (Diversity-Oriented Fluorescence Library Approach [206]) индикатор под названием **Glutathione Green** пригоден для использования в живых тканях и модельных объектах для определения окислительно-восстановительного статуса глутатиона [207]. Краситель Glutathione Green ратиометрический, то есть его сигнал характеризуется независимым изменением интенсивности флуоресценции в двух пиках спектра возбуждения флуоресценции. Это позволяет регистрировать сигнал как отношение величин интенсивностей двух пиков и избавляет от некоторых артефактов, например, вызываемых неравномерной толщиной образца. Среди недостатков Glutathione Green можно выделить, во-первых, его чувствительность преимущественно к восстановленной форме глутатиона GSH, тогда как реакция на GSSG сопоставима с реакцией на H₂O₂, НАД⁺, НАДН, фруктозу, глюкозу и многие другие компоненты живых клеток [207]. В экспериментальных условиях это значит, что при развитии как локального, так и генерализованного окислительного стресса, т.е. при росте доли GSSG в общем пуле, Glutathione Green будет давать ложноотрицательный сигнал. Это значительно сужает область применения данной пробы,

ограничивая ее лишь теми физиологическими и патологическими процессами, для которых характерно перевосстановление пула глутатиона. Во-вторых, упоминая недостатки пробы *Glutathione Green*, следует отметить, что ее нельзя назвать «быстрой» – для достижения максимальной амплитуды ответа требуется порядка часа [207]. Таким образом, *Glutathione Green* представляет собой перспективный инструмент, например, в некоторых клинических исследованиях для визуализации очагов злокачественных перерождений, но непригоден для изучения быстротечных процессов, ассоциированных с окислением пула глутатиона при клеточном сигналинге.

Первым синтетическим красителем, обратимо взаимодействующим с глутатионом, стал **ThiolQuant Green** [208]. Сигнал *ThiolQuant Green* ратиометричен, но для развития ответа необходимо порядка 10 минут, что не удовлетворяет требованиям исследований быстротечных внутриклеточных процессов, в частности, сигналинга. Данный инструмент был успешно применен в разных типах живых клетках для регистрации изменений уровня GSH, в том числе в условиях FACS-цитометрии [208]. Однако *ThiolQuant Green* не может быть использован для детекции колебаний соотношения 2GSH/GSSG.

Другой синтетический краситель, обладающий ратиометрическим ответом, **RealThiol** [209], в физиологических условиях также взаимодействует преимущественно с восстановленной формой глутатиона GSH в диапазоне концентраций 1-10 мМ. Однако было показано, что в условиях *in vitro* *RealThiol* реагирует с GSH с такой же эффективностью, как и с цистеином [209]. Но по причине того, что в клетках концентрация цистеина значительно меньше концентрации GSH, это взаимодействие практически не отражается на динамике флуоресценции красителя в условиях окислительного стресса клеток. Конъюгат *RealThiol* с GSH флуоресцирует в более коротковолновой области спектра по сравнению со свободным *RealThiol*, таким образом, эти две формы красителя могут быть спектрально различены. Для достижения максимальной амплитуды ответа *RealThiol* необходимо около 90 секунд [209], причем ответ красителя носит обратимый характер. Таким образом, *RealThiol* представляет собой эффективный инструмент для регистрации динамики GSH, но непригоден для детекции редокс-изменений 2GSH/GSSG.

На основе *RealThiol* также был создан краситель **HaloRT** [210], который можно использовать локально в пределах выбранного исследователем внутриклеточного компартмента. Динамика и биохимические свойства, а следовательно, обусловленные ими преимущества и недостатки *HaloRT* схожи с таковыми для *RealThiol*.

1.6.2 Флуоресцентные белки и генетически кодируемые биосенсоры на их основе

1.6.2.а Флуоресцентные белки – общие сведения

Изучение молекулярных оснований свечения медузы *Aequorea victoria* привело к открытию avGFP - зеленого флуоресцентного белка, способного поглощать кванты света в синей области спектра и излучать в зеленой [211]. Это открытие, клонирование гена avGFP [212] с последующим использованием данного маркера для треккинга экспрессии генов бактерий и нематоды *C. elegans* [213] ознаменовали начало революции в области визуализации клеточных структур и процессов и стимулировали активнейшие поиски аналогичных белков у других представителей животного мира. Поисковые работы увенчались успехом, и вскоре флуоресцентные белки с разнообразными хромофорами (и спектральными характеристиками) были обнаружены и у других организмов, по большей части, беспозвоночных [214].

В основе уникальности GFP-подобных белков – их хромофор, созревание которого происходит самопроизвольно в присутствии кислорода. Он представлен тремя аминокислотными остатками, в случае avGFP это Ser65, Tyr66 и Gly67 (рис. 10 в, г). При этом Tyr66 и Gly67 высококонсервативны у всех природных GFP-подобных белков, тогда как остаток в 65-ом положении может различаться у разных представителей этого семейства, обуславливая их спектральное разнообразие. Точечный мутагенез по позициям хромофора использовали как инструмент получения новых белков, спектральные характеристики которых отличаются от таковых исходного GFP. Например, замена Tyr66 на Phe, His или Trp вызывает значительное смещение флуоресценции в синюю область спектра. Для дополнительной стабилизации полученных структур в рамках данного подхода зачастую применяют также случайный мутагенез по всей длине гена флуоресцентного белка. В результате таких манипуляций были получены семейства ФБ с Trp66 в хромофоре: ECFP [215], Cerulean [216], mTurquoise [217], TagCFP [Evrogen JSC] (максимумы возбуждения/эмиссии флуоресценции 435/475 нм). И ФБ с His66 в хромофоре: EBFP [218], SBFP2 [219], EBFP2 [220], Azurite [221] (максимумы возбуждения/эмиссии флуоресценции 383/448 нм). Замена Tyr66Phe привела к получению Sirius, обладающего, среди прочих ФБ, самыми коротковолновыми максимумами флуоресценции – 355/424 нм [222].

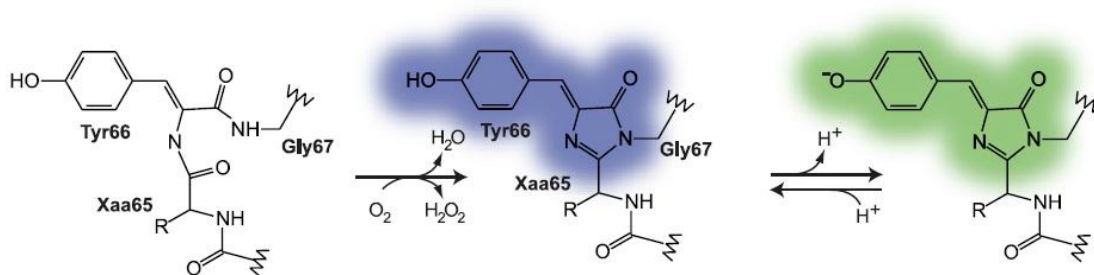


Рис. 9 . Схема образования хромофора GFP.

Из [223].

Созревание хромофора GFP-подобных белков происходит при циклизации обозначенных выше ключевых остатков путем дегидрирования их молекулярным кислородом (рис. 9). В результате формируются две циклические структуры, образующие замкнутую π -систему, способную поглощать и излучать кванты света [224]. Хромофор может находиться в двух формах: протонированной (не заряженной) и депротонированной (анионной). Депротонированная форма образуется путем отщепления протона от гидроксильной группы Tyr66. В норме протонированная и депротонированная формы хромофора находятся в равновесии [225]. Протонированный хромофор GFP может поглощать кванты света в районе 400 нм и испускать в районе 460 нм, что наблюдается, например у PS-CFP [226]. Однако в большинстве случаев хромофор подвергается ESPT (Excited State Proton Transfer): процессу, при котором сразу же после возбуждения хромофор теряет протон и поляризуется, испуская часть сообщенной ему энергии [227][228]. Депротонированный таким образом хромофор поглощает фотоны в районе 480 нм и испускает их в зеленой области спектра (~ 510 нм).

Третичная структура GFP-подобных флуоресцентных белков представляет собой компактную глобулу, т.н. «бочку», состоящую из 220-240 аминокислотных остатков, формирующих 11 β -слоев (рис. 10 а, б). В центре бочки располагается α -петля с хромофором. Структура белков семейства GFP обладает высокой устойчивостью к тепловой и химической денатурации [229][230][231].

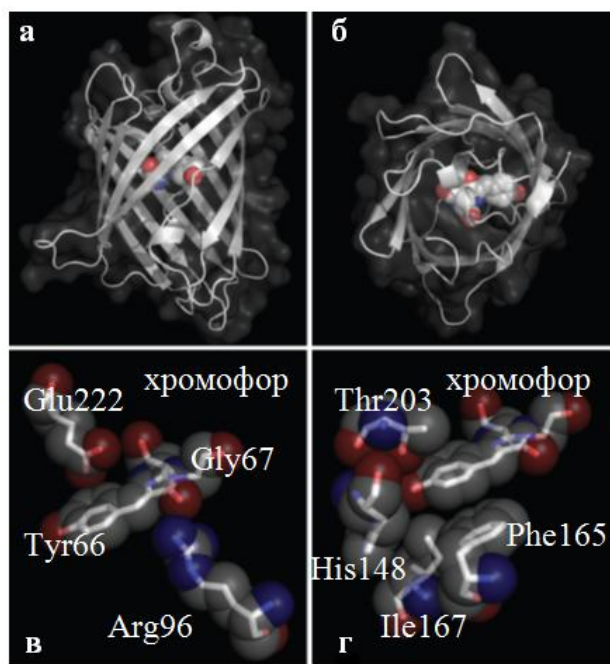


Рис. 6. Структура зеленого флуоресцентного белка GFP.

β -бочка GFP: вид сбоку (а) и сверху (б).

Хромофор GFP в окружении функционально-значимых аминокислотных остатков (в, г).

Атомы углерода выделены серым цветом, азота – синим, кислорода – красным. По [223] с изменениями.

Аминокислотные остатки, формирующие окружение хромофора, представляют собой особый интерес, т.к. играют важную роль в его формировании и сильно влияют на спектральные характеристики белка. Так, высококонсервативные Arg96 и Glu222 необходимы для правильного созревания GFP [232][233]. Взаимодействие хромофорного Tyr66 с аминокислотными остатками в положениях 148, 165, 167 и 203 определяет преобладающее состояние, протонированное или депротонированное, в котором находится хромофор [227][234][235]. Мутации в этих положениях приводят к значительным изменениям спектров возбуждения и эмиссии флуоресценции GFP-подобных белков. По этой причине их часто используют для создания мутантных белков с улучшенными или качественно новыми характеристиками. Например, замена Thr203Tyr позволила получить широко применяемую сейчас желтую версию GFP - YFP [236]. Для YFP характерен сдвиг максимумов возбуждения и эмиссии флуоресценции в более длинноволновую область по сравнению с GFP. Замена того же остатка Thr203 на Ile или His, напротив, приводит к стабилизации хромофора в протонированной форме, что наблюдается у таких мутантов GFP, как Sapphire [230] и PA-GFP [237], поглощающих кванты в синей области спектра в районе 400 нм.

1.6.2.6 Красные флуоресцентные белки

Среди огромного многообразия существующих к настоящему моменту ФБ особое место занимают красные флуоресцентные белки (RFP). Помимо очевидной пользы для целей мультипараметрического многоцветного имаджинга, заключающейся в увеличении панели спектрально различимых флуоресцентных маркеров, разработка и использование RFP имеют ряд дополнительных специфических преимуществ. Детекция флуоресценции, сдвинутой в более длинноволновую область спектра, в значительной степени облегчена, поскольку уровень автофлуоресценции в живых тканях в этом канале существенно ниже, чем, например, в зеленом. Кроме того, свет, возбуждающий флуоресценцию RFP, менее фототоксичен для клеток по сравнению со светом, возбуждающим GFP, а из-за более низкого поглощения лучше проникает в ткани. Все это делает RFP заманчивым инструментом, заслуженно получившим повсеместное распространение в приложениях *in vivo*.

Первым RFP, найденным в живой природе и охарактеризованным, стал DsRed из морского анемона *Discosoma sp* [238]. К сожалению, DsRed обладает рядом существенных недостатков, затрудняющих его использование. Скорость его созревания очень невысока ($t_{0.5} > 10$ часов), кроме того, хромофор DsRed имеет тенденцию к формированию интермедиата, флуоресцирующего в зеленой области, что существенно затрудняет разрешение DsRed от зеленых гомологов в условиях мультипараметрической съемки [239]. Наконец, DsRed – облигатный тетрамер, склонный к олигомеризации более высоких порядков [240][241]. Потребность в RFP, удовлетворяющем всем условиям имаджинга *in vivo*, стимулировала появление mRFP1 – мономерной версии DsRed, которая, однако, была недостаточно яркой и фотостабильной [242]. Интенсивная работа по улучшению характеристик mRFP1 привела к созданию линейки красных флуоресцентных белков, т.н. mFruits: mCherry, mTangerine, mStrawberry, mOrange и т.д. [243][244]. Сейчас существует более двух десятков разнообразных RFP, которые по фотохимическим свойствам категоризируют на стандартные (максимумы возбуждения/эмиссии 550-580/580-620 нм), дальнекрасные (590-605/625-675 нм) и с увеличенным стоксовским сдвигом, иначе называемые LSS RFP (разница между максимумами возбуждения/эмиссии более 135 нм). Помимо обычных RFP существуют также фотоактивируемые [245], фотопереключаемые [246][247] и фотоконвертируемые [248], которые в данном обзоре подробно рассмотрены не будут.

Табл. 1. Некоторые характеристики наиболее популярных стандартных красных флуоресцентных белков

Белок	λ_{ex} (нм)	λ_{em} (нм)	Яркость ($10^3 \cdot \text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$)	pK _a	Фотовыгорание (сек)	Созревание (мин)	Ссылка
mOrange	548	562	49	6.5	9	150	[243]
mOrange2	549	565	34.8	6.5	НО	НО	[244]
TagRFP	555	584	49	3.8	48	100	[249]
TagRFP-T	555	584	33.2	4.6	337	100	[244]
mRuby	558	605	39.2	4.4	НО	НО	[250]
mRuby2	559	600	43	5.3	123	150	[251]
mTangerine	568	585	11.4	5.7	НО	НО	[243]
mApple	568	592	36.7	6.5	НО	НО	[244]
mScarlet	569	594	71	5.3	НО	НО	[252]
mStrawberry	574	596	26.1	4.5	15	50	[243]
FusionRed	580	608	18.1	4.6	150	130	[253]
mCherry	587	610	15.8	4.5	96	40	[243]

НО – не определено.

Для стандартных RFP (табл. 1), происходящих от DsRed, критическое значение имеет остаток хромофора Gln66. Так, мутация Gln66Met приводит к значительному сдвигу максимумов возбуждения и эмиссии флуоресценции RFP в более дальнекрасную область, такой эффект наблюдается, например, у mCherry [254]. У mStrawberry, mTangerine и mOrange в 66-ом положении остаток глутамина заменен на Cys или Thr, что обуславливает сдвиг флуоресценции этих белков в синюю область спектра [254]. Наиболее популярными из этой группы стандартных RFP, прекрасно зарекомендовавшими себя в съемках прижизненных внутриклеточных процессов, стали mOrange и mCherry. Однако не только DsRed из *Discosoma sp.* послужил базой для создания улучшенных мутантных форм. Флуоресцентные белки под названиями eqFP578

[255] и eqFP611 [256], выделенные из другого морского анемона *Entacmaea quadricolor*, также внесли свой вклад – на их основе появились такие RFP, как TagRFP [255], FusionRed [257] и mRuby [258].

Табл. 2. Некоторые характеристики наиболее популярных дальнекрасных флуоресцентных белков

Белок	λ_{ex} (нм)	λ_{em} (нм)	Яркость ($10^3 \cdot M^{-1} \cdot cm^{-1}$)	pK _a	Фотовыгорание (сек)	Созревание (мин)	Ссылка
mKate	588	635	8.8	6.2	НО	НО	[259]
mKate2	588	633	25	5.4	84	20	[260]
mPlum	590	649	4.1	4.5	53	100	[261]
mRaspberry	598	625	12.9	НО	НО	НО	[261]
mNeptune	600	650	13.4	5.4	255	35	[262]
TagRFP657	611	657	3.4	5	НО	НО	[263]
TagRFP655	598	675	3.7	5.7	НО	25	[264]
mCardinal	604	659	16.5	5.3	730	27	[265]

НО – не определено.

Дальнекрасная область представляет собой наиболее перспективный участок спектра для исследований *in vivo* на уровне тканей и модельных организмов. В диапазоне 600-1200 нм выделяют т.н. «оптическое окно», в котором гемоглобин и прочие биомолекулы уже не поглощают, а вода еще не поглощает. Это значительно снижает уровень автофлуоресценции образцов и делает возможным избирательную детекцию флуоресценции RFP, эмиссия которой происходит в данном диапазоне. Первые попытки получения дальнекрасных RFP с эмиссией > 620 нм (табл. 2) из производных DsRed нельзя назвать удачными, поскольку все они привели к созданию достаточно тусклых белков, не вполне пригодных для поставленных перед ними целей (например, mPlum [266], mRaspberry [266]). По этой причине научная общественность обратилась к линейке RFP из *Entacmaea quadricolor*, в результате на свет появились mNeptune [267] и mKate [268]. На основе mKate данное семейство, в свою очередь, пополнилось mKate2 [269],

TagRFP657 [270], TagRFP675 [271] и mCardinal [272]. Все они успешно используются на практике в приложениях *in vivo*.

Табл. 3. Некоторые характеристики наиболее популярных красных флуоресцентных белков с увеличенным стоксовским сдвигом (LSS RFP)

Белок	λ_{ex} (нм)	λ_{em} (нм)	Яркость ($10^3 \cdot \text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$)	pK _a	Фотовыгорание (сек)	Созревание (мин)	Ссылка
mKeima	440	620	3.5	6.5	НО	НО	[272]
mBeRFP	446	611	17.6	5.6	НО	НО	[273]
LSSmKate2	460	605	4.4	2.7	НО	НО	[274]
LSSmKate1	463	624	2.5	3.2	НО	НО	[274]
LSSmOrange	437	572	23.5	5.7	НО	138	[275]

НО – не определено.

Определяющей чертой **RFP с увеличенным стоксовским сдвигом** принято считать разницу между максимумами возбуждения и эмиссии флуоресценции > 100 нм. Такая особенность позволяет с большей точностью разрешать спектрально сигналы нескольких ФБ в пределах одной пробы. Обратной стороной является потенциальная фототоксичность, обуславливаемая коротковолновым светом, возбуждающим флуоресценцию белков данного семейства. Первым представителем LSS RFP стал mKeima, полученный на основе хромопротеина из коралла *Montipora sp.* На спектре возбуждения флуоресценции mKeima два пика – при 440 и 586 нм [276]. Это обстоятельство затрудняет комбинацию mKeima с прочими красными белками, которые возбуждаются светом 586 нм. Параллельно с созданием mKeima вели работу по модификации линеек стандартных красных и дальнекрасных белков с целью придания им свойств LSS RFP. При облучении синим светом хромофор всех представителей данного семейства переходит в возбужденную нейтральную форму, которая по механизму ESPT трансформируется во флуоресцирующую анионную форму [277]. На базе mKate были созданы LSSmKate1 [278] и LSSmKate2 [278], которые обладают значительным преимуществом по сравнению с mKeima – их хромофор находится преимущественно в нейтральной форме, облегчая комбинацию данных белков с другими RFP. Молекулярной

основой, обуславливающей подобное поведение хромофора, стали несколько карбоксильных групп, внесенных в его окружение.

1.6.2.в Основные подходы создания сенсорных конструкций на основе флуоресцентных белков

Флуоресцентные белки предоставляют широкое поле возможностей для создания генетически кодируемых индикаторов. Принцип работы любого биосенсора такого типа заключается в изменении спектральных характеристик флуоресцентного ядра при специфическом взаимодействии сенсора с исследуемым соединением. Уникальность подобных молекулярно-биологических инструментов в том, что их ген может быть соответствующим образом доставлен и затем транскрибирован в живой клетке силами ее собственной машинерии. Используя возможности транзientной или стабильной экспрессии, можно создавать модельные системы любого уровня сложности – от бактерий до млекопитающих. Причем флуоресцентный сигнал индикатора в них может быть не только детектирован в режиме реального времени, но и локализован в пределах отдельных органелл, групп клеток или тканей. Благодаря этому стал возможен мультипараметрический имаджинг, растущая востребованность которого диктует необходимость расширения панели генетически кодируемых индикаторов, специфических к разным ионам и молекулам, а также обладающих разными спектральными свойствами.

В масштабе целого организма генетически кодируемые индикаторы позволяют визуализировать различные клеточные процессы, такие как нейрональная активность, сообщение между клетками иммунной системы и т. д. На клеточном уровне ГКС удобны для выполнения многих задач, и могут быть применены для изучения сложных взаимодействий во времени и пространстве между белками, нуклеиновыми кислотами и прочими молекулами.

Существует несколько подходов, реализуемых в дизайне генетически кодируемых биосенсоров. Сами по себе некоторые флуоресцентные белки, подвергнутые точечному мутагенезу, проявляют чувствительность к хлорид-анионам [279]. Также можно использовать **пару (редко – тройку) флуоресцентных ядер, способных взаимодействовать друг с другом по механизму FRET**. В этом случае между соответствующими хромофорами, находящимися в пределах не более чем 10 нм друг от друга, возможен перенос энергии. Соединение таких хромофоров посредством чувствительного домена делает возможным детекцию соответствующей сигнальной молекулы или события по факту наличия или отсутствия FRET между ними.

Выделяют несколько типов FRET-индикаторов. Самый простой вариант представляет собой два ФБ, связанных друг с другом линкером, который может быть узнан интересующей исследователя клеточной каспазой [280][281][282][283] (рис. 11А). После расщепления линкера каспазой характер флуоресценции такого сенсора меняется. Существенным недостатком индикатора такого типа является необратимость ответа. Ко второму типу популярных FRET-сенсоров относятся чувствительные к различным конформационным изменениям (рис. 11В). Подобные изменения в структуре специальным образом подобранного чувствительного линкера могут возникать как в ответ на появление в микроокружении определенных сигнальных соединений, так и при некоторых посттрансляционных модификациях, например, фосфорилировании [284][285][286][287][288]. Ответ таких индикаторов обратим, что существенно расширяет область их применения. Механическое воздействие также может быть стимулом, влияющим на сигнал FRET-индикатора (рис. 11С) [289][290], как и изменение некоторых условий микроокружения – рН или концентрации кислорода либо некоторых ROS (рис. 11D) [291][292][293].

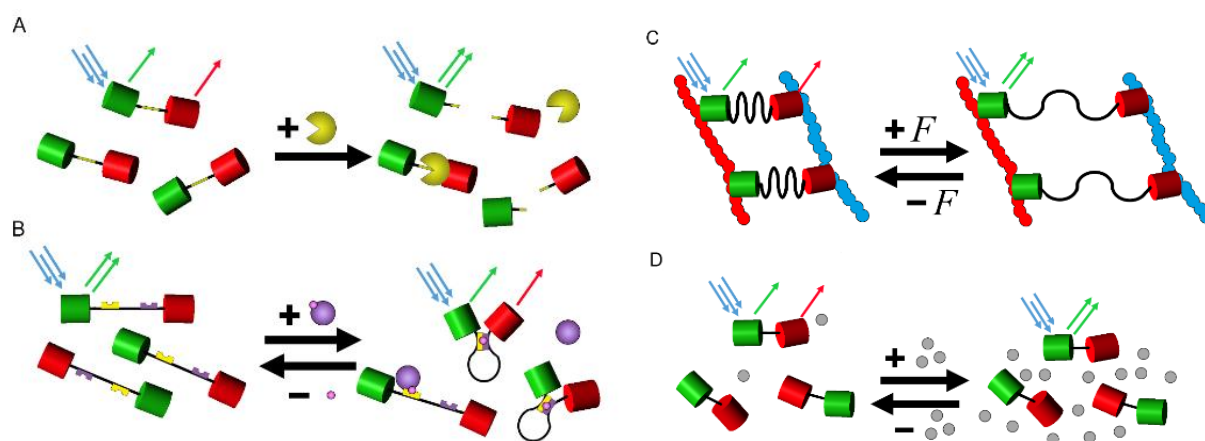


Рис. 11. Схема, иллюстрирующая основные принципы работы генетически кодируемых FRET-индикаторов, чувствительных к:

(А) активности каспаз, (В) конформационным изменениям, (С) механическому воздействию, (D) изменению условий микроокружения. Из [294] с изменениями.

Однако самыми популярными генетически кодируемыми индикаторами на настоящий день являются конструкции, основанные на единственном флуоресцентном ядре. Для того чтобы некое событие, например, взаимодействие биосенсора с определенным метаболитом, было трансдуцировано в детектируемый флуоресцентный сигнал, такие ядра подвергают модификациям. Цель всех изменений такого рода

заключается в придании конструкции определенной чувствительности, которая выражалась бы в изменении спектральных характеристик при соответствующем взаимодействии. Один из примеров таких модификаций – **круговая пермутация флуоресцентных белков**. Глобула флуоресцентного белка обладает высокой устойчивостью к изменению условий окружающей среды, однако конформационная подвижность важна для увеличения лабильности спектральных характеристик. Для этого используют подход круговой пермутации [295]. Его суть заключается в соединении (на уровне гена) нативных N- и C- концов белка гибким линкером, при этом новые концы формируются в пространственной близости с хромофором (рис. 12).

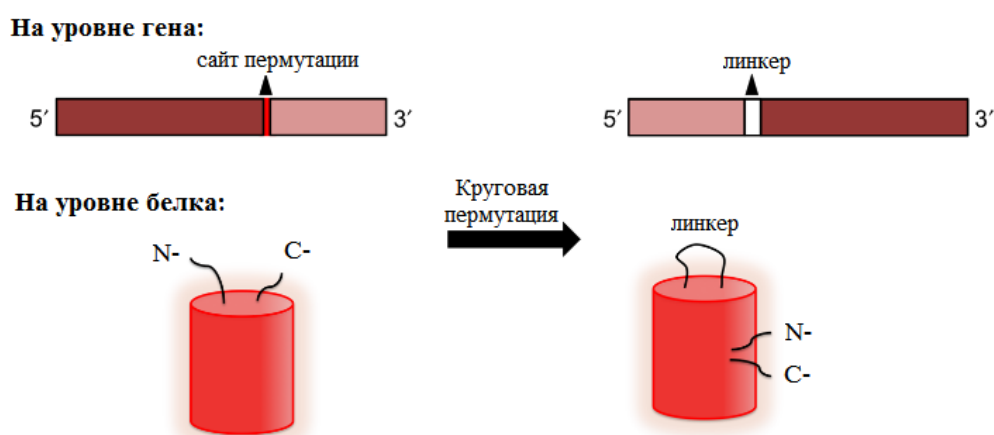


Рис. 12. Схема, иллюстрирующая принцип получения кругового пермутанта флуоресцентного белка.

Из [296] с изменениями.

Обычно разрыв вносят в районе 146-147 аминокислотного остатка GFP или GFP-подобного белка. Таким образом, окружение хромофора в пермутантах флуоресцентных белков становится более подвижным. Остается лишь выбрать сенсорный домен, который демонстрирует конформационные изменения при взаимодействии с исследуемой молекулой либо ионом, и присоединить его к новому N- или C-концу. В результате функционального цикла сенсорного домена его конформационные изменения будут переданы окружению хромофора, что потенциально повлияет на спектральные характеристики флуоресцентного белка. Типичными для сенсоров такого рода недостатками являются сравнительно низкая яркость флуоресценции и рН-чувствительность. Однако на базе круговых пермутантов разнообразных флуоресцентных белков был создан ряд индикаторов, успешно зарекомендовавших себя в

исследовательской работе. Среди них такие значимые, как биосенсоры пероксида водорода из семейства HyPer [297][298][299][300], линейки кальций-специфических G-CaMP [301], GECO [302] и индикаторы соотношения NAD^+/NADH [303][304][305].

Рассмотрим подробнее устройство индикатора на базе кругового пермутанта флуоресцентного белка на примере **SoNar**, наиболее перспективного на данный момент сенсора NAD^+/NADH [305]. Он состоит из двух молекул cpYFP (кругового пермутанта YFP), каждая из которых встроена между двумя субъединицами бактериального транскрипционного фактора T-Rex, чувствительного к изменению редокс-статуса NAD^+/NADH (рис. 13А). Спектр возбуждения флуоресценции SoNar двухпиковый с максимумами при 420 и 485 нм. Ответ индикатора ратиометрический – флуоресценция в максимумах возбуждения при колебаниях концентрации NAD^+ и NADH изменяется разнонаправлено (рис. 13В). Отличительной особенностью SoNar в ряду прочих индикаторов на базе cpYFP является сравнительно большой динамический диапазон его ответа – он достигает 8-кратного изменения в живых клетках.

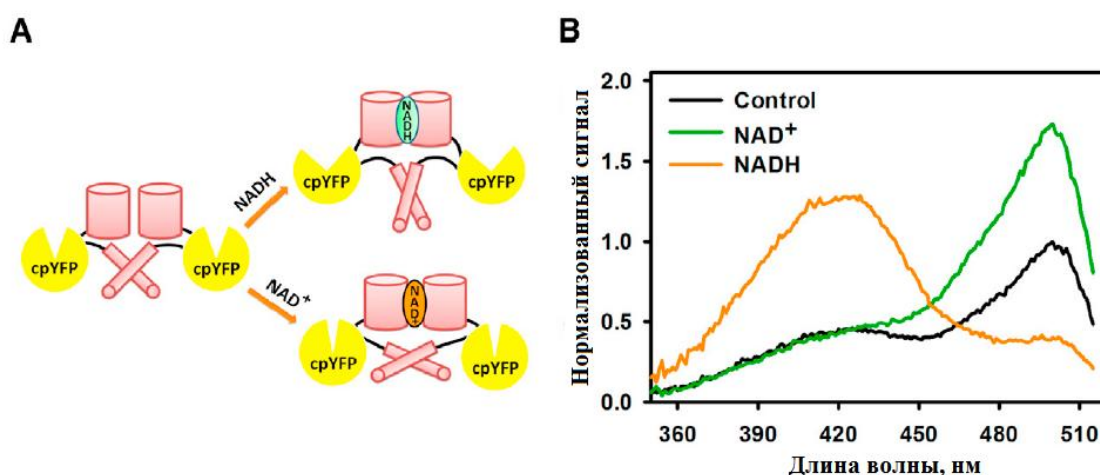


Рис. 13. SoNar – генетически кодируемый индикатор соотношения NAD^+/NADH на базе кругового пермутанта флуоресцентного белка YFP.

(А) Схема строения и принцип работы SoNar.

(В) Спектры возбуждения флуоресценции индикатора SoNar: очищенный белок без добавок (черная линия), окисленный белок после внесения 20 μM NAD^+ (зеленая линия) и восстановленный белок с 20 μM NADH (оранжевая линия).

Из [305] с изменениями.

Как было сказано ранее, одним из основных недостатков сенсоров с флуоресцентным ядром cpYFP является их чувствительность к изменениям pH в

физиологическом диапазоне значений. Это ограничивает спектр их применения, особенно при работе со сложными модельными объектами *in vivo*, и вынуждает использовать дополнительные рН контроли. Однако авторы SoNag позиционируют его как индикатор, относительно нечувствительный к колебаниям рН в физиологическом диапазоне 7.0-8.0 [305].

Другим способом, позволяющим придать чувствительность флуоресцентному ядру, в частности, чувствительность к редокс-изменениям, является **внесение в структуру т.н. активных остатков цистеина**. Положения для подобных замен выбирают таким образом, чтобы цистеины располагались в пространственной близости с хромофором. В таком случае при изменении окислительно-восстановительного статуса микроокружения активные цистеины способны формировать дисульфидную связь. Это, в свою очередь, вызывает конформационные изменения в молекуле ФБ и отражается на спектральных характеристиках хромофора. Таким образом были получены первые индикаторы общего редокс-статуса, ставшие отправной точкой для создания специфических биосенсоров редокс-статуса глутатиона. Данная группа сенсорных конструкций рассмотрена далее.

1.6.2.г Генетически кодируемые флуоресцентные биосенсоры для регистрации редокс-состояния пула глутатиона

Первый индикатор клеточного редокс-статуса, **rxYFP**, был создан на базе желтого флуоресцентного белка YFP [306]. В структуру YFP была внесена пара цистеинов в положения 149 и 202, в результате чего при формировании между ними дисульфидного мостика происходит сдвиг 10-ого β-тяжа бочки ФБ. Акт формирования дисульфидной связи приводит к снижению интенсивности флуоресценции rxYFP в 2,2 раза [306]. Отсутствие какой бы то ни было специфичности делают данное флуоресцентное ядро индикатором на общее изменение редокс-статуса. Однако, на основе rxYFP были созданы пробы, которые использовали для детекции хлорид-аниона в нейрональных синапсах [307]. Индикатор rxYFP обладает множеством недостатков, среди которых низкая скорость реакции, отсутствие ратиометрических свойств и рН-чувствительность в физиологическом диапазоне значений.

Сенсоры из семейства **roGFPs** [308] стали закономерным продолжением ветви редокс-чувствительных индикаторов, родоначальником которой стал rxYFP. В качестве основы для создания этих сенсорных белков были использованы GFP дикого типа и EGFP, в структуру которых были внесены активные цистеины в положения 147 и 204. Наиболее

популярные из полученных в результате этих манипуляций сенсоры получили названия roGFP1 и roGFP2. Спектры возбуждения флуоресценции обоих белков двухпиковые с двумя максимумами – при 405 нм и 488 нм. При окислении roGFP2 интенсивность флуоресценции при 405 нм растет, а при 488 – падает (рис. 14). В случае roGFP1 поведение пиков обратное. Данные особенности позволяют использовать данные конструкции как полноценные ратиометрические индикаторы. В дальнейшем roGFP2 получил более широкое распространение по сравнению с roGFP1 из-за большей амплитуды ответа, который он развивает при окислении – в среднем в 3 раза. Последующая обработка данных с учетом ратиометрических свойств roGFP2 увеличивает его динамический диапазон до 7 раз. Возбуждение флуоресценции roGFP2 с помощью высокоточных приборов непосредственно в 405 ± 5 нм и 488 ± 5 нм позволяет дополнительно расширить динамический диапазон вплоть до 12 раз. Очевидным недостатком индикаторов семейства roGFP является низкая скорость установления равновесия между их редокс-чувствительными цистеинами и микроокружением.

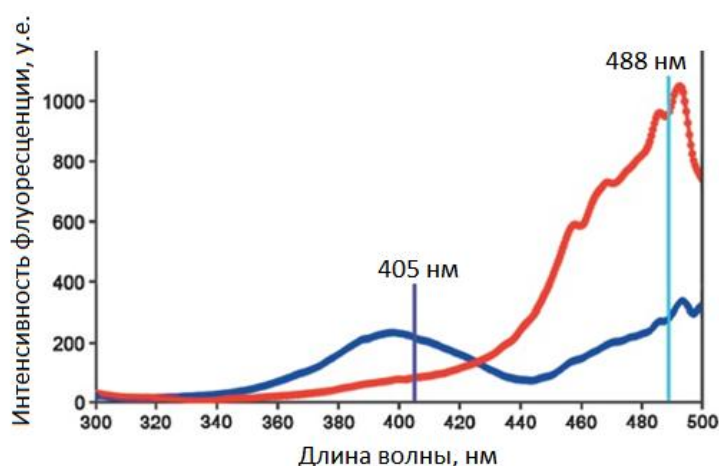


Рис. 14. roGFP2 – редокс-чувствительный флуоресцентный белок, обладающий ратиометрическим ответом на окисление.

Спектры возбуждения флуоресценции восстановленного (красная линия) и окисленного (синяя линия) индикатора roGFP2. Спектр возбуждения индикатора roGFP2 двухпиковый с двумя максимумами при 405 и 488 нм. При окислении roGFP2 интенсивность флуоресценции, возбуждаемой при 405 нм, растет, а флуоресценции, возбуждаемой при 488 нм, наоборот – снижается. Такое свойство индикаторов, обуславливаемое независимым поведением двух пиков, называют ратиометричностью. По [309] с изменениями.

Сенсорные белки *rxYFP* и *roGFPs* изначально позиционировали, как индикаторы общего изменения редокс-статуса, без привязки к какой-либо определенной редокс-паре. Это произошло по той причине, что довольно долго оставалось невыясненным, с какими именно ферментативными системами поддержания окислительно-восстановительного гомеостаза они взаимодействуют. Наблюдение, согласно которому меньшее количество пероксида водорода необходимо для окисления индикаторов, экспрессирующихся в цитоплазме клеток HeLa, по сравнению с аналогичными индикаторами в условиях эксперимента *in vitro* [310], может свидетельствовать о том, что окисление *roGFPs* внутри клетки опосредовано дополнительным участником. Инкубация клеток HeLa с BSO, специфическим ингибитором синтеза GSH, приводила к окислению *roGFPs* и увеличению чувствительности данных сенсоров к экзогенному пероксиду водорода. Это связывает окисление *roGFPs* с состоянием внутриклеточного пула глутатиона. В то же время было показано, что в клетках дрожжей *rxYFP* взаимодействует с Grx, но не взаимодействует с Trx [311]. Кроме того не было обнаружено какой бы то ни было связи между *roGFPs* и таким внутриклеточным восстановителем, как аскорбат [312]. Таким образом, было выяснено, что внутри клетки *rxYFP* и *roGFPs* взаимодействуют с глутаредоксин-зависимой системой регуляции тиол-дисульфидного обмена и детектируют изменение такого важного клеточного показателя, как соотношение GSH/GSSG. Причем, судя по всему, внутриклеточный ответ *roGFPs* ограничен доступностью Grx. Это значит, что различия в активности и распределении изоформ Grx между разными типами клеток и клеточными компартментами влияют на характер взаимодействия *roGFPs* с глутатионом. Было высказано предположение, что Grx, соединенный напрямую с *rxYFP* или *roGFP*, сможет обеспечивать стабильное равновесие между двумя редокс-парами: $roGFP_{red}/roGFP_{ox}$ и $2GSH/GSSG$.

Были созданы конструкции, в которых редокс-чувствительное флуоресцентное ядро посредством гибкого линкера соединили с Grx1. Так появился индикатор **Grx1-roGFP2**, в котором человеческий глутаредоксин-1 расположен на N-конце редокс-чувствительного флуоресцентного белка *roGFP2* [313]. Флуоресцентное ядро *roGFP2* было выбрано, поскольку оно ярче, чем *roGFP1*, кроме того, дополнительная мутация S65T, содержащаяся в его структуре, делает его устойчивым к фотообесцвечиванию [314]. Между *roGFP2* и Grx1 расположен линкер из 30 аминокислотных остатков (Gly-Gly-Ser-Gly-Gly)₆, чтобы две составные части белкового комплекса находились пространственно близко и могли беспрепятственно взаимодействовать друг с другом.

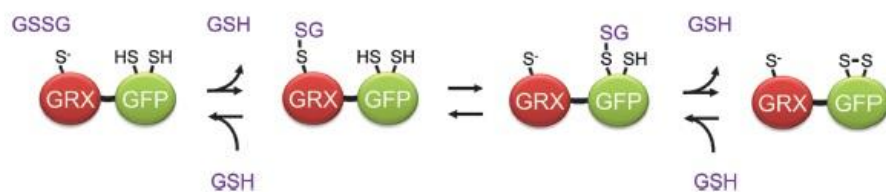


Рис. 15. Схематическое изображение принципа работы индикатора Grx1-roGFP2.

Сенсорный домен Grx1, связанный с флуоресцентным ядром roGFP2 гибким линкером, опосредует установление равновесия между пулом глутатиона и roGFP2 [309].

Функциональный цикл Grx1-roGFP2 основан на моностиольном механизме работы глутаредоксина (рис. 15) [315]. Этот механизм подразумевает участие только одного цистеинового остатка Grx в формировании связи с глутатионом. В ответ на окисление этот цистеин (Cys23 для Grx1) специфически взаимодействует с GSSG, в результате чего образуется промежуточный продукт - смешанный дисульфид Grx1-SSG. Этот интермедиат взаимодействует с одним или двумя цистеинами roGFP2, после чего они глутатионируются. Затем происходит замыкание дисульфидной связи между остатками Cys147 и Cys204 молекулы roGFP2. Следует отметить, что все реакции функционального цикла Grx1-roGFP2 обратимы и находятся в динамическом равновесии с актуальным в соответствующий момент редокс-статусом глутатиона.

Функциональные тесты показали, что химерный белок Grx1-roGFP2 позволяет регистрировать изменения редокс-статуса глутатиона гораздо быстрее исходного roGFP2 (рис. 16А и В). Полученный сенсор чувствителен к наномолярным изменениям концентрации GSSG и миллимолярным GSH, во временном интервале от нескольких секунд до нескольких минут [316].

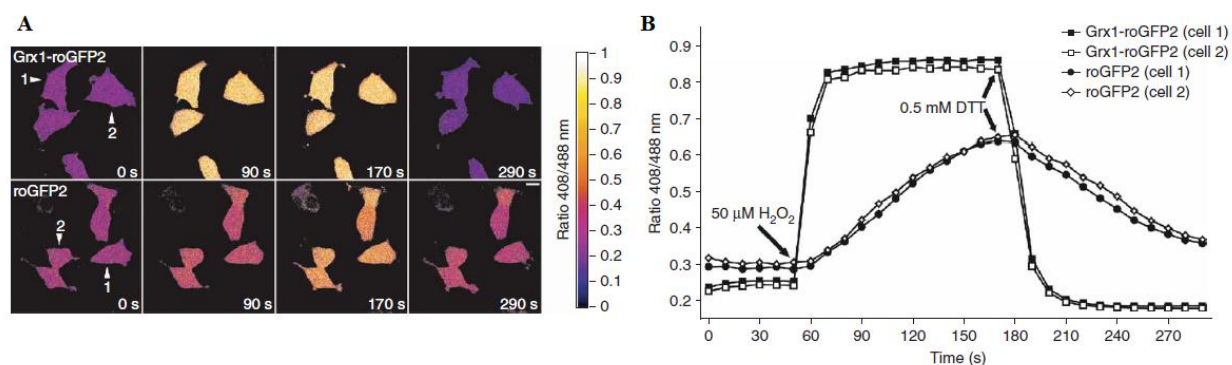


Рис. 16. Динамика ответа генетически кодируемых индикаторов Grx1-roGFP2 и roGFP2 при окислении экзогенным пероксидом водорода.

(А) Фотографии клеток HeLa Kyoto, экспрессирующих Grx1-roGFP2 либо roGFP2 в цитоплазме, в соответствующие отметкам моменты времени. Флуоресценцию индикаторов возбуждали лазерами 408 и 488 нм, после чего рассчитывали соотношение эмиссий в зеленом канале (500-530 нм). Через 50 секунд после начала съемки к клеткам добавляли H_2O_2 до конечной концентрации 50 μM , а спустя еще 2 минуты – 500 μM DTT. Изображения получены с помощью флуоресцентного микроскопа и окрашены в псевдоцвета. Цветовая шкала соответствует «ratio 408/488» (значениям соотношения эмиссий, возбуждаемых при 408 и 488 нм): от 0 до 1.

(В) То же, что А, в графическом виде [316].

Таким образом, Grx1-roGFP2 представляет собой сенсор, удовлетворяющий большинству стандартных требований, которые предъявляют к генетически кодируемым индикаторам: он не токсичен, быстрый, чувствительный и специфично взаимодействует только с одной редокс-парой, а именно – GSSG/GSH. Grx1-roGFP2 нашел множество приложений. Например, он был первым сенсором, успешно использованным для прижизненной «in-tissue» микроскопии редокс-изменений на модели человеческого сердца [317], а также для детекции быстрых редокс-колебаний в митохондриях нейронов живой мыши [318], для картирования редокс-потенциала глутатиона в субклеточных компартаментах в ходе эмбриогенеза *D. melanogaster* [319] и многого другого.

1.6.2.д Индикаторы глутатиона для компарментов с высоким редокс-потенциалом

Изучение клеточной редокс-биологии тесно связано с понятием редокс-компарментализацией клетки. Разные органеллы обладают разными окислительно-восстановительными потенциалами, например, у митохондрий и ядра они ниже, чем в цитоплазме. В случае митохондрий окислительно-восстановительный потенциал

составляет около -280 мВ [320], являясь самым низким в клетке по сравнению с цитоплазмой (-260 — -200 мВ [321]). Таким образом, пул глутатиона в матриксе митохондрий и в ядре находится в более восстановленном состоянии по сравнению с пулом цитоплазмы. Обратная картина наблюдается в люмене ЭПР, редокс-потенциал которого составляет около -189 мВ [322]. Поэтому в ЭПР самое низкое соотношение GSH/GSSG в клетке – между 3/1 и 1/1 вместо цитоплазматических 30/1 - 100/1 [323].

Для того чтобы отслеживать редокс-изменения во всех компартментах клетки необходим набор различных редокс-чувствительных сенсоров с разными окислительно-восстановительными потенциалами. Для детекции изменений редокс-статуса в каком-либо клеточном компартменте предпочтительнее использовать сенсоры, окислительно-восстановительный потенциал которых соответствует среднему значению для этого компартмента. Редокс-потенциал *rxYFP* составляет -261 мВ [306], *roGFP2* — -291 мВ [310]. То есть область применения этих сенсоров ограничена клеточными компартментами с низким значением окислительно-восстановительного потенциала. Они не пригодны для изучения редокс-статуса, например, ЭПР, т.к. в люмене ЭПР и *rxYFP*, и *roGFP1/2* находятся в полностью окисленном состоянии. Для того, чтобы охватить большую часть компартментов клетки, была разработана целая линейка *roGFPs* (***roGFP3***, ***4***, ***5*** и ***roGFP6*** [308]) с разными редокс-потенциалами.

RoGFP3 и *4* отличаются от исходных *roGFPs* позициями активных цистеинов – 149/202 вместо 147/204. *RoGFP5* и *6* содержат четыре остатка цистеина в положениях 147, 149, 202 и 204, предполагали, что они могут формировать две дисульфидных связи. Однако 5-ый и 6-ой варианты сенсорного белка не были детально изучены и дальнейшего распространения не получили. Несмотря на то, что динамический диапазон ответа на окисление у *roGFP3* и *4* меньше, чем у исходных форм, их окислительно-восстановительные потенциалы несколько ниже. Так, для *roGFP3* он составляет -219 мВ [308]. Окислительно-восстановительный потенциал *roGFP3* позволял производить более точные, по сравнению с другими *roGFPs*, измерения в клеточных компартментах с низким окислительно-восстановительным потенциалом, но его величина по-прежнему была недостаточно низка.

Наибольшее распространение получила серия ***roGFP-iX*** [324], где под «X» подразумевается аминокислотный остаток, встроенный в непосредственной близости от Cys147. При внесении в положение 148 лейцина или глутамата удалось получить наиболее положительные окислительно-восстановительные потенциалы. Их величина для *roGFP-iL* и *roGFP-iE* составляет -229 и -236 мВ, соответственно [324].

1.6.2.е Красные флуоресцентные редокс-индикаторы

Как уже было сказано ранее, красные флуоресцентные белки обладают рядом преимуществ в условиях микроскопии *in vivo* по сравнению со своими зелеными аналогами. Однако необходимость создания индикаторов на основе RFP была продиктована не только тем фактом, что они менее фототоксичны, и их детекция не затруднена автофлуоресценцией. Привлекательной представлялась также потенциальная возможность осуществлять мультипараметрический имаджинг, комбинируя разноцветные сенсоры в пределах одной системы. Долгое время не существовало каких бы то ни было генетически кодируемых индикаторов на базе красных флуоресцентных белков, специфических к паре 2GSH/GSSG. А общая представленность красных индикаторов среди всего разнообразия подобных инструментов ограничивалась чувствительным к пероксиду водорода HyPerRed [325] и группой из нескольких кальциевых R-GECOs [326], причем среди последних флуоресценция многих возбуждается коротковолновым синим светом.



Рис. 17. Принцип работы флуоресцентного редокс-чувствительного ядра rxRFP.

Нативные N- и C-концы флуоресцентного белка mApple соединили линкером, сформировав новые концы в пространственной близости с хромофором. Дополнительно в структуру вновь образованных концов внесли редокс-чувствительные цистеины, образующие дисульфидную связь при окислении микроокружения. Полученный круговой пермутант mApple позиционируется как неспецифический индикатор общего окисления. Из [327] с изменениями.

Первые попытки получить редокс-чувствительное красное ядро были предприняты с белком mKeima, однако успехом не увенчались [35]. Затем в 2015 году на основе кругового пермутанта из кальциевого сенсора R-GECO1 [36] был получен белок, названный **rxRFP** [327]. Для этого в структуру smApple внесли пару активных

цистеинов, после чего их окружение оптимизировали по аминокислотному составу и длине (рис. 17). Максимум возбуждения флуоресценции gxRFP находится при 576 нм, а эмиссии – при 600 нм. При окислении интенсивность флуоресценции gxRFP увеличивается, достигая амплитуды ответа до 4-х раз [327]. Однако, индикатор gxRFP не получил широкого распространения из-за комплекса существенных недостатков. Его ответ развивается достаточно медленно, он, как и большинство круговых пермутантов, рН-чувствителен и требует использования соответствующего контроля. Отсутствие специализированного сенсорного домена и экспонированные на поверхность β-бочки активные цистеины, легко подвергаемые окислению, в совокупности делают его ответ неспецифичным (рис. 18).

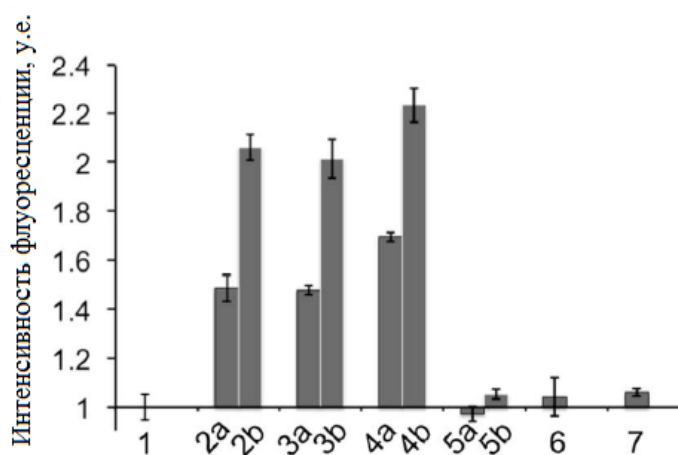


Рис. 18. Специфичность редокс-чувствительного флуоресцентного ядра gxRFP.

Изменения флуоресценции gxRFP при взаимодействии с разнообразными окислителями:

- 1 – PBS (контроль);
- 2 – GSSG 100 μM (a) и 1 mM (b);
- 3 – O₂ 1 μM (a) и 10 μM (b);
- 4 – ONOO⁻ 10 μM (a) и 100 μM (b);
- 5 – H₂O₂ 100 μM (a) и 1 mM (b);
- 6 – OCl⁻ 100 μM;
- 7 – ·OH (100 μM H₂O₂ + 1 mM Fe²⁺).

Из [327] с изменениями.

В 2017 году была предпринята попытка создания химерного сенсорного белка на основе ядра gxRFP, обладающего более специфичным ответом. Для этого к N-концу gxRFP просоединили человеческий Trx1 (рис. 19). Полученная конструкция, **TrxRFP1**, согласно опубликованному исследованию, отражает внутриклеточный редокс-статус статус

тиоредоксина, который является вторым после глутатиона внутриклеточным восстановителем пептидной природы [328]. Максимальная амплитуда ответа данного индикатора при экспрессии в клеточных культурах достигает 3-кратного изменения, а скорость ответа сравнима с таковой для Grx1-roGFP2 в условиях одной системы [328]. Индикатор TrxRFP1 успешно использовали на культурах разнообразных эукариотических клеток в режиме мультипараметрической съемки в комбинации с Grx1-roGFP2 для отслеживания динамики редокс-колебаний в пулах тиоредоксина и глутатиона, параллельно в разных компартментах при воздействии стимулов разного рода [328]. При этом все недостатки, присущие ядру rxRFP и во многом обусловленные природой круговых пермутантов, в полном объеме есть и у химерного TrxRFP1.

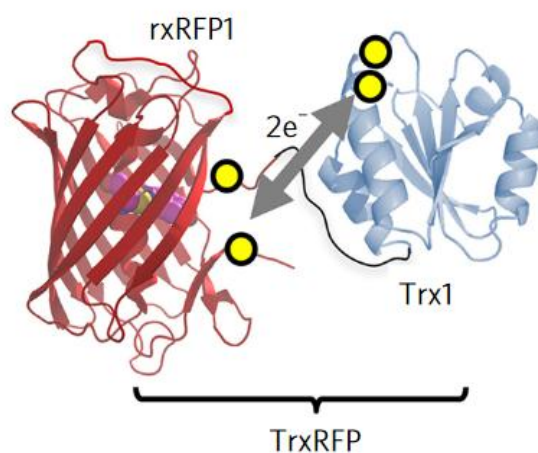


Рис. 19. Схематическое изображение индикатора пула тиоредоксина TrxRFP1.

Желтым отмечены активные цистеины в структуре флуоресцентного ядра rxRFP1 и сенсорного домена Trx1. Стрелка иллюстрирует направление тока электронов между двумя функциональными частями сенсора. Из [328].

Таким образом, к 2019 году панель флуоресцентных генетически кодируемых лиганд-специфических индикаторов, эмиссия которых находится в красной области спектра, ограничена представителями, созданными по принципу круговой пермутации. Типичная для пермутантов рН-чувствительность вынуждает использовать эти сенсоры в комплексе с соответствующими контролями. При этом среди них нет ни одного, специфически чувствительного к изменениям редокс-статуса внутриклеточного пула глутатиона.

Настоящая работа посвящена разработке индикатора, специфически отражающего редокс-статус пары 2GSH/GSSG и обладающего спектральными характеристиками красного флуоресцентного белка. Для придания редокс-чувствительности флуоресцентному ядру было решено не прибегать к круговой пермутации, а ограничиться внесением активных цистеинов в пространственной близости с хромофором. Чтобы ответ сенсора был специфичен и отражал состояние именно пула глутатиона, воспользовались принципом, реализованным ранее в Grx1-roGFP2.

Красный флуоресцентный сенсор редокс-статуса глутатиона будет иметь широкое применение для визуализации окислительно-восстановительных процессов не только в субклеточных компартментах, но и, благодаря своим свойствам, на уровне целого организма. Красный индикатор также имеет высокий потенциал для реализации в условиях мультипараметрической микроскопии при комбинации с сенсорными белками, обладающими другими спектральными свойствами.

2. ЦЕЛИ И ЗАДАЧИ

Цель настоящей работы заключалась в создании и последующем применении генетически кодируемого индикатора для регистрации динамики изменения соотношения 2GSH/GSSG на основе красного флуоресцентного белка. Для достижения поставленной цели были сформулированы и реализованы следующие задачи:

- 1) Создать версии молекулярно-генетических конструкций биосенсора для регистрации соотношения 2GSH/GSSG на основе красных флуоресцентных белков. Провести тестирование полученных вариантов; оптимизировать свойства отобранной версии биосенсора.
- 2) Детально охарактеризовать свойства полученного индикатора в системе *in vitro*.
- 3) Протестировать полученный индикатор в культуре живых клеток в условиях мультипараметрической микроскопии в комбинации с существующими редокс-биосенсорами.
- 4) Протестировать полученный индикатор *in vivo* в тканях модельного объекта рыбы *Danio rerio*.

3. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

3.1 Молекулярно-биологические методы

3.1.1 Амплификация ДНК

Амплификацию фрагментов ДНК проводили с помощью термоциклера С-1000 (BioRad) методом ПЦР. Стандартный протокол амплификации предполагал использование ДНК-матрицы (10-50 нг), праймеров (10 μ М, синтезированных на заказ компанией Евроген), dNTPs (0.5 μ М, Евроген) и термостабильной полимеразы (Tersus, Encyclo, обе – Евроген) с коммерческим буфером.

При сборке конструкций слияния, состоящих из нескольких фрагментов, использовали метод «Overlap extension» ПЦР. В этом случае применяли 2 пары праймеров: короткие концевые и более длинные, несущие перекрывающиеся участки длиной 10-25 п.н. Этот же метод использовали для направленного мутагенеза версий индикатора Grx1-roCherry, с той разницей, что при дизайне перекрывающихся участков неконцевых праймеров в их последовательность вносили необходимые нуклеотидные замены.

3.1.2 Электрофорез в агарозном геле

Для анализа и разделения фрагментов ДНК и РНК пользовались методом электрофореза в 1% агарозном геле. Для приготовления геля агарозу плавил в ТАЕ буфере, содержащем 0.5 μ г/мл EtBr. Этот же буфер использовали в электрофоретической камере. Перед нанесением в лунки геля образцы нуклеиновых кислот смешивали с 2 либо 5 μ л буфера нанесения (Gel Loading Dye, Blue, Евроген) в случае аналитического или препаративного электрофореза, соответственно. Визуализацию фрагментов проводили в анализаторе Alpha Imager 2000. Для вырезания необходимых фрагментов из геля задействовали трансиллюминатор TF20M.

3.1.3 Выделение ДНК из агарозного геля

После проведения препаративного электрофореза фрагменты ДНК выделяли из кубиков геля с помощью коммерческих наборов для очистки Cleanup Standard (Евроген) согласно протоколу производителя.

3.1.4 Рестрикция

В настоящей работе для рестрикции ДНК использовали эндонуклеазы рестрикции BamHI, HindIII, ClaI, XbaI, NotI производителей СибЭнзим, NEB, Thermo Scientific и соответствующие коммерческие буферы. Так как эндонуклеаза рестрикции NotI

блокируется CpG-метилованием, плазмиду, которую предполагали ей рестрицировать, предварительно нарабатывали в клетках *E.coli* неметилирующего штамма JM110 или ER2925. Пробы для рестрикции готовили согласно рекомендациям производителя. Успешность рестрикции оценивали методом электрофореза в агарозном геле. Полученные в результате фрагменты перед дальнейшим использованием очищали с помощью коммерческого набора для очистки Cleanup Standard (Евроген) согласно протоколу производителя.

3.1.5 Лигирование

Лигирование фрагментов ДНК проводили в объеме 10 μ л с использованием лигазы T4 (Евроген) и соответствующего коммерческого буфера, в течение ночи при 14°C. При приготовлении пробы использовали соотношение количества вектор:вставка 1:3.

Полученной смесью трансформировали химические или электрические компетентные клетки *E.coli* штамма XL1Blue. Выросшие колонии скринировали методом ПЦР с использованием коммерческого премикса Screenmix (Евроген) и специфических праймеров, один из которых отжигался на участке вектора, а второй был комплементарен вставке.

3.1.6 Выделение плазмидной ДНК

Для наработки плазмидной ДНК химические либо электрические компетентные клетки *E.coli* трансформировали необходимой плазмидой. Один из выросших клонов переносили в 7-100 мл жидкой среды LB с соответствующим антибиотиком и подращивали при 37°C при постоянном перемешивании в течение 14-16 часов. Затем плазмидную ДНК выделяли из бактериальной биомассы с помощью коммерческих наборов Plasmid Miniprep (Евроген), Plasmid Midiprep 2.0 (Евроген) или QIAGEN-tip 100 (Qiagen) согласно протоколу производителя. Элюировали плазмидную ДНК всегда водой milliQ. Концентрацию выделенных плазмид определяли посредством спектрофотометра NanoDrop2000 (Thermo Scientific). При необходимости корректность нуклеотидной последовательности фрагментов проверяли с помощью секвенирования (Евроген).

3.2 Работа с препаратом очищенного белка

3.2.1 Получение препарата очищенного белка

Для получения препарата очищенного белка Grx1-roCherry компетентные клетки *E.coli* штамма XL1Blue трансформировали плазмидой pQE30-Grx1-roCherry. Затем бактерий переносили на твердую среду LB-агар с добавлением ампициллина (100 μ г/мл) и

подращивали при 37°C в течение 14 часов. Для достижения правильного фолдинга белка и созревания его хромофора бактериальные колонии дополнительно инкубировали при 17°C на протяжении 24 часов. После чего бактерий смывали с помощью раствора PBS (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 1.8 mM KH₂PO₄, pH 7.4) с добавлением 5 mM 2-меркаптоэтанола.

Объем получившейся суспензии доводили до 30 мл тем же буферным раствором, для разрушения клеточных стенок бактерий подвергали соникации (Sonic Vibra cell) на ледяной бане в течение 30 минут, согласно следующей программе: цикл «5 секунд звук:10 секунд пауза» с амплитудой 32%. Клеточный лизат центрифугировали на 20.000 x g при 4°C 25 минут.

Очистку белка из супернатанта осуществляли посредством металл-аффинной хроматографии (Talon Metal Affinity Resin, Clontech). Для этого лизат после соникации полностью наносили на колонку с 3.5 мл смолы, предварительно уравновешенную PBS, содержащим 5 mM 2-меркаптоэтанола. Колонку промывали 25 мл того же буферного раствора, после чего белок элюировали, используя раствор PBS, содержащий 250 mM имидазола и 5 mM 2-меркаптоэтанола. Для того чтобы очистить полученный белок от имидазола и восстанавливающего агента, его наносили на колонку, содержащую 10 мл Sephadex G-25 (GE Healthcare) и уравновешенную раствором PBS. Все буферные растворы, использовавшиеся во время выделения белка, держали на льду.

Белок Grx1-roCherry, являясь редокс-чувствительным, склонен окисляться в ходе процедуры очистки из бактериального лизата. По этой причине после гель-фильтрации данный белок инкубировали на льду в присутствии 20 mM DTT в течение 1 часа. После чего DTT удаляли посредством центрифугирования в колонках с фильтрами (Amicon Ultra-0.5 mL Centrifugal Filters) на 14.000 x g, 35 минут при 4°C.

3.2.2 Определение спектральных характеристик

Белок Grx1-roCherry легко окисляется в ходе манипуляций, поэтому определение спектральных характеристик осуществляли для его полностью окисленной формы. Для этого аликвоту очищенного белка растворяли в 1 мл PBS, переносили в кювету и производили необходимые измерения.

Для определения максимума поглощения Grx1-roCherry регистрировали его спектр поглощения в диапазоне длин волн 400-700 нм.

Молярный коэффициент экстинкции определяли, пользуясь следующей формулой:
 $\epsilon = A \cdot C^{-1} \cdot L^{-1}$, где A – оптическая плотность образца в максимуме поглощения, C – концентрация белка (M), L – длина оптического пути (см).

Чтобы определить квантовый выход флуоресценции Grx1-roCherry, регистрировали спектр его эмиссии, возбужденной при 589 нм. Аналогичную процедуру проделывали с очищенным белком mCherry, взятым в такой же концентрации. Затем рассчитывали квантовый выход Grx1-roCherry по следующей формуле: $QY_{Grx1-roCherry} = QY_{mCherry} * (A_{mCherry} * Em_{Grx1-roCherry} * A_{Grx1-roCherry}^{-1} * Em_{mCherry}^{-1})$, где A – оптическая плотность в максимуме поглощения (при 589 нм), Em – интенсивность эмиссии в максимуме эмиссии (при 610 нм), $QY_{mCherry}$ – стандартная величина (0,22). Для определения концентраций белков пользовались коммерческим набором Bicinchoninic Acid Protein Assay Kit (Sigma). Спектры регистрировали с помощью спектрофлуориметра Varian Cary Eclipse.

3.2.3 Определение pH-чувствительности

Для определения pKa белка Grx1-roCherry готовили ряд буферных растворов с заданными значениями pH. Список использованных растворов и их состав приведен ниже:

pH = 3.0 (40 mM $Na_3C_6H_5O_7$ - 60 mM HCl),

pH = 3.5 (47 mM $Na_3C_6H_5O_7$ - 53 mM HCl),

pH = 4.0 (56 mM $Na_3C_6H_5O_7$ - 44 mM HCl),

pH = 4.5 (80 mM $Na_3C_6H_5O_7$ - 28 mM mM),

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 $Na_2B_4O_7$ - 44 mM HCl),

pH = 8.5 (31 mM $Na_2B_4O_7$ - 38 mM HCl),

pH = 9.0 (43 mM $Na_2B_4O_7$ - 14 mM HCl),

pH = 9.5 (39.5 mM $Na_2B_4O_7$ - 21 mM NaOH).

Процедура pH-титрования заключалась в последовательном добавлении аликвот концентрированного белка Grx1-roCherry (5 μ л, в PBS) к 1 мл каждого из буферных растворов, описанных выше. Затем интенсивность флуоресценции Grx1-roCherry в каждой из полученных проб детектировали с использованием спектрофлуориметра Varian Cary Eclipse.

3.2.4 Оценка чувствительности к GSH

Индикатор Grx1-roCherry очень чувствителен к окисленной форме глутатиона. Чтобы оценить чувствительность данного индикатора к восстановленной форме

глутатиона аликвоту очищенного белка Grx1-roCherry растворяли в 1 мл PBS, содержащего 1 mM GSH, 2 mM NADPH и 100-300 U/мл глутатион редуктазы дрожжей (Sigma), до конечной концентрации 40 нМ. После чего пробу инкубировали 40 минут при комнатной температуре. NADPH и глутатион редуктаза при этом позволяли восстановить следовые количества GSSG, неизбежно присутствующие в коммерческом реагенте GSH. После инкубации интенсивность флуоресценции пробы регистрировали с помощью спектрофлуориметра Varian Cary Eclipse.

3.2.5 Оценка специфичности

Также для индикатора Grx1-roCherry была оценена специфичность к различным окислителям. Для этого аликвоту очищенного белка Grx1-roCherry растворяли в PBS до конечной концентрации 40 нМ и регистрировали интенсивность флуоресценции пробы сразу после внесения в раствор окислителя и в течение последующих 10 минут. В качестве отрицательного контроля использовали пробы, в которые вместо окислителя вносили PBS в соответствующем объеме.

В качестве донора супероксид-радикала использовали ксантин (50 μ M, Sigma) и ксантин оксидазу (0.25 U/мл, Sigma). Донором NO служил МАНМА NONOate (Sigma).

3.2.6 Оценка окислительно-восстановительного потенциала

Эксперименты для оценки окислительно-восстановительного потенциала выделенных редокс-чувствительных белков проводили в PBS при pH 7.4. Оценку производили методом редокс-титрования, т.е. аликвоты редокс-чувствительного белка титровали буферными растворами с заведомо известным соотношением восстановленной и окисленной форм редокс-чувствительного соединения, для которого окислительно-восстановительный потенциал уже определен. В качестве такой редокс-пары мы использовали восстановленную и окисленную формы DTT. Суммарно концентрация обеих форм DTT составляла 1 mM, а концентрация титруемого белка – 40 нМ. Для установления равновесия пробу инкубировали на комнатной температуре в течение 3 часов. Затем регистрировали флуоресцентный сигнал индикаторов посредством спектрофлуориметра Varian Cary Eclipse: эмиссию Grx1-roCherry при 610 нм (F610) и соотношение эмиссий Grx1-roGFP2, возбуждаемых при 395 и 489 нм (F395/F489). Полученные значения нормировали на минимальные, после чего строили кривую зависимости их величин от окислительно-восстановительных потенциалов соответствующих буферов. Окислительно-восстановительные потенциалы буферных растворов рассчитывали по уравнению Нернста:

$$E_{\text{ДТТ}} = E_{\text{ДТТ}}^{0'} - ((RT)/(nF)) * \ln([ДТТ_{\text{red}}]/[ДТТ_{\text{ок}}]),$$

где $E_{\text{ДТТ}}^{0'}$ – стандартный электрохимический потенциал ДТТ при pH 7.0 и температуре 30°C (-0,323 В); R – универсальная газовая постоянная (8,314 Дж/моль*К); T – абсолютная температура (К); n – число передаваемых электронов (2); F – константа Фарадея (96490 Дж/моль/В).

Для пересчета величин полученных потенциалов с учетом значения pH пользовались следующим уравнением [329]:

$$E_{\text{pH}}^{0'} = E^{0'} - 60.1 \text{ мВ} * (\text{pH} - 7).$$

3.3 Работа с бактериальными клетками

3.3.1 Трансформация бактерий

Трансформировали компетентные клетки *E.coli* штамма XL1-Blue. Клетки для электрической трансформации хранили в бессолевом растворе глицерина при температуре -70°C, клетки для химической – в аналогичных температурных условиях в буфере, содержащем 0,1 М CaCl₂. Перед проведением любой из трансформаций фасовки клеток размораживали на льду, после чего к ним добавляли 10-100 нг ДНК в объеме, не превышающем 5 μ л.

Электропорацию проводили для трансформирования клеток лигированной ДНК. Клетки, предназначенные для электрической трансформации, после добавления ДНК переносили в предварительно охлажденные кюветы для электропорации (BioRad). Проводили электропорацию на приборе MicroPulser (BioRad), после чего сразу же переносили суспензию бактерий в 300 μ л среды SOB и инкубировали при перемешивании 45-60 минут при 37°C.

Химической трансформацией пользовались для трансформирования бактерий плазмидной ДНК. Для этого суспензию компетентных клеток с добавленной ДНК инкубировали в течение 1 минуты при 42°C (heat shock) и помещали в лед на 5 минут. После чего бактериальные клетки, трансформированные векторами с канамициновой устойчивостью, инкубировали в 300 μ л среды SOB 45-60 минут при 37°C при перемешивании. Клетки, для трансформации которых были использованы плазмиды, несущие ген устойчивости к ампицилину, после химической трансформации не подрачивали, лишь переносили в 300 μ л среды SOB.

Подготовленную описанным выше образом суспензию бактерий высевали на чашки Петри с твердой средой LB-агар, содержащей антибиотик ампициллин или канамицин в концентрации 50 мкг/мл и оставляли на 14 часов в термостате при 37°C.

3.3.2 Анализ флуоресценции суспензий бактериальных клеток

Первичную оценку таких характеристик флуоресцентного ядра в составе индикатора, как скорость созревания хромофора и яркость, осуществляли в суспензии бактериальных клеток. Сначала клетки *E.coli*, экспрессирующие версии сенсора на твердой среде в чашках Петри, помещали под флуоресцентный бинокулярный микроскоп (Olympus US SZX12) и визуально оценивали их яркость в течение первых суток после высевания. В качестве положительного контроля использовали опубликованный ранее зеленый индикатор Grx1-roGFP2. Интересующие клоны переносили на новую чашку Петри методом истончающегося штриха и подращивали в течение 14 часов при 37°C. Далее биомассу бактерий ресуспендировали в 1 мл PBS в кювете для флуориметра и, с помощью флуоресцентного спектрофотометра (Varian Cary Eclipse), оценивали спектральные характеристики флуоресцентных белков. Регистрировали спектры возбуждения флуоресценции в интервале 350-510 нм (эмиссия 540 нм) для Grx1-roGFP2 и в интервале 500-600 нм (эмиссия 610 нм) для красных версий индикатора Grx1-roCherry. Для оценки функциональной активности версий индикатора сравнивали интенсивность флуоресценции пробы в норме и после добавления 5 мМ H₂O₂ в качестве неспецифического окислителя.

3.4 Работа с эукариотическими клетками

3.4.1 Ведение культур эукариотических клеток

Клетки линий HeLa Kyoto (коллекция EMBL) и HEK293 (ATCC) культивировали в среде RPMI1640 (ПанЭко) с добавлением 10% FBS (Biosera), 2 мМ L-глутамин (ПанЭко), 100 U/мл пенициллина (ПанЭко) и 100 мг/мл стрептомицина (ПанЭко) при 37 °С в атмосфере 5% CO₂. Рассаживание клеток проводили трижды в неделю с помощью 0.25% раствора Трипсин/ЭДТА на растворе Версена.

Для проведения экспериментов по флуоресцентной микроскопии клетки рассаживали на 35-мм чашки FluoroDishes со стеклянным дном (World Precision Instruments) либо 8-луночные μ -слайды (Ibidi).

3.4.2 Получение смешанной культуры мышинных первичных эмбриональных кортикальных нейронов

Смешанную культуру мышинных первичных эмбриональных кортикальных нейронов получали по протоколу в соответствии с рекомендациями вивария Института биоорганической химии имени М.М.Шемякина и Ю.А.Овчинникова РАН. Беременную

самку мыши линии C57Bl/6 на стадии E17 умерщвляли путем репозиции шейных позвонков, эмбрионы извлекали, помещали для анестезии в холодный раствор HBSS с низким содержанием Mg^{2+} и Ca^{2+} . Мозг эмбрионов извлекали, аккуратно очищали от оболочек. Кору полушарий отделяли и собирали в холодный раствор HBSS с низким содержанием Mg^{2+} и Ca^{2+} . После того, как все эмбрионы были обработаны подобным образом, полученные кортексы перемещали в 0.05% раствор Трипсин/ЭДТА на растворе Версена на 15 минут при 37°C. По прошествии этого времени ткани трижды промывали теплым раствором Neurobasal среды (Gibco), содержащей B27 (Gibco), 10% инактивированной FBS (Biosera) и 2 mM GlutaMax (Gibco). Затем ткань максимально аккуратно ресуспендировали, 10 раз пропустив ее через 1-мл наконечник автоматической пипетки. Полученную суспензию разводили теплой Neurobasal средой так, чтобы получить 1.5 млн/мл клеток. По 100 μ л разведенной суспензии клеток наносили в центр предварительно покрытого поли-D-лизином стекла 35-мм чашки FluoroDishes (World Precision Instruments). В таком виде клеткам позволяли осесть и прикрепиться в течение 1 часа в инкубаторе, после чего в каждую чашку добавляли 2 мл теплой Neurobasal среды. В последствии каждые 3 дня 1/3 этого объема среды заменяли на свежую.

3.4.3 Временная трансфекция

Временную трансфекцию и котрансфекцию клеток линий HeLa Kyoto и HEK293 плазмидами требуемых биосенсоров осуществляли через 24 часа после того, как клетки были высажены на чашки со стеклянным дном или слайды. Использовали липофильный трансфекционный реагент FuGeneHD (Promega) согласно рекомендациям производителя. В случае если требовалась замена среды, ее проводили спустя 6-8 часов после трансфекции.

Временную трансфекцию и котрансфекцию мышинных нейронов проводили через 5 дней после получения смешанной эмбриональной культуры. В качестве трансфекционного агента использовали Lipofectamine LTX (Invitrogen) согласно рекомендациям производителя.

3.4.4 Проточная цитометрия

Для экспериментов по переключению метаболизма раковых клеток с гликолиза на окислительное фосфорилирование клетки инкубировали с 30 mM DCA в течение 48 часов. Затем клетки снимали с подложки с помощью 0.25% раствора Трипсин/ЭДТА на растворе Версена, центрифугировали 10 минут на 900 rpm и ресуспендировали в растворе PBS (Santa Cruz Biotechnology) с 1% FBS. Сигналы индикаторов Grx1-roCherry, SoNar и SupHer2 детектировали с использованием проточного цитометра FACS Aria III (BD

Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA). Полученные данные экспортировали в csv-формат с помощью инструмента Cytobank (<https://www.cytobank.org/>) и обрабатывали в RStudio.

3.5 Работа с *D.rerio*

3.5.1 Ведение рыб *D.rerio*

Содержание рыб *D.rerio* линии АВ/ТЛ и эксперименты над ними осуществляли в соответствии с рекомендациями вивария Института биоорганической химии имени М.М.Шемякина и Ю.А.Овчинникова РАН. Взрослых особей *D.rerio* содержали в среде Е3 (5 mM NaCl, 0.17 mM KCl, 0.33 mM CaCl₂, 0.33 mM MgSO₄, pH 7.0), в термостатируемой комнате при 27°C, с заданным режимом день-ночь 12:12.

Для получения икры родительских особей *D.rerio* за 4 часа до завершения светового дня попарно отсаживали в отдельные контейнеры, содержащие по 500 мл среды Е3. На дно контейнеров устанавливали решетки, не позволяющие рыбам подбирать и поедать упавшие на дно икринки. С наступлением светового дня ждали, когда рыбы отменут икру, сразу же собирали ее и подвергали необходимым манипуляциям.

3.5.2 Временная трансфекция и микроинъекции эмбрионов

Для получения мальков *D.rerio*, временно экспрессирующих Grx1-roCherry, в желточные мешки эмбрионов на стадии одной клетки инъецировали мРНК Grx1-roCherry. Манипуляцию осуществляли с помощью микроинъектора Eppendorf Microinjector 5242.

Для получения мРНК *in vitro* использовали коммерческий набор mMessage mMachine SP6 Transcription kit (Ambion). Синтезированную таким образом мРНК использовали в концентрации 100 нг/мл и инъецировали в желточный мешок эмбрионов в объеме 1 нл. Полученные эмбрионы содержали в чашках Петри при 27°C в комнате с заданным режимом день-ночь 12:12. Через 48 часов после оплодотворения инъецированных животных скринировали с помощью флуоресцентного микроскопа и отбирали флуоресцирующие.

3.6 Флуоресцентная микроскопия

3.6.1 Микроскопия клеток эукариотических культур

Для большинства экспериментов по визуализации процессов, протекающих в клетках HeLa Kyoto, а также в мышинных нейронах смешанной эмбриональной культуры использовали флуоресцентный микроскоп Leica DMI6000 с объективами HCX PL Apo CS

40.0×1.25 Oil UV либо HCX PL APO lbd.BL 63×1.4NA oil и CCD-камерой Photometrics CoolSNAP HQ. В качестве источника света использовали ртутную лампу 120W HXP (Osram). Для работы с индикаторами, флуоресцирующими в зеленой и красной областях спектра, пользовались соответствующими фильтрами: GFP (BP470/40) и TX2 (BP560/40). Съемку проводили при 37°C в 1 мл раствора Tyrode (Sigma) с добавлением 20 mM HEPES (ПанЭко) и 20 mM D-глюкозы (Sigma).

Обработку полученных изображений осуществляли, используя программу ImageJ (EMBL). Для статистической обработки пользовались пакетом OriginPro8.

3.6.2 Неспецифическое окисление внутриклеточного пула глутатиона

В качестве неспецифического агента, окисляющего внутриклеточный глутатион, использовали пероксид водорода. В процессе микроскопирования клеток HeLa Kyoto, экспрессирующих проверяемые индикаторы, делали добавку раствора H₂O₂ в объеме 100 μл до требуемой конечной концентрации (стандартная рабочая концентрация за исключением специально оговоренных случаев составляла 150 μM).

3.6.3 Модуляция ответа клеток на окислительный стресс с помощью DMF

Мы использовали DMF (Sigma) для того, чтобы модулировать ответ клеток линии HeLa Kyoto на окисление пероксидом водорода. Для этого клетки в течение 24 часов инкубировали в среде, содержащей 50 μM DMF либо DMSO в качестве отрицательного контроля. В процессе съемки к преинкубированным таким образом клеткам добавляли раствор H₂O₂ в объеме 100 μл до конечной концентрации 150 μM.

3.6.4 Стимуляция контролируемой генерации пероксида водорода

В экспериментах со стимуляцией внутриклеточной генерации пероксида водорода затрансфицированные клетки линии HeLa Kyoto использовали на следующий день после трансфекции. Мышиные нейроны смешанной первичной культуры – через 12-14 дней после получения. Для того, чтобы стимулировать генерацию H₂O₂ внутри клеток, в ходе съемки к ним добавляли раствор D-норвалина (Sigma) в объеме 100 μл до конечной концентрации 2 mM. Для ингибирования TrxR клетки в течение ночи инкубировали в среде, содержащей 2.5 μM ауранофина (Enzo) либо DMSO в качестве негативного контроля.

3.6.5 Модель гипоксии-реоксигенации

Для моделирования гипоксии-реоксигенации клетки линии HeLa Kyoto в течение 1 часа инкубировали в среде RPMI1640 с 2 г/л NaHCO₃ без добавления FBS и без

фенолового красного. Съемку проводили в 500 μ л той же среды с помощью инвертированного широкопольного микроскопа Olympus IX83, оснащенного объективом 60 \times UPLS Apo/1.35. Эксперименты были выполнены при 37 $^{\circ}$ C путем варьирования нормоксичных (5% CO₂, 21% O₂) и гипоксичных (5% CO₂, 0% O₂) условий с помощью камеры cellVivo incubation setup (Peson), установленной непосредственно на микроскоп и позволяющей детектировать происходящие изменения в режиме реального времени.

3.6.6 Микроскопия *D.rerio*

Флуоресценцию в эмбрионах, экспрессирующих Grx1-roCherry, осуществляли с помощью широкопольного флуоресцентного микроскопа Leica DMI6000, оснащенного объективом HC PL FLUOTAR 10.0*0.30 DRY и фильтром TX2 BP560/40. Животных, достигших возраста 48 часов после оплодотворения, помещали в раствор 0.02% MS-222, трикаина (Sigma) для анестезии. С помощью пинцетов эмбрионы извлекали из хорионов и иммобилизовали на чашке со стеклянным дном (FluoroDishes, World Precision Instruments) в капле предварительно расплавленной и охлажденной до приемлимой температуры 2% агарозы. После застывания капли агарозы ее покрывали 1 мл среды E3, в которой в норме содержатся животные. Для окисления индикатора Grx1-roCherry, экспрессирующегося в тканях *D.rerio*, использовали пероксид водорода. В ходе съемки раствор H₂O₂ в объеме 100 μ л вносили к иммобилизованному в агарозе мальку до конечной концентрации 50 мМ.

4. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

4.1 Создание молекулярно-генетической конструкции Grx1-roCherry

При создании красного флуоресцентного индикатора для регистрации редокс-состояния пула глутатиона мы использовали классическую схему, которую ранее использовали при создании семейств белков gxYFP и roGFP [330][316]. За основу биосенсора нами были выбраны мономерные красные флуоресцентные белки mCherry [254], mRuby2 [251] или mKate2 [260], отличающиеся высокой яркостью. Для создания флуоресцентного белка, чувствительного к редокс-изменениям пула глутатиона, в последовательности указанных белков мы ввели сайт-направленным мутагенезом пары аминокислотных остатков цистеина. Позиции для замен выбирали таким образом, чтобы они оказывались в непосредственной близости друг с другом на соседних β -листах, а также с хромофором флуоресцентного белка. Предполагалось, что остатки цистеина при окислении окружающей среды будут способны к формированию дисульфидной связи, что приведет к конформационным изменениям окружения хромофора и, как следствие, к изменению спектральных характеристик белка. В результате было получено 4 конструкции на основе белка mCherry, в структуру которого были введены парные остатки цистеина в положения: 149/169, 149/203, 150/169, 150/203. Для белков mRuby2 и mKate2 для цистеинов были выбраны положения 142/161, 142/198, 141/161, 141/198. Во всех случаях нумерация указана относительно последовательности каждого из флуоресцентных белков. Позиции для мутаций были выбраны на основе анализа структур красных белков, в том числе в результате их сравнения со структурами зеленых редокс-чувствительных белков. Известно, что редокс-состояние данного типа белков уравнивается с пулом глутатиона гораздо быстрее в присутствии белков глутаредоксинов. Поэтому для увеличения локальной концентрации глутаредоксинов и улучшения кинетических свойств индикаторов на N-конец зеленых белков через полипептидный линкер был добавлен человеческий глутаредоксин-1 (Grx-1) [313]. Поэтому во всех полученных нами конструкциях с красными белками на N-конце был расположен Grx1, который соединен с флуоресцентным белком через линкер состава (Gly-Gly-Ser-Gly-Gly)₆. Суммарно на данном этапе работы нами было получено 12 молекулярно-генетических конструкций Grx1-mCherry, Grx1-mRuby и Grx1-mKate2, отличающихся положениями пар аминокислотных остатков цистеина.

Для первичного скрининга конструкций использовали бактериальные клетки *E.coli* штамма XL1Blue. На первом этапе мы оценивали наличие флуоресценции полученных

версий. Все бактериальные клоны, экспрессирующие гены полученных версий, демонстрировали выраженный флуоресцентный сигнал. Далее мы проверяли функциональную активность полученных вариантов. Для этого к суспензии клеток *E.coli*, экспрессирующих полученные версии, добавляли пероксид водорода в качестве неспецифического окислителя пула глутатиона, регистрируя при этом изменения в спектрах возбуждения и эмиссии флуоресценции проб до и после добавки окислителя. Ни одна из конструкций на основе белка mRuby2 не проявила изменение сигнала в ответ на окисление. В дальнейшей работе данные версии не использовали. Среди вариантов, содержащих mKate2, мы отобрали лишь одну версию с остатками цистеина в позициях 141/198. Флуоресцентный сигнал данной версии в суспензии бактериальных клеток уменьшался примерно на 10% после внесения в среду насыщающей концентрации пероксида водорода 500 μM (данные не приведены). Таким же образом мы отобрали 2 версии на основе белка mCherry: Grx1-mCherry-A150C/R169C и Grx1-mCherry-A150C/K203C. Интенсивность их флуоресценции увеличивалась при максимальном окислении пула глутатиона в бактериальных клетках на 10-15% (данные не приведены).

Дальнейшую проверку отображенных конструкций мы проводили в эукариотической системе в культуре человеческих клеток HeLa Kyoto. Для этого гены были переклонированы в вектора для экспрессии в эукариотических клетках. На редокс-состояние пула глутатиона клеток HeLa Kyoto мы также воздействовали внесением в среду неспецифического окислителя H_2O_2 , вызывающего общее окисление. В данной системе интенсивность флуоресценции Grx1-mCherry-A150C/K203C увеличивалась на 16%, для Grx1-mCherry-A150C/R169C мы не зафиксировали изменений (данные не приведены). Поэтому для дальнейшей работы мы использовали версию Grx1-mCherry-A150C/K203C. Что касается химерного белка на основе mKate2, в эукариотических клетках по не установленной причине изменение его флуоресцентного сигнала в ответ на окисление имеет необратимый характер.

Полученная нами версия Grx1-mCherry-A150C/K203C характеризуется низким динамическим диапазоном ответа, что существенно ограничивает ее использование в качестве будущего инструмента исследования. Поэтому следующий этап работы был посвящен оптимизации свойств данного варианта. Первым шагом стала замена линкера между Grx1 и флуоресцентной частью индикатора. Использованный ранее фрагмент полиглицинового тракта, состоящий из 30 аминокислотных остатков с последовательностью $(\text{GGSGG})_6$, мы последовательно укорачивали с шагом в 6 остатков. Однако данный подход не привел к положительным результатам. Затем мы полностью заменили линкерную часть на последовательность (SGTGGNASDGGGSGG) . Ранее такой

линкер был использован в биосенсоре Peredox для регистрации соотношения НАД⁺/НАДН [303]. В результате мы получили новую версию белка, которая значительно превосходила исходную по яркости (данные на основе визуального сравнения в культуре клеток HeLa Kyoto), однако амплитуда ответа данной конструкции осталась прежней.

На следующем этапе мы использовали подход, который ранее применяли для разработки редокс-чувствительного белка на основе голубого флуоресцентного белка roBFP [331]. Метод основан на внесении изменений в хромофорное окружение флуоресцентного ядра, что позволяет сделать структуру индикатора более подвижной и, таким образом, увеличить динамический диапазон ответа. Руководствуясь изложенным принципом, с помощью направленного мутагенеза мы вносили дополнительный аминокислотный остаток в последовательность Grx1-mCherry-A150C/K203C после Cys150. В результате нами было получено 19 вариантов с инсерциями в положении 151 (использовали все протеиногенные аминокислотные остатки, кроме цистеина). Полученные 19 конструкций аналогичным образом тестировали в клетках HeLa Kyoto, регистрируя изменения флуоресцентного сигнала при общем окислении пероксидом водорода. В результате мы отобрали версию с дополнительным остатком Thr после Cys150. Амплитуда ответа данного белка на окисление в эукариотических клетках составила около 30%, тогда как у исходной версии без инсерции в тех же условиях амплитуда ответа была в 2 раза меньше (данные не приведены).

Затем мы предположили, что внесение полярных аминокислотных остатков в хромофорное окружение флуоресцентного ядра также может увеличить динамический диапазон сенсора. На основе анализа структуры белка мы выбрали два положения в последовательности нашего индикатора, которые в дальнейшем подвергали мутагенезу. Первым мы выбрали остаток Ser151, который с помощью направленного мутагенеза последовательно заменяли на Thr, Asn, Gln, Asp и Glu. Похожим образом мы получили мутации Glu153, который заменяли на Thr, Asn, Gln и Asp. Все полученные версии мы проверяли в культуре клеток HeLa Kyoto и сравнивали с исходным вариантом. В результате была отобрана конструкция, несущая замену Ser151Glu, которая демонстрировала не только увеличенный динамический диапазон (до 45%), но и быстрее других восстанавливалась после окисления. Под восстановлением в данном случае мы подразумеваем возвращение флуоресцентного сигнала к первоначальному значению после окисления. Для всех редокс-активных белков данного типа характерно обратимое изменение сигнала, что связано с работой антиоксидантных систем клетки и восстановлением дисульфидной связи во флуоресцентном белке. Итоговая конструкция,

несущая мутации Ala150Cys, Ser151Glu, Lys203Cys и инсерцию Ala150CysThr, была названа Grx1-roCherry (рис. 20).

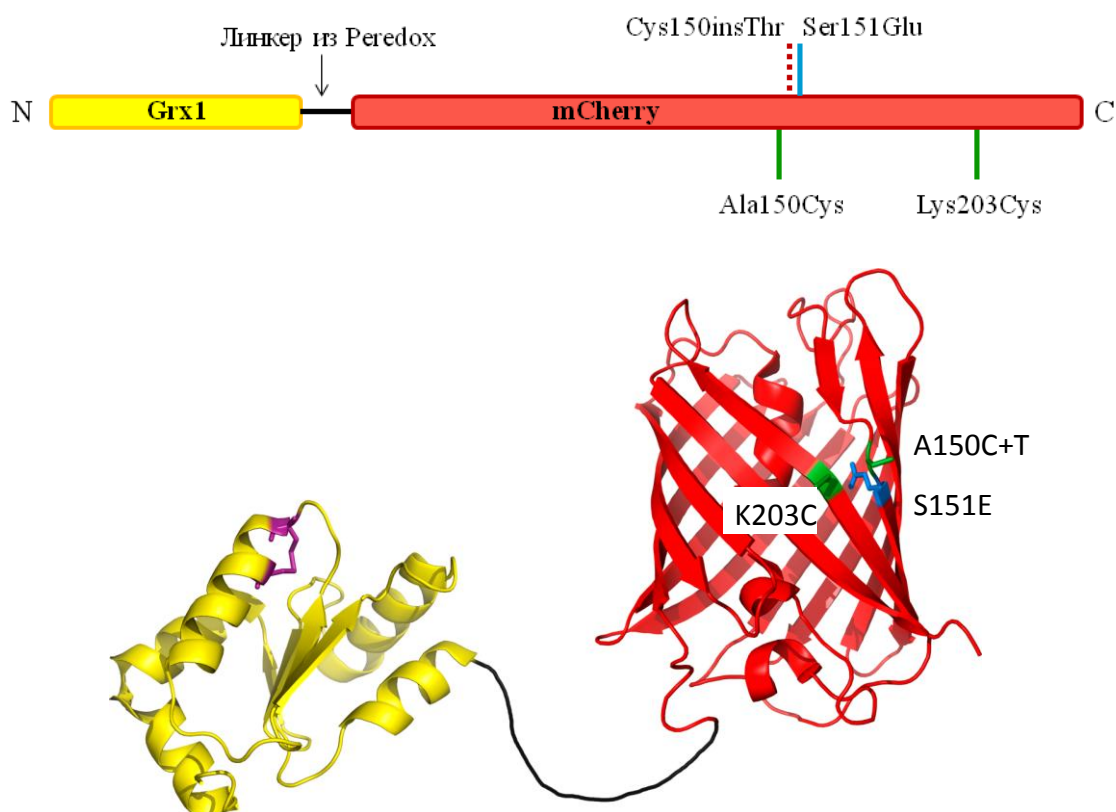


Рис. 20. Схема индикатора Grx1-roCherry на уровне нуклеотидной последовательности и белковой глобулы.

4.2 Определение характеристик Grx1-roCherry *in vitro*

Для того чтобы охарактеризовать свойства Grx1-roCherry, мы экспрессировали его в бактериальных клетках и получили очищенный препарат белка, используя методы металло-аффинной хроматографии и гель-фильтрации.

4.2.1 Спектральные характеристики Grx1-roCherry и функциональные тесты *in vitro*

Спектры возбуждения и эмиссии флуоресценции Grx1-roCherry однопиковые, с максимумами при 589 нм и при 610 нм (рис. 21А). Интенсивность флуоресценции Grx1-roCherry возрастает по мере уменьшения соотношения 2GSH/GSSG в буферном растворе (рис. 21Б).

Во всех используемых нами моделях как в бактериальных клетках, так в эукариотах, мы используем пероксид водорода в качестве неспецифического окислителя пула глутатиона. Поэтому важно проверить, не окисляет ли H_2O_2 индикатор напрямую. Было показано, что Grx1-roCherry *in vitro* в концентрации 40 нМ не чувствителен к пероксиду водорода в концентрациях вплоть до 100 μM (рис. 21В). Тогда как внесение в систему окисленного глутатиона в концентрациях от 3 μM приводит к значительному изменению флуоресцентного сигнала Grx1-roCherry (рис. 21В). Мы также проверили, что окисление, вызванное добавками H_2O_2 , было всегда опосредовано окислением глутатиона. Для этого к раствору, содержащему 40 нМ Grx1-roCherry и 10 μM восстановленный глутатион, мы добавили 100 μM H_2O_2 , который, как мы выяснили, не вызывает напрямую окисления белка и, следовательно, изменений флуоресцентного сигнала. Однако если в данной системе присутствовал глутатион, то биосенсор демонстрировал выраженное изменение сигнала, которое соответствовало окисленному состоянию в результате образования в системе окисленного глутатиона.

Чтобы оценить яркость индикатора Grx1-roCherry мы определили его коэффициент молярной экстинкции и квантовый выход, которые составили $14500 M^{-1}cm^{-1}$ и 0.23. У исходного флуоресцентного белка mCherry квантовый выход сравним и составляет 0.22, тогда как коэффициент экстинкции значительно выше – $72000 M^{-1}cm^{-1}$ [243]. Таким образом, индикатор Grx1-roCherry тусклее mCherry приблизительно в 4,75 раз.

Для многих биосенсоров на основе флуоресцентных белков характерна чувствительность к изменению pH в физиологическом диапазоне. В случае отсутствия контрольных экспериментов изменение флуоресцентного сигнала вследствие колебаний pH может привести к неверной интерпретации полученных результатов. Поэтому pH-чувствительность и значение pKa являются важными характеристиками любого индикатора. Мы получили кривую pH-зависимости очищенного белка Grx1-roCherry (рис. 21Г), согласно которой в диапазоне физиологических значений pH 6,0-8,0 интенсивность его флуоресценции изменяется в 4 раза. Это выгодно отличает Grx1-roCherry от ранее опубликованного gxRFP, интенсивность флуоресценции которого в том же диапазоне изменяется в 20 раз [327]. Значение pKa биосенсора Grx1-roCherry составляет 6,7.

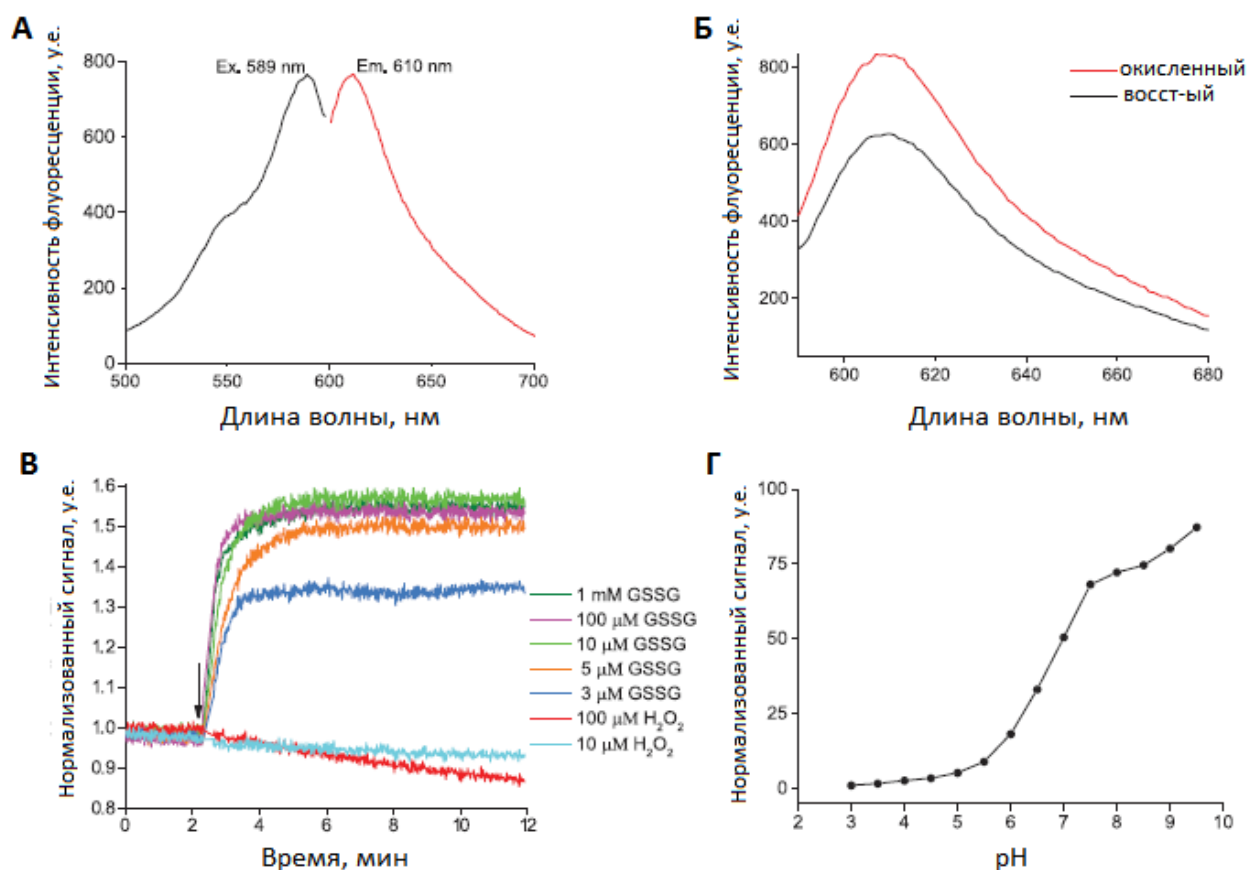


Рис. 21. Характеристики Grx1-roCherry *in vitro*.

(А) Спектры возбуждения (черная линия) и эмиссии (красная линия) флуоресценции очищенного белка Grx1-roCherry.

(Б) Спектры эмиссии флуоресценции восстановленной (черная линия) и окисленной (красная линия) форм Grx1-roCherry (F589).

(В) Изменение интенсивности флуоресценции Grx1-roCherry (F589) в ответ на внесение разных концентраций окисленного глутатиона и пероксида водорода. Измерения значений сигнала проводилось в непрерывном режиме раз в 1 секунду. Момент добавления окислителей к пробам в конечных концентрациях отмечен стрелкой.

(Г) Зависимость флуоресценции очищенного белка Grx1-roCherry от pH.

4.2.2 Оценка специфичности Grx1-roCherry

Для оценки специфичности Grx1-roCherry мы инкубировали пробы очищенного белка с несколькими наиболее часто встречающимися внутри клетки окислителями. Для сравнения мы использовали зеленый биосенсор Grx1-roGFP2 [313]. Оба белка реагируют на появление в системе окисленного глутатиона. Причем для Grx1-roCherry насыщающей концентрацией является 10 мкМ GSSG. При этом для Grx1-roGFP2 сигнал различим для концентраций GSSG 10 мкМ и 1 мМ (рис. 22). Максимальная амплитуда ответа

очищенного белка Grx1-roCherry на насыщающую концентрацию GSSG (10 мкМ) составила $1,53 \pm 0,03$ и не изменялась при дальнейшем увеличении концентрации GSSG, что говорит о высокой скорости установления равновесия между индикатором и пулом глутатиона. Таким образом, Grx1-roCherry, судя по нашим данным (рис. 22 столбцы 1 и 2), более чувствителен к окислению по сравнению с Grx1-roGFP2. В дальнейшем эти наблюдения были подтверждены экспериментами по оценке окислительно-восстановительного потенциала данных индикаторов.

При добавлении больших концентраций пероксида водорода (500 мкМ) незначительное изменение сигнала демонстрирует Grx1-roGFP2. Однако можно считать, что в физиологических условиях пероксид водорода не будет влиять на флуоресцентный сигнал обоих биосенсоров. Мы выяснили, что в отличие от Grx1-roGFP2, сигнал красного биосенсора зависит от присутствия больших концентраций оксида азота NO (рис. 22 столбец 6). Однако в клетках при физиологических и патологических процессах NO образуется в диапазоне концентраций от нескольких десятков нМ до нескольких сотен нМ [332]. Возможно, в некоторых экспериментах целесообразно использование блокаторов NO-синтаз в качестве дополнительного контроля. Мы также выяснили, что оба индикатора крайне чувствительны к хлораминам, а именно к N-хлоротаурину – производному хлорноватистой кислоты. Таким образом, данные инструменты нельзя использовать в условиях гипогалогенного стресса. Еще один окислитель, супероксид-анион радикал, который образуется в реакции, катализируемой ксантин оксидазой, также влияет на сигнал обоих биосенсоров, однако в большой концентрации, которая не достигается в клетках. Полученные данные представлены на рисунке 22. Неспецифичное окисление обоих сенсоров объясняется экспонированными в их структурах редокс-активными остатками цистеина, которые легко могут быть атакованы высокоактивными соединениями. Из перечисленных окислителей в заданных концентрациях производные гипогалогенного стресса действительно могут существенно влиять на сигнал в реальных условиях.

Свойства биосенсора Grx1-roCherry сопоставимы с широко используемым в мире Grx1-roGFP2, в том числе по специфичности. В дальнейшем Grx1-roCherry может быть использован для регистрации изменений соотношения 2GSH/GSSG в биологических системах в комбинации с Grx1-roGFP2.

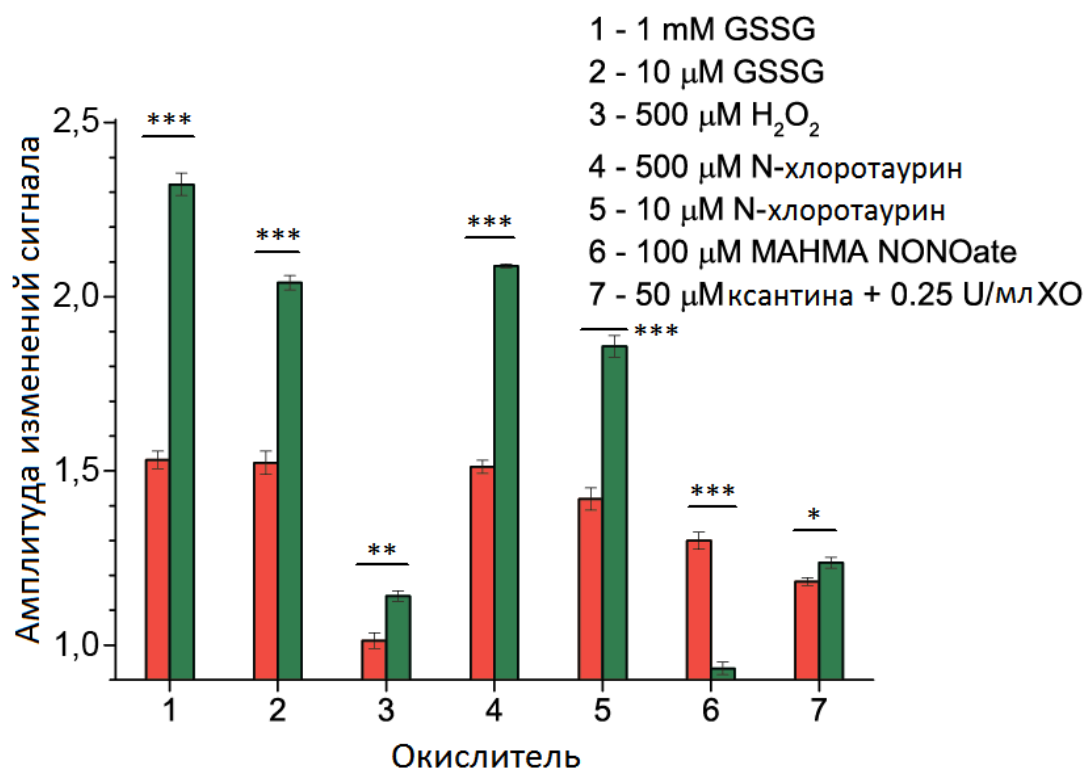


Рис. 22. Сравнительная оценка специфичности индикаторов Grx1-roCherry и Grx1-roGFP2.

*Изменение сигнала восстановленного Grx1-roCherry (F589, красные столбцы) и Grx1-roGFP2 (F405/F488, зеленые столбцы) при инкубации с различными окислителями in vitro. XO – ксантиноксидаза. Время инкубации для проб 1-5 составило 3 минуты, для проб 6-7 – 10 минут. Данные проанализированы по результатам 3 экспериментов. Планки погрешностей соответствуют стандартной ошибке среднего. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, непарный t -тест.*

4.2.3 Оценка окислительно-восстановительного потенциала Grx1-roCherry

Для оценки окислительно-восстановительного потенциала Grx1-roCherry пробы очищенного белка титровали растворами с заданным соотношением DTT_{red}/DTT_{ox} в диапазоне от 0:10 до 10:0. Редокс-пара 2GSH/GSSG представляется наиболее предпочтительной для определения окислительно-восстановительного потенциала редокс-чувствительных индикаторов. Однако восстановленный глутатион GSH не стабилен, что требует соблюдения строгих условий работы, в том числе проведения экспериментов в атмосфере инертного газа, чтобы избежать окисления глутатиона атмосферным кислородом. Кроме того, на примере белка Grx1-roGFP2 известно, что следовые количества окисленной формы GSSG, содержащиеся в коммерческом препарате восстановленного глутатиона GSH, в значительной степени искажают результат

измерений, поскольку биосенсор высокочувствителен к GSSG [313]. Поэтому в работе мы использовали DTT, окисленная и восстановленная формы которого стабильны в условиях эксперимента.

По нашей оценке окислительно-восстановительный потенциал Grx1-roCherry составляет -335 мВ при рН 7.4 (рис. 23А). В аналогичных условиях при рН 7.4 потенциал зеленого аналога Grx1-roGFP2 составляет -315 мВ (рис. 23Б). Величины потенциалов, пересчитанные при рН 7.0, составляют -311 мВ для Grx1-roCherry и -291 мВ для Grx1-roGFP2, что приближено к данным литературы. Полученные данные приведены в табл. 4.

Табл.4. Значения окислительно-восстановительных потенциалов редокс-чувствительных индикаторов Grx1-roGFP2 и Grx1-roCherry. Определены титрованием редокс-парой



Редокс-потенциал (мВ)	рН 7.0	рН 7.4	По данным литературы (рН 7.0)
Grx1-roGFP2	-291	-315	-280
Grx1-roCherry	-311	-335	-

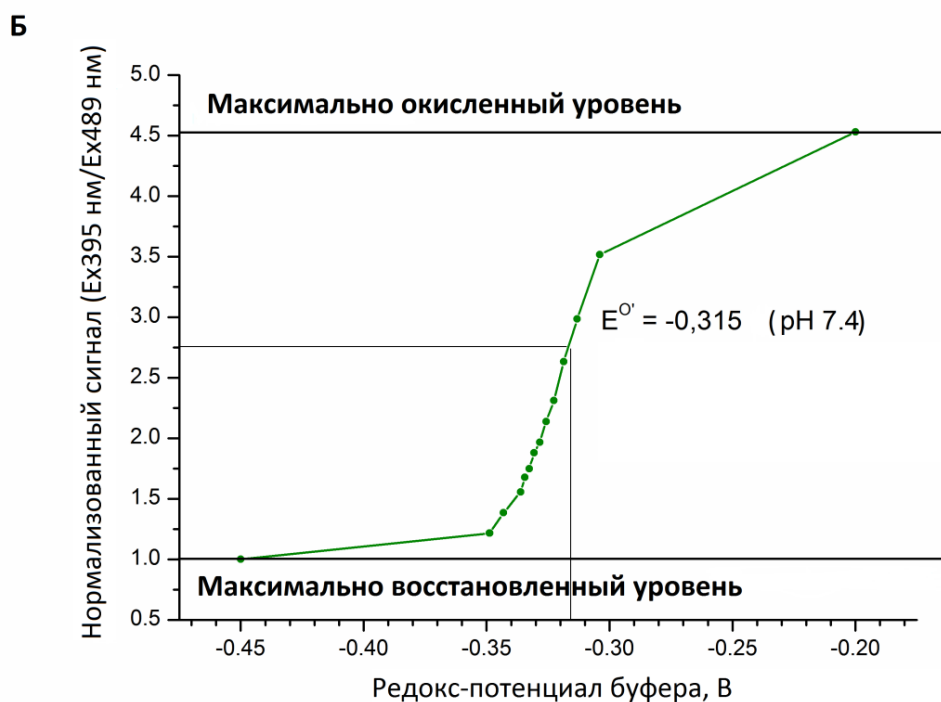
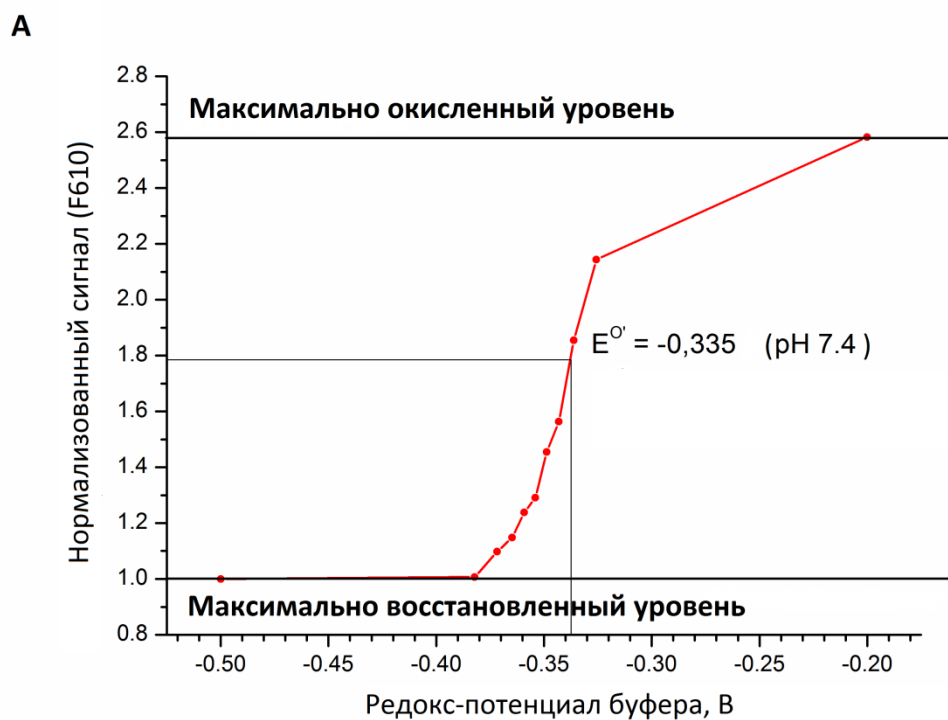


Рис. 23. Оценка окислительно-восстановительного потенциала Grx1-roCherry и Grx1-roGFP2 *in vitro*.

Кривые зависимости флуоресцентного сигнала белков Grx1-roCherry (А) и Grx1-roGFP2 (Б) от окислительно-восстановительного потенциала буфера. В качестве редокс-пары для титрования использовали DTT_{red}/DTT_{ox} .

Полученная относительная величина окислительно-восстановительного потенциала Grx1-roCherry позволяет сделать вывод о том, что красный белок окисляется легче зеленого. Это согласуется с полученными ранее данными в эксперименте по определению специфичности на препаратах очищенных белков, где было продемонстрировано, что для максимального изменения сигнала Grx1-roCherry требуется GSSG в меньшей концентрации по сравнению с Grx1-roGFP2 (рис. 22 столбцы 1 и 2). Как и Grx1-roGFP2, Grx1-roCherry в люмене эндоплазматического ретикулума клеток HeLa Kyoto находится в полностью окисленном состоянии, поскольку для данного компартмента характерно более низкое значение соотношения 2GSH/GSSG по сравнению с цитоплазмой или матриксом митохондрий. Еще одним косвенным доказательством более отрицательной величины окислительно-восстановительного потенциала Grx1-roCherry по сравнению с Grx1-roGFP2 являются результаты, полученные в ходе эксперимента по определению чувствительности этих биосенсоров к окислению в цитоплазме живых клеток эукариот. Для этого в цитоплазме клеток HeLa Kyoto коэкспрессовали Grx1-roCherry и Grx1-roGFP2. Далее к клеткам добавляли раствор пероксида водорода, начиная от минимальных концентраций до насыщающих. В результате был построен график зависимости значений сигналов биосенсоров от концентрации добавленного окислителя (рис. 24). Кривая для Grx1-roCherry относительно кривой для зеленого белка смещена в сторону меньших концентраций окислителя, таким образом, красный белок действительно более чувствителен к окислению, что объясняется небольшой разницей в полученных величинах потенциалов.

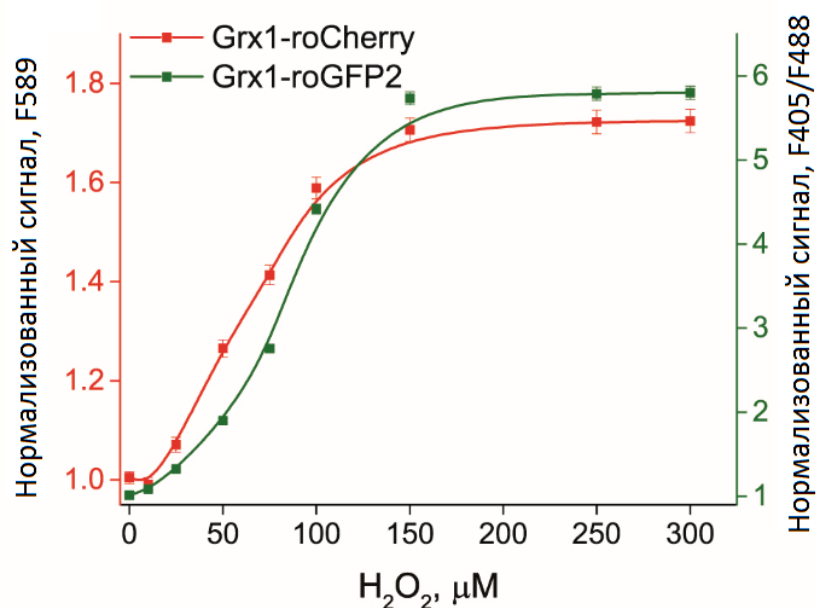


Рис. 24. Зависимость флуоресцентного сигнала биосенсоров Grx1-roGFP2 и Grx1-roCherry в цитоплазме живых клеток HeLa Kyoto от концентрации пероксида водорода в среде.

Изменение сигнала Grx1-roCherry (F589, красная линия) и Grx1-roGFP2 (F405/F488, зеленая линия) в цитоплазме клеток линии HeLa Kyoto, обработанных пероксидом водорода в диапазоне концентраций 0-300 μM . Значения сигналов нормализованы на исходные. Данные получены по результатам анализа не менее 100 клеток в 3 экспериментах. Планки погрешностей соответствуют стандартной ошибке среднего.

Таким образом, по окислительно-восстановительному потенциалу Grx1-roCherry (-311 мВ) схож с другими представителями семейства данных биосенсоров (roGFP1: -291 мВ [308], roGFP2: -280 мВ [308], rxYFP: -261 мВ [333]). Таким образом, по-прежнему существует необходимость создания биосенсоров с отличающимися значениями окислительно-восстановительных потенциалов, в том числе для работы в компартментах с высоким потенциалом, таких, как люмен эндоплазматического ретикулума.

4.3 Исследование динамики соотношения 2GSH/GSSG в разных эукариотических системах с помощью биосенсора Grx1-roCherry

Создание биосенсора для регистрации редокс-статуса пула глутатиона на основе красного флуоресцентного белка позволяет использовать его в режиме мультипараметрической микроскопии в комбинации с другими редокс-биосенсорами с эмиссией флуоресценции в зеленой области спектра. Мы выбрали наиболее популярные в

исследованиях биосенсоры: Grx1-roGFP2, который ранее уже использовали в работе, а также SoNar, для регистрации соотношения НАД⁺/НАДН. Для локализации биосенсоров Grx1-roCherry и Grx1-roGFP2 в матриксе митохондрий использовали сигнальную последовательность MTS из субъединицы VIII человеческой цитохром-С оксидазы [334], которая на уровне генов была добавлена на N-концы белков.

4.3.1 Модуляция окислительного стресса клеток путем воздействия на редокс-статус пула глутатиона

Смещение равновесия в паре 2GSH/GSSG теоретически должно отражаться на способности клетки противостоять окислительному стрессу. Мы решили проверить, как вещество диметилфумарат, влияющее на редокс-статус клетки, влияет на динамику соотношения 2GSH/GSSG при окислительном стрессе. Диметилфумарат (DMF) известен как действующее вещество в ряде препаратов, которые в терапии используют для лечения псориаза [335] и рецидивирующе-ремиттирующего рассеянного склероза [336]. DMF хорошо проникает в клетки млекопитающих, где ковалентно связывается с восстановленной формой глутатиона и, таким образом, выводит его из общего пула. Это провоцирует развитие кратковременного окислительного стресса [337][338]. Однако, также известно, что DMF активирует NRF2 – один из ключевых транскрипционных факторов, вовлеченных в клеточный ответ на окислительный стресс [339]. Активация NRF2 запускает транскрипцию генов нескольких ферментов-участников редокс-систем гомеостаза, в том числе ген НАДФН-зависимой глутатионредуктазы. Усиление экспрессии гена этого фермента стимулирует процесс рециклизации глутатиона, что, в конечном счете, приводит к сдвигу равновесия 2GSH/GSSG в сторону восстановленной формы [340].

Мы ожидали, что клетки HeLa Kyoto, преинкубированные с DMF, будут отличаться от контрольных без инкубации с веществом более высоким соотношением 2GSH/GSSG и, как следствие, более высокой сопротивляемостью к окислительному стрессу, вызванному экзогенной добавкой пероксида водорода. Более того, мы решили проверить, будет ли в этих условиях отличаться динамика редокс-состояния независимых пулов глутатиона в цитоплазме и матриксе митохондрий. Для этого в одних и тех же клетках HeLa Kyoto мы локализовали разработанный нами красный биосенсор Grx1-roCherry, а в матриксе митохондрий – зеленый Grx1-roGFP2. Перед экспериментом клетки инкубировали в течение 24 часов с 50 μ M DMF, после чего заменяли среду и проводили микроскопию в мультипараметрическом режиме с одновременной регистрацией флуоресцентного сигнала в нескольких каналах. В качестве контроля использовали аналогичные клетки, которые

инкубировали с растворителем DMSO, в котором готовят пробу DMF. В качестве неспецифического окислителя, вызывающего окислительный стресс, использовали пероксид водорода в конечной концентрации 150 μM , который вносили в среду к клеткам в процессе микрокопирования.

Было показано, что после внесения H_2O_2 Grx1-roCherry в цитоплазме клеток, преинкубированных с DMF, окисляется гораздо менее эффективно по сравнению с контрольными, не обработанными DMF (рис. 25А). В то же время мы не выявили значительных отличий в амплитуде ответа Grx1-roGFP2 в митохондриях этих же клеток (рис. 25А). Чтобы убедиться, что наблюдаемые различия не вызваны индивидуальными особенностями двух используемых индикаторов, мы повторили эксперимент, поменяв их локализации: Grx1-roCherry направили в матрикс митохондрий, а Grx1-roGFP2 – в цитоплазму. В результате полученная ранее тенденция развития динамики сигналов была воспроизведена: с помощью Grx1-roCherry мы по-прежнему не зарегистрировали значительных различий в эффективности окисления глутатиона в митохондриях контрольных клеток и преинкубированных с DMF (рис. 25Б), тогда как в цитоплазме разница оказалась существенной (рис. 25Б). Примечательно, что цитоплазматический Grx1-roCherry в клетках, обработанных DMF, реагировал на окисление пероксидом водорода со сниженной амплитудой, а цитоплазматический Grx1-roGFP2 в тех же условиях практически не демонстрировал изменения сигнала. Это объясняется разницей окислительно-восстановительных потенциалов индикаторов. Grx1-roCherry более чувствителен к окислению, поэтому сигнал этого сенсора отражает небольшое смещение равновесия в сторону образования GSSG, в то время как Grx1-roGFP2 не реагирует на изменения в таком диапазоне.

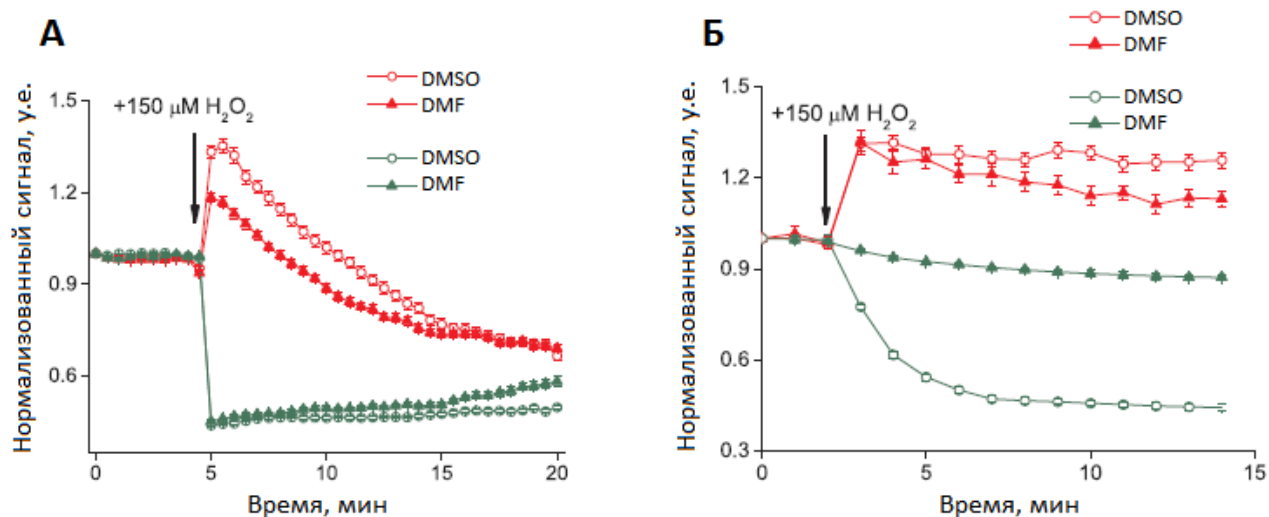


Рис. 25. Влияние вещества DMF на динамику редокс-состояния пулов глутатиона в матриксе митохондрий и цитоплазме клеток HeLa Kyoto при развитии окислительного стресса.

(А) Изменение сигнала *Grx1-roCherry* в цитоплазме (F589, красные линии) и *Grx1-roGFP2* в митохондриях (F488, зеленые линии) клеток линии HeLa Kyoto при развитии окислительного стресса, вызванного добавкой пероксида водорода в конечной концентрации 150 μM . Клетки преинкубировали 24 часа с 50 μM DMF или DMSO, в качестве отрицательного контроля. Значения сигналов нормализованы на исходные. Данные получены по результатам анализа 103 клеток в 3 экспериментах для DMF и 119 клеток в 3 экспериментах для DMSO. Планки погрешностей соответствуют стандартной ошибке среднего.

(Б) Аналогично (А), но разница в том, что *Grx1-roCherry* локализован в матриксе митохондрий, а *Grx1-roGFP2* – в цитоплазме. Значения сигналов нормализованы на исходные. Данные получены по результатам анализа 30 клеток в 2 экспериментах для DMF и 34 клеток в 2 экспериментах для DMSO. Планки погрешностей соответствуют стандартной ошибке среднего.

Таким образом, вещество DMF действительно влияет на динамику окисления цитоплазматического пула глутатиона, при этом не оказывая воздействия на пул глутатиона в матриксе митохондрий. Это одно из веских дополнений к тому, что внутриклеточные редокс-события могут существенно отличаться в разных компартментах.

4.3.2 Исследование динамики соотношения 2GSH/GSSG в модели гипоксии/реоксигенации

В клетках аэробных организмов даже кратковременная гипоксия вызывает глобальные изменения редокс-процессов. При этом известно, что последующая реоксигенация тканей приводит к масштабной генерации активных форм кислорода, вызывающей окислительный стресс [341]. Таким образом, глобальные изменения концентрации кислорода всегда приводят к масштабным перестройкам редокс-метаболизма. Для того чтобы проверить, каким образом гипоксия/реоксигенация оказывает влияние на пул глутатиона в цитоплазме и матриксе митохондрий клеток HeLa Kyoto, мы экспрессировали в них Grx1-roCherry и Grx1-roGFP2 с соответствующими сигналами локализации. Непосредственно во время микроскопирования клетки подвергали гипоксии (0% O₂) в течение 20 минут, затем подачу кислорода восстанавливали, вызывая реоксигенацию (21% O₂). Динамику сигналов Grx1-roCherry (F589 - интенсивность флуоресценции, возбужденной при 589 нм) и Grx1-roGFP2 (F405/F488 – соотношение интенсивностей флуоресценции, возбужденной при соответствующих длинах волн) регистрировали при этом в режиме реального времени.

На рисунке 26 представлены полученные результаты. С первых минут развития гипоксии в матриксе митохондрий клеток происходит значительное увеличение соотношения 2GSH/GSSG, которое так же быстро возвращается к первоначальному состоянию при оксигенации через 20 минут. При этом выраженных изменений цитоплазматического пула глутатиона не было зафиксировано. Таким образом, митохондриальный пул глутатиона в данных условиях оказался гораздо чувствительнее к изменению концентрации кислорода окружающей среды.

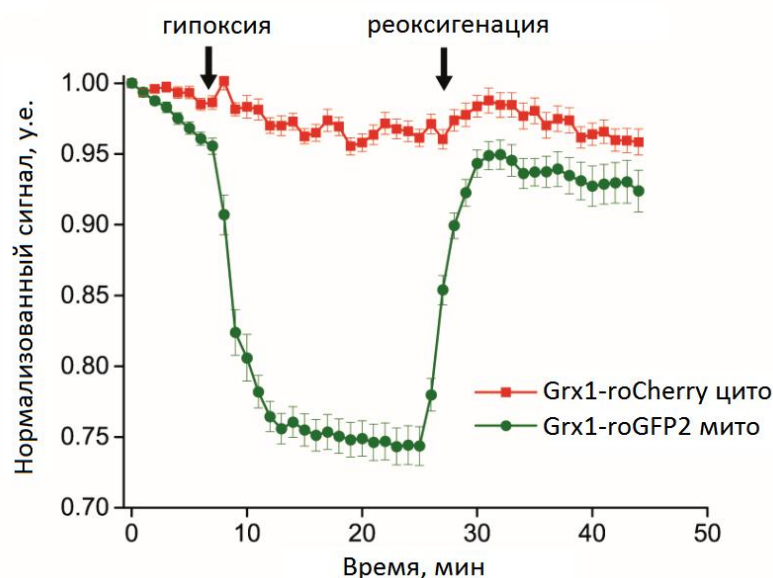


Рис. 26. Цитоплазматический и митохондриальный пулы глутатиона ведут себя независимо во время гипоксии/реоксигенации.

Динамика изменения сигналов в мультипараметрическом режиме микроскопии индикаторов Grx1-roCherry (F589, красная линия) в цитоплазме и Grx1-roGFP2 (F405/F488, зеленая линия) в матриксе митохондрий клеток HeLa Kyoto, подвергнутых гипоксии (20 мин) и последующей реоксигенации. Значения сигналов нормированы на исходные. Данные получены по результатам анализа 28 клеток в 2 экспериментах. Планки погрешностей соответствуют стандартной ошибке среднего.

4.3.3 Изменения редокс-статуса опухолевых клеток при переключении метаболизма

Клетки многих типов рака получают энергетические эквиваленты в основном в ходе гликолиза даже в аэробных условиях [342]. При этом активность их митохондрий снижена. Известно, что переключение метаболизма раковых клеток между гликолизом и окислительным фосфорилированием имеет место как в ходе их развития, так и при неопластической трансформации [343]. Дихлороацетат (DCA) является структурным аналогом пируват-аниона и ингибирует киназу пируватдегидрогеназы. В результате в митохондриях происходит активация пируватдегидрогеназного комплекса (ПДК): активируется электрон-транспортная цепь, приток пирувата в митохондрии увеличивается [344]. Таким образом, DCA может быть использован для контролируемого переключения метаболизма клеток с гликолиза на окислительное фосфорилирование [345].

Мы решили выяснить, как подобный метаболический сдвиг в раковых клетках влияет на такие важные редокс-показатели, как соотношения 2GSH/GSSG и НАД⁺/НАДН.

Для этого мы коэкспрессировали индикаторы Grx1-roCherry и SoNar в цитоплазме клеток линии HeLa Kyoto. Затем клетки инкубировали в среде с 30 мМ DCA в течение 48 часов, затем с помощью проточной цитометрии регистрировали распределение флуоресцентного сигнала в популяции клеток.

SoNar, индикатор изменения соотношения НАД⁺/НАДН, в отличие от Grx1-roCherry является ратиометрическим. Это значит, что его сигнал анализируют как отношение интенсивности флуоресценции, возбужденной при 420 нм, к интенсивности флуоресценции, возбужденной при 490 нм (F420/F490). В нашей работе мы рассматриваем изменения в двух каналах независимо. Все индикаторы на основе кругового пермутанта сrYFP, в том числе биосенсор SoNar, чувствительны к изменениям рН в физиологическом диапазоне значений. Колебания рН особенно влияют на депротонированную форму хромофора (F490), при этом протонированная форма хромофора более устойчива к таким изменениям. Мы предположили, что переключение метаболизма с гликолиза на окислительное фосфорилирование может отразиться на изменении внутриклеточного рН и исказить целевой сигнал индикатора. Поэтому, руководствуясь рекомендациями оригинальной статьи, мы анализировали данные для биосенсора SoNar в двух каналах независимо.

Мы выяснили, что инкубация раковых клеток линии HeLa Kyoto с DCA приводит к росту интенсивности флуоресценции Grx1-roCherry в среднем по популяции, что отражает окисление цитоплазматического пула глутатиона (рис 27А). В тех же клетках F420 индикатора SoNar растет, а F490 меняется незначительно, это свидетельствует о восстановлении пула НАДН в цитоплазме (рис. 27А). В независимом эксперименте мы проверили, изменяется ли в данной системе рН, используя биосенсор SypHer3s [346]. Оказалось, что инкубация клеток с веществом DCA не вызывает изменений рН в цитоплазме клеток. Мы проверили, изменяются ли в аналогичных условиях указанные редокс-параметры в клетках неракового происхождения. В качестве примера мы использовали линию HEK293. В ходе данного исследования мы показали, что существенных изменений соотношений 2GSH/GSSG и НАД⁺/НАДН в клетках HEK293 не происходит (рис. 27Б).

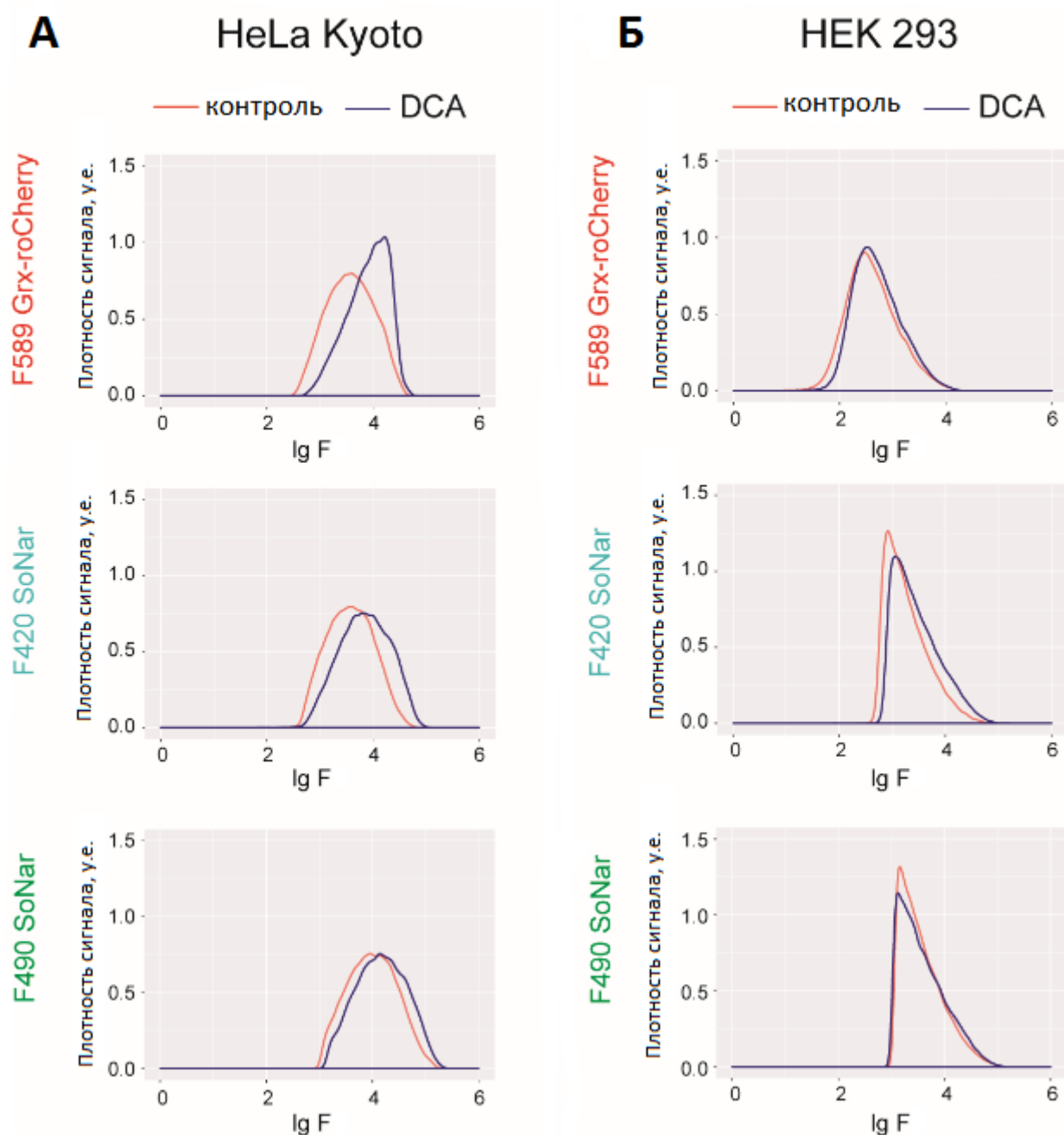


Рис. 27. Распределение флуоресцентного сигнала биосенсоров Grx1-roCherry и SoNar в популяциях клеток HeLa Kyoto и HEK293 при инкубации с DCA.

Распределение сигналов Grx1-roCherry (lgF589) и SoNar (lgF420 и lgF490), которые коэкспрессированы в цитоплазме HeLa Kyoto (А) и HEK293 (Б), после 48 часов инкубации клеток с 30 мМ DCA (синие линии). В качестве отрицательного контроля использовали клетки, не обработанные DCA (красные линии). Ось X – интенсивность флуоресценции в логарифмической шкале, ось Y – KDE (kernel density estimation), ядерная оценка плотности распределения флуоресцентного сигнала в популяции. Каждый график получен по результатам анализа 10000 клеток.

Мы предполагаем, что DCA-опосредованная активация ЭТЦ митохондрий приводит к генерации активных форм кислорода, присутствие которых мобилизует клеточные системы редокс-гомеостаза. Задачей таких ферментативных систем является устранение нежелательных АФК, и многие из них используют глутатион в качестве донора электронов. Этим можно объяснить окисление пула глутатиона при инкубации раковых клеток HeLa Kyoto с DCA. Накопление восстановленной формы НАДН в цитоплазме клеток, обработанных DCA, может быть следствием комплекса причин. Так, активация ПДК напрямую приводит к генерации НАДН. Кроме того, в результате стимуляции работы ПДК запускается выраженный ток пирувата из цитоплазмы в митохондрии. Однако в цитоплазме пируват является субстратом НАДН-зависимой лактатдегидрогеназы, поэтому снижение его концентрации приводит к торможению катализируемой данным ферментом реакции. В результате НАДН может накапливаться.

Таким образом, с одной стороны мы показали, что редокс-изменения могут иметь разных характер в зависимости от типа клеток и их метаболических особенностей. С другой, созданный нами индикатор Grx1-roCherry может быть использован в скрининговых исследованиях для поиска веществ, селективно вызывающих проокислительный сдвиг клеточного гомеостаза раковых клеток.

4.3.4 Динамика 2GSH/GSSG при контролируемой генерации H_2O_2 в цитоплазме и митохондриях клеток разного типа

Редокс-статус клетки гетерогенен: разные компартменты обладают разными окислительно-восстановительными потенциалами и различаются по набору ферментов, вовлеченных в поддержание редокс-гомеостаза [347]. В условиях развития масштабного окислительного стресса основной вклад в окисление внутриклеточного глутатиона вносит генерация пероксида водорода. Однако по-прежнему неизвестно, как генерация пероксида в одном клеточном компартменте влияет на пулы глутатиона в других.

Для изучения подобных процессов необходим инструмент, позволяющий контролируемо генерировать H_2O_2 локально в пределах одного клеточного компартмента. В настоящий момент такой инструмент существует – это оксидаза D-аминокислот (DAO) [348]. DAO катализирует окисление различных D-аминокислот с образованием пероксида водорода в качестве побочного продукта. Внесение в среду субстрата для DAO индуцирует генерацию H_2O_2 в клетках, экспрессирующих этот фермент.

В качестве модели мы выбрали для сравнения клетки HeLa Kyoto и кортикальные нейроны из первичной мышечной смешанной нейрональной эмбриональной культуры. В

этих клетках мы направленно локализовали DAO в ядре либо митохондриях. В качестве субстрата для DAO мы использовали D-норвалин – изомер наиболее часто встречающейся аминокислоты валина. Для регистрации изменений 2GSH/GSSG в этих же клетках мы использовали одновременно цитоплазматическую версию Grx1-roCherry и локализованный в матриксе митохондрий Grx1-roGFP2. Таким образом, при добавлении в клеточную среду субстрата для DAO D-норвалина происходило образование H_2O_2 в ядре или матриксе митохондрий, в зависимости от того, где был локализован фермент. Одновременно с этим мы регистрировали в этих же клетках редокс-статус глутатиона в цитоплазме и митохондриях.

Мы показали, что генерация пероксида водорода в ядре вызывает окисление как цитоплазматического, так и митохондриального пулов глутатиона в обоих типах клеток (рис.28А, Б). У нейронов локальная генерация пероксида водорода в митохондриях также вызывает окисление глутатиона в обоих компартментах (рис. 28В). Однако у клеток HeLa Kyoto при генерации пероксида водорода в митохондриях окисляется лишь глутатион митохондриального матрикса, окисление не затрагивает пул в цитоплазме (рис. 28Г).

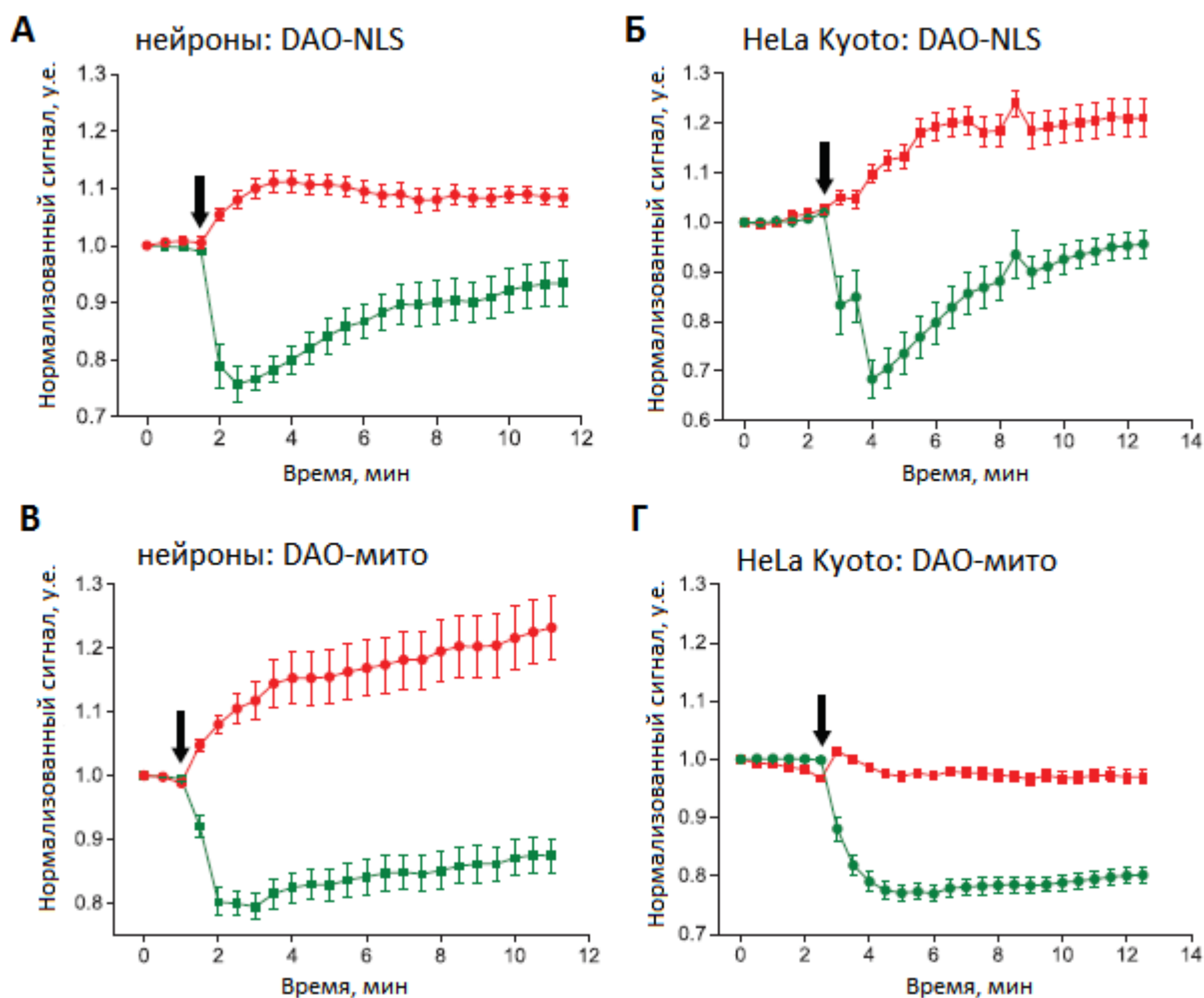


Рис. 28. Динамика редокс-статуса глутатиона в цитоплазме и матриксе митохондрий клеток линии HeLa Kyoto и мышинных нейронов в первичной культуре при локализованной генерации пероксида водорода с помощью фермента DAO.

Grx1-roCherry в цитоплазме (F589, красные линии) и *Grx1-roGFP2* в митохондриях (F488, зеленые линии) клеток линии HeLa Kyoto или мышинных нейронов первичной культуры при контролируемой локальной генерации H_2O_2 с помощью DAO. Фермент DAO направленно локализовали в ядре (А, Б) и в митохондриях (В, Г). Стрелками на всех графиках отмечено внесение 2 мМ D-норвалина – субстрата DAO, индуцирующего генерацию H_2O_2 . Значения сигналов нормированы на исходные. Данные усреднены по результатам минимум 3 экспериментов с не менее чем 11 нейронами и 40 клетками HeLa Kyoto. Планки погрешностей соответствуют стандартной ошибке среднего.

Известен факт, что уровень экспрессии тиоредоксинредуктазы (TrxR), ключевого фермента антиоксидантной защиты, у раковых клеток выше, чем у других типов [349]. В настоящий момент TrxR считается одной из перспективных мишеней при разработке новых антираковых терапий [350]. Мы предположили, что цитоплазма HeLa Kyoto может

оставаться нечувствительной к окислительному стрессу, образуемому в митохондриях при направленной генерации H_2O_2 , из-за повышенной активности TrxR. Для проверки этой гипотезы мы ингибировали TrxR в клетках HeLa Kyoto, в которых коэкспрессировали цитоплазматическую версию Grx1-roCherry и митохондриальные версии фермента DAO и биосенсора Grx1-roGFP2. В качестве специфического ингибитора TrxR использовали ауранофин [351].

Мы показали, что при локальной генерации H_2O_2 в митохондриях клеток HeLa Kyoto, преинкубированных с $2,5 \mu M$ ауранофина в течение ночи, происходит окисление как цитоплазматического, так и митохондриального пулов глутатиона (рис. 29А). Тогда как в контрольных клетках без ингибирования TrxR окисление затрагивает лишь митохондриальный пул (рис. 29Б).

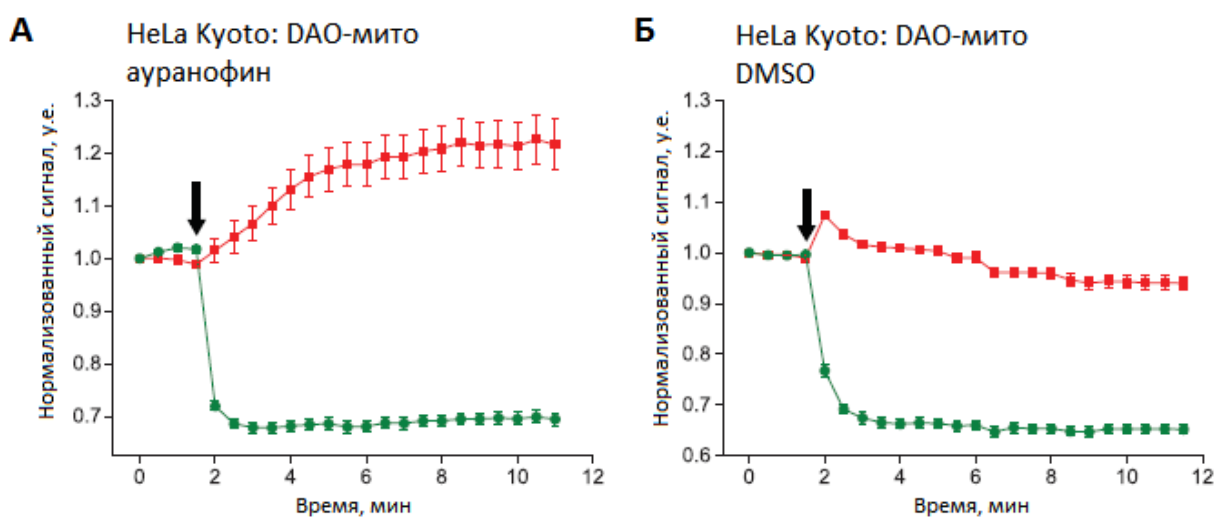


Рис. 29. Динамика соотношения 2GSH/GSSG в цитоплазме и матрице митохондрий клеток линии HeLa Kyoto при локальной генерации H_2O_2 в митохондриях в присутствии и отсутствии ингибитора тиоредоксинредуктазы (TrxR)

Изменение сигнала Grx1-roCherry в цитоплазме (F589, красные линии) и Grx1-roGFP2 в митохондриях (F488, зеленые линии) клеток линии HeLa Kyoto при контролируемой генерации H_2O_2 в митохондриях с помощью DAO. Стрелкой отмечен момент внесения 2 mM D-норвалина – субстрата DAO, индуцирующего генерацию пероксида водорода.

(А) Клетки в течение ночи инкубировали с $2.5 \mu M$ ауранофина, ингибитора TrxR.

(Б) Отрицательный контроль к (А) - клетки преинкубировали с DMSO, растворителем ауранофина.

Усреднено по сигналам минимум 40 клеток из 3 экспериментов. Планки погрешностей соответствуют стандартной ошибке среднего.

Интересно, что параллельно в нашей лаборатории были получены аналогичные данные с использованием генетически кодируемых биосенсоров HyPers для регистрации динамики изменения концентрации H_2O_2 . Согласно этим данным локальная генерация пероксида водорода в митохондриях нейронов также приводит к «утечке» H_2O_2 в цитоплазму, тогда как у опухолевых клеток в тех же условиях цитоплазматические версии биосенсоров HyPers пероксид водорода не детектируют. Это позволяет заключить, что окисление пулов глутатиона в контексте описанных выше экспериментов вызвано ни чем иным, как транспортом эндогенного H_2O_2 между компартментами. Кроме того, мы показали, что TrxR является ключевым ферментом клеток HeLa Kyoto, участвующим в поддержании редокс-статуса цитоплазмы при образовании H_2O_2 в митохондриях.

4.3.5 Grx1-roCherry в тканях модельного объекта *D. rerio*

Красные генетически кодируемые индикаторы особенно востребованы при изучении редокс-процессов на уровне целого организма, поскольку у фотонов, возбуждающих их флуоресценцию, значительно меньше естественных акцепторов в тканях, по сравнению с зелеными индикаторами. Кроме того, зеленый свет с большей длиной волны, который используют для возбуждения флуоресценции красных индикаторов, значительно менее фототоксичен.

Мы протестировали Grx1-roCherry *in vivo* в тканях модельного объекта *D. rerio*. Для этого препарат очищенной мРНК Grx1-roCherry инъецировали в желточный мешок эмбрионов на стадии одной клетки. Выяснили, что Grx1-roCherry экспрессируется в данной системе, флуоресцентный сигнал хорошо визуализируется и интенсивности флуоресценции достаточно для регистрации посредством широкопольного флуоресцентного микроскопа. Для проверки функциональной активности индикатора трансфецированных 2-дневных мальков (рис. 30А) иммобилизовали в капле легкоплавкой агарозы, затем индуцировали окислительный стресс в тканях животных посредством внесения в среду пероксида водорода. Параллельно в режиме реального времени регистрировали изменение сигнала Grx1-roCherry в тканях животного. Поверхностные ткани эмбриона *D. rerio* плохо проницаемы для пероксида водорода, поэтому мы использовали заведомо избыточную концентрацию окислителя (50 мМ). Мы выявили, что индикатор Grx1-roCherry функционально активен в тканях модельного объекта *D. rerio* и пригоден для детекции в них изменений соотношения 2GSH/GSSG (рис. 30В).

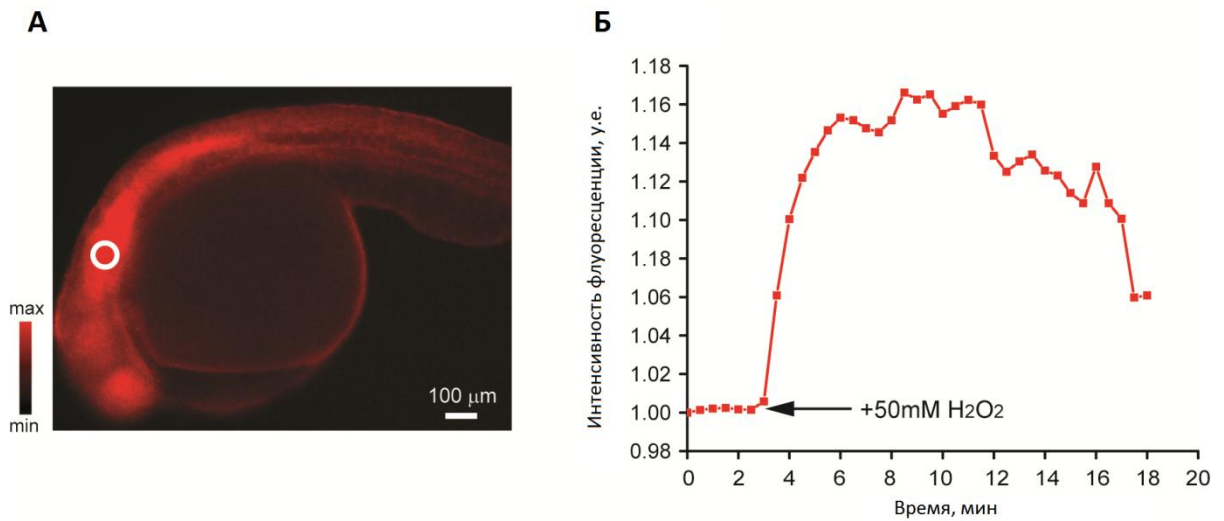


Рис. 30. Grx1-roCherry в тканях двухдневной личинки *D.rerio*.

(А) Изображение личинки *D.rerio*, экспрессирующей *Grx1-roCherry*, полученное с помощью флуоресцентного микроскопа. Белым выделена область, в пределах которой регистрировали сигнал (Б).

(Б) Изменение сигнала *Grx1-roCherry* (F589) после индукции окислительного стресса в тканях личинки *D.rerio* пероксидом водорода.

5. ВЫВОДЫ

- 1) Создан генетически кодируемый красный флуоресцентный индикатор Grx1-roCherry для регистрации соотношения 2GSH/GSSG на основе человеческого глутаредоксина-1 (Grx1) и модифицированного флуоресцентного белка mCherry.
- 2) Полученный индикатор Grx1-roCherry охарактеризован *in vitro*. По биохимическим свойствам Grx1-roCherry сравним с наиболее популярным зеленым аналогом Grx1-roGFP2, что позволяет одновременно использовать эти биосенсоры в разных системах в режиме мультипараметрической микроскопии.
- 3) Редокс-статус цитоплазматического и митохондриального пулов глутатиона изменяется независимо в клетках HeLa Kyoto в условиях гипоксии/реоксигенации.
- 4) Переключение клеточного метаболизма с аэробного гликолиза на окислительное фосфорилирование с помощью химического ингибитора дихлороацетата приводит к окислению пула глутатиона у раковых клеток на примере HeLa Kyoto, но не оказывает влияния на клетки не опухолевого происхождения на примере HEK293.
- 5) Локальная генерация пероксида водорода в матриксе митохондрий оказывает разное влияние на митохондриальное и цитоплазматическое соотношение 2GSH/GSSG в разных типах клеток, в частности, в раковых клетках линии HeLa Kyoto и первичной культуре мышинных кортикальных нейронов. Эндогенное образование пероксида водорода в митохондриях приводит к общему окислению глутатиона в нейронах, однако, в клетках HeLa Kyoto при этом окисляется только митохондриальный пул. При ингибировании в клетках HeLa Kyoto тиоредоксинредуктазной активности окислительный стресс в митохондриях, вызванный локальной генерацией пероксида водорода, также распространяется на цитоплазму.
- 6) Функциональная активность биосенсора Grx1-roCherry была успешно протестирована в тканях модельного объекта *Danio rerio*.

6. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Данная работа посвящена созданию нового генетически кодируемого индикатора редокс-статуса глутатиона, обладающего эмиссией флуоресценции в красной области спектра. Индикатор разработан на основе человеческого глутаредоксина-1 и модифицированного флуоресцентного ядра mCherry, белки соединены полипептидным линкером. Получив сенсорную конструкцию, мы охарактеризовали ее *in vitro* и *in cellulo*. Было установлено, что новый индикатор, названный Grx1-roCherry, по своим биохимическим свойствам сопоставим с зеленым сенсором Grx1-roGFP2, ранее успешно применявшимся в мировой исследовательской практике.

Новый индикатор Grx1-roCherry представляет собой первый молекулярно-биологический инструмент, позволяющий регистрировать динамику изменений редокс-статуса глутатиона по флуоресценции в красном канале. Таким образом, Grx1-roCherry расширяет спектральную панель существующих генетически кодируемых индикаторов на базе флуоресцентных белков, что позволит комбинировать их друг с другом для использования в более информативном режиме мультипараметрической микроскопии. Эмиссия в красной области спектра делает Grx1-roCherry перспективным биосенсором для использования в толстых образцах, например, в тканях трансгенных животных.

С помощью нового биосенсора Grx1-roCherry и имеющегося Grx1-roGFP2 в режиме мультипараметрической микроскопии мы продемонстрировали разную динамику редокс-состояния цитоплазматического и митохондриального пулов глутатиона в условиях модели гипоксии/реоксигенации. Применение Grx1-roCherry в клетках опухолевого и неопухолевого происхождения показало, что переключение метаболизма с гликолиза на окислительное фосфорилирование ведет к избирательному проокислительному сдвигу редокс-статуса опухолевых клеток на примере HeLa Kyoto. Кроме того, с помощью мультипараметрической микроскопии с использованием биосенсора Grx1-roGFP2 и созданного Grx1-roCherry нами было обнаружено различное поведение редокс-статуса глутатиона в разных компартментах раковых клеток и нейронов при развитии локального окислительного стресса в митохондриях. Мы также установили, что в клетках HeLa Kyoto фермент тиоредоксинредуктаза играет ключевую роль в предотвращении распространения окислительного стресса на цитоплазматический пул глутатиона при генерации пероксида водорода в митохондриях. Наконец, мы получили эмбрионы *D. rerio* с временной повсеместной экспрессией Grx1-roCherry в тканях. В данной системе биосенсор демонстрирует выраженный сигнал и сохраняет функциональную активность.

Созданный биосенсор Grx1-roCherry соответствует всем требованиям, которые предъявляют к современным генетически кодируемым индикаторам на базе

флуоресцентных белков. Есть основания полагать, что Gtx1-roCherry будут успешно применять для визуализации редокс-статуса внутриклеточного пула глутатиона в различных медико-биологических исследованиях.

7. СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

5-IAF – 5-иодоацетамидофлуоресцеин

ABD-F – 4-флуоро-7-сулафамоилбензофуразан

AP-1 – белок активатор-1

avGFP – GFP дикого типа

BODIPY – 4,4-дифлуоро-4-боро-3а,4а-диазо-s-индацен

BSO – L-бутионин-(S, R)-сульфоксимин

CMPI – 2-хлоро-1-метилпиридиниума иодид

CMQT – 2-хлоро-1-метилхинолина тетрафлуороборат

срmApple – круговой пермутант mApple

срYFP – круговой пермутант желтого флуоресцентного белка

DAO – оксидаза D-аминокислот

DCA – дихлороацетат

DMF – диметилфумарат

DMSO – диметилсульфоксид

dNTP – дезоксирибонуклеотидтрифосфат

DOFLA – ориентированный на разнообразие метод создания флуоресцентных библиотек

DPT – дипептидаза

DTT – дитиотреитол

EGFP – enhanced GFP, улучшенный GFP

ESPT – Excited State Proton Transfer, перенос протона возбужденного состояния

FBS – эмбриональная телячья сыворотка

FRET – Фёрстеровский резонансный перенос энергии

GCLC – каталитическая субъединица γ -глутамилцистеинсинтетазы

GCLM – регуляторная субъединица γ -глутамилцистеинсинтетазы

Grx – глутатионпероксидаза

GR – НАДФН-зависимая глутатионредуктаза

Grx – глутаредоксин

GSH – восстановленный глутатион

GSNO – S-нитрозоглутатион

GSSG – окисленный глутатион

GSTP – P-изоформа глутатион-S-трансферазы

HEK293 – линия человеческих эмбриональных клеток почек

HeLa – линия клеток рака шейки матки человека

HEPES – 2-[4-(2-гидроксиэтил)-1-пиперазин]-этансульфоновая кислота
LOX – липооксигеназа
LSS – large Stokes shift, увеличенный стоксовский сдвиг
mBrB – монобромобиман
MDR – белки множественной устойчивости
MS-222 – готовый раствор трикаина мезилата
NAT – N-ацетилтрансфераза
NFκB – ядерный фактор kappa B
NOS – NO-синтаза
NOX – НАДФН-оксидаза
OptiMEM – обедненная клеточная среда
OXP – 5-оксопролиназа
PAPS – 3'-фосфоаденилсульфат
PBS – натрий-фосфатный буфер
PDI – белковая дисульфидизомераза
Pgx – пероксиредоксин
RFP – красный флуоресцентный белок
roGFP – red/ox GFP, редокс-чувствительный GFP
RPMI1640 – среда «Roswell Park Memorial Institute»
rxRFP – red/ox RFP, редокс-чувствительный RFP
rxYFP – red/ox YFP, редокс-чувствительный YFP
SBD-F – аммониевая соль 7- флуоробензо-2-оксо-1,3-диазол-4-сульфоновой кислоты
SMCP – связанный с митохондриями сперматозоидов белок, богатый цистеином
SOB – Super Optimal Broth, среда для культивирования бактерий
Sgx – сульфиредоксин
Tgx – тиоредоксин
TgxR – тиоредоксинредуктаза
YFP – желтый флуоресцентный белок
γ-GCT – γ-глутамилциклотрансфераза
γ-GT – γ-глутамилтранспептидаза
АТФ – аденозинтрифосфат
АФА – активные формы азота
АФК – активные формы кислорода
АФХ – активные формы хлора
ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

мРНК – матричная рибонуклеиновая кислота

НАД⁺ – окисленная форма никотинамидадениндинуклеотида

НАДН – восстановленная форма никотинамидадениндинуклеотида

НАДФ⁺ – окисленная форма никотинамидадениндинуклеотидфосфата

НАДФН – восстановленная форма никотинамидадениндинуклеотидфосфата

ПДК – пируватдегидрогеназный комплекс

СОД – супероксиддисмутаза

ФБ – флуоресцентный белок

ЭДТА – этилендиаминтетрауксусная кислота

ЭПР – эндоплазматический ретикулум

ЭТЦ – электронтранспортная цепь митохондрий

8. СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Viña J. et al. The effect of cysteine oxidation on isolated hepatocytes // *Biochem. J.* 1983. Vol. 212, № 1. P. 39–44.
2. Meister A., Anderson M.E. Glutathione // *Annu. Rev. Biochem.* 1983. Vol. 52, № 1. P. 711–760.
3. Meister A. Glutathione metabolism and its selective modification. // *J. Biol. Chem.* 1988. Vol. 263, № 33. P. 17205–17208.
4. ZITKA O. et al. Redox status expressed as GSH:GSSG ratio as a marker for oxidative stress in paediatric tumour patients // *Oncol. Lett.* 2012. Vol. 4, № 6. P. 1247–1253.
5. Huang C.S. et al. Catalytic and regulatory properties of the heavy subunit of rat kidney gamma-glutamylcysteine synthetase. // *J. Biol. Chem.* 1993. Vol. 268, № 26. P. 19675–19680.
6. Shi Z.-Z. et al. Glutathione synthesis is essential for mouse development but not for cell growth in culture // *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2000. Vol. 97, № 10. P. 5101–5106.
7. Yang Y. et al. Initial Characterization of the Glutamate-Cysteine Ligase Modifier Subunit *Gclm* (–/–) Knockout Mouse // *J. Biol. Chem.* 2002. Vol. 277, № 51. P. 49446–49452.
8. Kann S. et al. Butylhydroquinone Protects Cells Genetically Deficient in Glutathione Biosynthesis from Arsenite-Induced Apoptosis Without Significantly Changing Their Prooxidant Status // *Toxicol. Sci.* 2005. Vol. 87, № 2. P. 365–384.
9. Giordano G. et al. Neurotoxicity of Domoic Acid in Cerebellar Granule Neurons in a Genetic Model of Glutathione Deficiency // *Mol. Pharmacol.* 2006. Vol. 70, № 6. P. 2116–2126.
10. Giordano G. et al. Glutathione Levels Modulate Domoic Acid-Induced Apoptosis in Mouse Cerebellar Granule Cells // *Toxicol. Sci.* 2007. Vol. 100, № 2. P. 433–444.
11. Dahl N. Missense mutations in the human glutathione synthetase gene result in severe metabolic acidosis, 5-oxoprolinuria, hemolytic anemia and neurological dysfunction // *Hum. Mol. Genet.* 1997. Vol. 6, № 7. P. 1147–1152.
12. Ristoff E., Mayatepek E., Larsson A. Long-term clinical outcome in patients with glutathione synthetase deficiency // *J. Pediatr.* 2001. Vol. 139, № 1. P. 79–84.
13. Franco R. et al. The central role of glutathione in the pathophysiology of human diseases // *Arch. Physiol. Biochem.* 2007. Vol. 113, № 4–5. P. 234–258.
14. Griffith O.W., Meister A. Glutathione: interorgan translocation, turnover, and metabolism. // *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1979. Vol. 76, № 11. P. 5606–5610.
15. Meister A. New aspects of glutathione biochemistry and transport: selective alteration of

- glutathione metabolism. // Fed. Proc. 1984. Vol. 43, № 15. P. 3031–3042.
16. Meister A., Anderson M.E., Hwang O. Intracellular cysteine and glutathione delivery systems. // J. Am. Coll. Nutr. 1986. Vol. 5, № 2. P. 137–151.
 17. Estrela J.M., Ortega A., Obrador E. Glutathione in Cancer Biology and Therapy // Crit. Rev. Clin. Lab. Sci. 2006. Vol. 43, № 2. P. 143–181.
 18. Orłowski M., Meister A. The γ -Glutamyl Cycle: A Possible Transport System for Amino Acids // Proc. Natl. Acad. Sci. 1970. Vol. 67, № 3. P. 1248–1255.
 19. Wu G. et al. Glutathione Metabolism and Its Implications for Health // J. Nutr. 2004. Vol. 134, № 3. P. 489–492.
 20. Lu S.C. Regulation of glutathione synthesis // Mol. Aspects Med. 2009. Vol. 30, № 1–2. P. 42–59.
 21. Kojer K. et al. Glutathione redox potential in the mitochondrial intermembrane space is linked to the cytosol and impacts the Mia40 redox state // EMBO J. 2012. Vol. 31, № 14. P. 3169–3182.
 22. Marí M. et al. Mitochondrial Glutathione, a Key Survival Antioxidant // Antioxid. Redox Signal. 2009. Vol. 11, № 11. P. 2685–2700.
 23. Zhong Q. et al. Hepatic mitochondrial transport of glutathione: Studies in isolated rat liver mitochondria and H4IIE rat hepatoma cells // Arch. Biochem. Biophys. 2008. Vol. 474, № 1. P. 119–127.
 24. Booty L.M. et al. The mitochondrial dicarboxylate and 2-oxoglutarate carriers do not transport glutathione // FEBS Lett. 2015. Vol. 589, № 5. P. 621–628.
 25. Bellomo G. et al. Demonstration of nuclear compartmentalization of glutathione in hepatocytes. // Proc. Natl. Acad. Sci. 1992. Vol. 89, № 10. P. 4412–4416.
 26. Markovic J. et al. Glutathione Is Recruited into the Nucleus in Early Phases of Cell Proliferation // J. Biol. Chem. 2007. Vol. 282, № 28. P. 20416–20424.
 27. Atzori L. et al. Growth-associated modifications of low-molecular-weight thiols and protein sulfhydryls in human bronchial fibroblasts // J. Cell. Physiol. 1990. Vol. 143, № 1. P. 165–171.
 28. Pallardó F. V. et al. Role of nuclear glutathione as a key regulator of cell proliferation // Mol. Aspects Med. 2009. Vol. 30, № 1–2. P. 77–85.
 29. Fujii H. et al. C-Reactive Protein Alters Antioxidant Defenses and Promotes Apoptosis in Endothelial Progenitor Cells // Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 2006. Vol. 26, № 11. P. 2476–2482.
 30. Brown K.E. et al. Increased hepatic telomerase activity in a rat model of iron overload: A role for altered thiol redox state? // Free Radic. Biol. Med. 2007. Vol. 42, № 2. P. 228–

- 235.
31. Borrás C. et al. Glutathione Regulates Telomerase Activity in 3T3 Fibroblasts // *J. Biol. Chem.* 2004. Vol. 279, № 33. P. 34332–34335.
 32. Voehringer D.W. et al. Bcl-2 expression causes redistribution of glutathione to the nucleus // *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1998. Vol. 95, № 6. P. 2956–2960.
 33. Diaz Vivancos P. et al. A nuclear glutathione cycle within the cell cycle // *Biochem. J.* 2010. Vol. 431, № 2. P. 169–178.
 34. Wilkins H.M. et al. Bcl-2 is a novel interacting partner for the 2-oxoglutarate carrier and a key regulator of mitochondrial glutathione // *Free Radic. Biol. Med.* 2012. Vol. 52, № 2. P. 410–419.
 35. Hudson D.A., Gannon S.A., Thorpe C. Oxidative protein folding: From thiol–disulfide exchange reactions to the redox poise of the endoplasmic reticulum // *Free Radic. Biol. Med.* 2015. Vol. 80. P. 171–182.
 36. Ruddock L.W. Low-Molecular-Weight Oxidants Involved in Disulfide Bond Formation // *Antioxid. Redox Signal.* 2012. Vol. 16, № 10. P. 1129–1138.
 37. Chakravarthi S., Jessop C.E., Bulleid N.J. The role of glutathione in disulphide bond formation and endoplasmic-reticulum-generated oxidative stress // *EMBO Rep.* 2006. Vol. 7, № 3. P. 271–275.
 38. Gruber C.W. et al. Protein disulfide isomerase: the structure of oxidative folding // *Trends Biochem. Sci.* 2006. Vol. 31, № 8. P. 455–464.
 39. Wang C. et al. Structural Insights into the Redox-Regulated Dynamic Conformations of Human Protein Disulfide Isomerase // *Antioxid. Redox Signal.* 2013. Vol. 19, № 1. P. 36–45.
 40. Sevier C.S., Kaiser C.A. Ero1 and redox homeostasis in the endoplasmic reticulum // *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* 2008. Vol. 1783, № 4. P. 549–556.
 41. Tavender T.J., Springate J.J., Bulleid N.J. Recycling of peroxiredoxin IV provides a novel pathway for disulphide formation in the endoplasmic reticulum // *EMBO J.* 2010. Vol. 29, № 24. P. 4185–4197.
 42. Tu B.P., Weissman J.S. The FAD- and O₂-Dependent Reaction Cycle of Ero1-Mediated Oxidative Protein Folding in the Endoplasmic Reticulum // *Mol. Cell.* 2002. Vol. 10, № 5. P. 983–994.
 43. Cuzzo J.W., Kaiser C.A. Competition between glutathione and protein thiols for disulphide-bond formation // *Nat. Cell Biol.* 1999. Vol. 1, № 3. P. 130–135.
 44. Tsunoda S. et al. Intact protein folding in the glutathione-depleted endoplasmic reticulum implicates alternative protein thiol reductants // *Elife.* 2014. Vol. 3.

45. Bánhegyi G. et al. Preferential Transport of Glutathione *versus* Glutathione Disulfide in Rat Liver Microsomal Vesicles // *J. Biol. Chem.* 1999. Vol. 274, № 18. P. 12213–12216.
46. Le Gall S., Neuhofer A., Rapoport T. The Endoplasmic Reticulum Membrane Is Permeable to Small Molecules // *Mol. Biol. Cell.* 2004. Vol. 15, № 2. P. 447–455.
47. Ponsoero A.J. et al. Endoplasmic Reticulum Transport of Glutathione by Sec61 Is Regulated by Ero1 and Bip // *Mol. Cell.* 2017. Vol. 67, № 6. P. 962-973.e5.
48. Walker C.L. et al. Redox Regulation of Homeostasis and Proteostasis in Peroxisomes // *Physiol. Rev.* 2018. Vol. 98, № 1. P. 89–115.
49. Antonenkov V.D., Hiltunen J.K. Peroxisomal membrane permeability and solute transfer // *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* 2006. Vol. 1763, № 12. P. 1697–1706.
50. Wang X. et al. Redox regulated peroxisome homeostasis // *Redox Biol.* 2015. Vol. 4. P. 104–108.
51. Newton G.L. et al. Distribution of thiols in microorganisms: mycothiol is a major thiol in most actinomycetes. // *J. Bacteriol.* 1996. Vol. 178, № 7. P. 1990–1995.
52. Fahey R.C. Novel Thiols of Prokaryotes // *Annu. Rev. Microbiol.* 2001. Vol. 55, № 1. P. 333–356.
53. Bartsch R.G. et al. Glutathione amide and its perthiol in anaerobic sulfur bacteria. // *J. Bacteriol.* 1996. Vol. 178, № 15. P. 4742–4746.
54. Masip L., Veeravalli K., Georgiou G. The Many Faces of Glutathione in Bacteria // *Antioxid. Redox Signal.* 2006. Vol. 8, № 5–6. P. 753–762.
55. Csonka L.N. Physiological and genetic responses of bacteria to osmotic stress. // *Microbiol. Rev.* 1989. Vol. 53, № 1. P. 121–147.
56. Chesney J.A., Eaton J.W., Mahoney J.R. Bacterial glutathione: a sacrificial defense against chlorine compounds. // *J. Bacteriol.* 1996. Vol. 178, № 7. P. 2131–2135.
57. Hondorp E.R., Matthews R.G. Oxidative Stress Inactivates Cobalamin-Independent Methionine Synthase (MetE) in *Escherichia coli* // *PLoS Biol.* / ed. Joan Valentine. 2004. Vol. 2, № 11. P. e336.
58. Lillig C.H. et al. Redox Regulation of 3'-Phosphoadenylylsulfate Reductase from *Escherichia coli* by Glutathione and Glutaredoxins // *J. Biol. Chem.* 2003. Vol. 278, № 25. P. 22325–22330.
59. Winterbourn C.C., Hampton M.B. Thiol chemistry and specificity in redox signaling // *Free Radic. Biol. Med.* 2008. Vol. 45, № 5. P. 549–561.
60. FRIDOVICH I. Fundamental Aspects of Reactive Oxygen Species, or What's the Matter with Oxygen? // *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1999. Vol. 893, № 1 OXIDATIVE/ENE. P. 13–18.
61. GILBERT D.L. Fifty Years of Radical Ideas // *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2006. Vol. 899, №

1. P. 1–14.
62. Evans P., Halliwell B. Micronutrients: oxidant/antioxidant status. // *Br. J. Nutr.* 2001. Vol. 85 Suppl 2. P. S67-74.
63. WU G., MORRIS S.M. Arginine metabolism: nitric oxide and beyond // *Biochem. J.* 1998. Vol. 336, № 1. P. 1–17.
64. Fang Y.-Z., Yang S., Wu G. Free radicals, antioxidants, and nutrition. // *Nutrition.* 2002. Vol. 18, № 10. P. 872–879.
65. Badwey J.A., Karnovsky M.L. Active Oxygen Species and the Functions of Phagocytic Leukocytes // *Annu. Rev. Biochem.* 1980. Vol. 49, № 1. P. 695–726.
66. Li Q. et al. Endosomal Nox2 Facilitates Redox-Dependent Induction of NF- κ B by TNF- α // *Antioxid. Redox Signal.* 2009. Vol. 11, № 6. P. 1249–1263.
67. McCord J.M. The evolution of free radicals and oxidative stress. // *Am. J. Med.* 2000. Vol. 108, № 8. P. 652–659.
68. Aratani Y. Myeloperoxidase: Its role for host defense, inflammation, and neutrophil function // *Arch. Biochem. Biophys.* 2018. Vol. 640. P. 47–52.
69. Fang Y.-Z., Yang S., Wu G. Free radicals, antioxidants, and nutrition // *Nutrition.* 2002. Vol. 18, № 10. P. 872–879.
70. Gupta V., Carroll K.S. Sulfenic acid chemistry, detection and cellular lifetime // *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* 2014. Vol. 1840, № 2. P. 847–875.
71. Reddie K.G., Carroll K.S. Expanding the functional diversity of proteins through cysteine oxidation // *Curr. Opin. Chem. Biol.* 2008. Vol. 12, № 6. P. 746–754.
72. Paulsen C.E., Carroll K.S. Orchestrating Redox Signaling Networks through Regulatory Cysteine Switches // *ACS Chem. Biol.* 2010. Vol. 5, № 1. P. 47–62.
73. Lo Conte M., Carroll K.S. The Redox Biochemistry of Protein Sulfenylation and Sulfinylation // *J. Biol. Chem.* 2013. Vol. 288, № 37. P. 26480–26488.
74. Chouchani E.T. et al. Mitochondrial ROS regulate thermogenic energy expenditure and sulfenylation of UCP1 // *Nature.* 2016. Vol. 532, № 7597. P. 112–116.
75. Gupta V., Paritala H., Carroll K.S. Reactivity, Selectivity, and Stability in Sulfenic Acid Detection: A Comparative Study of Nucleophilic and Electrophilic Probes // *Bioconjug. Chem.* 2016. Vol. 27, № 5. P. 1411–1418.
76. Georgiou G. BIOCHEMISTRY: An Overoxidation Journey with a Return Ticket // *Science (80-.)*. 2003. Vol. 300, № 5619. P. 592–594.
77. Thamsen M. et al. Is Overoxidation of Peroxiredoxin Physiologically Significant? // *Antioxid. Redox Signal.* 2011. Vol. 14, № 4. P. 725–730.
78. Wood Z.A. Peroxiredoxin Evolution and the Regulation of Hydrogen Peroxide Signaling

- // Science (80-.). 2003. Vol. 300, № 5619. P. 650–653.
79. Fujii J. et al. Physiological Relevance of Antioxid/Redox Genes;
Learning from Genetically Modified Animals
Guest Editor: Junichi Fujii

Unveiling the roles of the glutathione redox system <i>in vivo</i> by analyzing genetically modified mice // J. Clin. Biochem. Nutr. 2011. Vol. 49, № 2. P. 70–78.
 80. Rhee S.G., Woo H.A. Multiple Functions of Peroxiredoxins: Peroxidases, Sensors and Regulators of the Intracellular Messenger H₂O₂, and Protein Chaperones // Antioxid. Redox Signal. 2011. Vol. 15, № 3. P. 781–794.
 81. Winterbourn C.C. The Biological Chemistry of Hydrogen Peroxide. 2013. P. 3–25.
 82. Rhee S.G. et al. Peroxiredoxin, a Novel Family of Peroxidases // IUBMB Life (International Union Biochem. Mol. Biol. Life). 2001. Vol. 52, № 1. P. 35–41.
 83. Hofmann B., Hecht H.-J., Flohé L. Peroxiredoxins // Biol. Chem. 2002. Vol. 383, № 3–4.
 84. Seo M.S. et al. Identification of a New Type of Mammalian Peroxiredoxin That Forms an Intramolecular Disulfide as a Reaction Intermediate // J. Biol. Chem. 2000. Vol. 275, № 27. P. 20346–20354.
 85. Choi H.-J. et al. Crystal structure of a novel human peroxidase enzyme at 2.0 Å resolution // Nat. Struct. Biol. 1998. Vol. 5, № 5. P. 400–406.
 86. Peshenko I. V, Shichi H. Oxidation of active center cysteine of bovine 1-Cys peroxiredoxin to the cysteine sulfenic acid form by peroxide and peroxyxynitrite // Free Radic. Biol. Med. 2001. Vol. 31, № 3. P. 292–303.
 87. Lee S.P. et al. Cyclophilin A Binds to Peroxiredoxins and Activates Its Peroxidase Activity // J. Biol. Chem. 2001. Vol. 276, № 32. P. 29826–29832.
 88. Rhee S.G. et al. Peroxiredoxin Functions as a Peroxidase and a Regulator and Sensor of Local Peroxides // J. Biol. Chem. 2012. Vol. 287, № 7. P. 4403–4410.
 89. Wood Z.A. et al. Structure, mechanism and regulation of peroxiredoxins // Trends Biochem. Sci. 2003. Vol. 28, № 1. P. 32–40.
 90. Pascual M.B. et al. Overoxidation of 2-Cys Peroxiredoxin in Prokaryotes // J. Biol. Chem. 2010. Vol. 285, № 45. P. 34485–34492.
 91. Biteau B., Labarre J., Toledano M.B. ATP-dependent reduction of cysteine–sulphinic acid by *S. cerevisiae* sulphiredoxin // Nature. 2003. Vol. 425, № 6961. P. 980–984.
 92. Findlay V.J. et al. A Novel Role for Human Sulfiredoxin in the Reversal of Glutathionylation // Cancer Res. 2006. Vol. 66, № 13. P. 6800–6806.
 93. Stepovaya E.A. et al. the Thioredoxin System in Regulating MCF-7 Cell Proliferation Under Redox Status Modulation // Sib. J. Oncol. 2016. Vol. 15, № 4. P. 50–55.

94. Rizzo M.A. et al. An improved cyan fluorescent protein variant useful for FRET // *Nat. Biotechnol.* Nature Publishing Group, 2004. Vol. 22, № 4. P. 445–449.
95. Nordberg J., Arnér E.S. Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. // *Free Radic. Biol. Med.* 2001. Vol. 31, № 11. P. 1287–1312.
96. Mustacich D., Powis G. Thioredoxin reductase. // *Biochem. J.* Portland Press Ltd, 2000. Vol. 346 Pt 1, № Pt 1. P. 1–8.
97. Lee S., Kim S.M., Lee R.T. Thioredoxin and thioredoxin target proteins: from molecular mechanisms to functional significance. // *Antioxid. Redox Signal.* Mary Ann Liebert, Inc., 2013. Vol. 18, № 10. P. 1165–1207.
98. Daily D. et al. Glutaredoxin Protects Cerebellar Granule Neurons from Dopamine-induced Apoptosis by Activating NF- κ B via Ref-1 // *J. Biol. Chem.* 2001. Vol. 276, № 2. P. 1335–1344.
99. KLATT P. et al. Redox regulation of c-Jun DNA binding by reversible S-glutathiolation // *FASEB J.* 1999. Vol. 13, № 12. P. 1481–1490.
100. Andersson M., Holmgren A., Spyrou G. NK-lysin, a Disulfide-containing Effector Peptide of T-lymphocytes, Is Reduced and Inactivated by Human Thioredoxin Reductase // *J. Biol. Chem.* 1996. Vol. 271, № 17. P. 10116–10120.
101. Holmgren A., Lyckeberg C. Enzymatic reduction of alloxan by thioredoxin and NADPH-thioredoxin reductase. // *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1980. Vol. 77, № 9. P. 5149–5152.
102. Arscott L.D. et al. The mechanism of thioredoxin reductase from human placenta is similar to the mechanisms of lipoamide dehydrogenase and glutathione reductase and is distinct from the mechanism of thioredoxin reductase from *Escherichia coli* // *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1997. Vol. 94, № 8. P. 3621–3626.
103. Buettner G.R. The Pecking Order of Free Radicals and Antioxidants: Lipid Peroxidation, α -Tocopherol, and Ascorbate // *Arch. Biochem. Biophys.* 1993. Vol. 300, № 2. P. 535–543.
104. Miranda-Vizueté A., Damdimopoulos A.E., Spyrou G. cDNA cloning, expression and chromosomal localization of the mouse mitochondrial thioredoxin reductase gene(1). // *Biochim. Biophys. Acta.* 1999. Vol. 1447, № 1. P. 113–118.
105. Sun Q.-A. et al. Selenoprotein oxidoreductase with specificity for thioredoxin and glutathione systems // *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2001. Vol. 98, № 7. P. 3673–3678.
106. Sun Q.-A. et al. Redox Regulation of Cell Signaling by Selenocysteine in Mammalian Thioredoxin Reductases // *J. Biol. Chem.* 1999. Vol. 274, № 35. P. 24522–24530.
107. Lundberg M. et al. Cloning and Expression of a Novel Human Glutaredoxin (Grx2) with Mitochondrial and Nuclear Isoforms // *J. Biol. Chem.* 2001. Vol. 276, № 28. P. 26269–

- 26275.
108. Wingert R.A. et al. Deficiency of glutaredoxin 5 reveals Fe–S clusters are required for vertebrate haem synthesis // *Nature*. 2005. Vol. 436, № 7053. P. 1035–1039.
 109. Chrestensen C.A., Starke D.W., Mieyal J.J. Acute Cadmium Exposure Inactivates Thioltransferase (Glutaredoxin), Inhibits Intracellular Reduction of Protein-glutathionyl-mixed Disulfides, and Initiates Apoptosis // *J. Biol. Chem.* 2000. Vol. 275, № 34. P. 26556–26565.
 110. Gravina S.A., Mieyal J.J. Thioltransferase is a specific glutathionyl mixed-disulfide oxidoreductase // *Biochemistry*. 1993. Vol. 32, № 13. P. 3368–3376.
 111. Wang J. et al. Reversible Glutathionylation Regulates Actin Polymerization in A431 Cells // *J. Biol. Chem.* 2001. Vol. 276, № 51. P. 47763–47766.
 112. Adachi T. et al. S -Glutathiolation of Ras Mediates Redox-sensitive Signaling by Angiotensin II in Vascular Smooth Muscle Cells // *J. Biol. Chem.* 2004. Vol. 279, № 28. P. 29857–29862.
 113. Adachi T. et al. S-Glutathiolation by peroxynitrite activates SERCA during arterial relaxation by nitric oxide // *Nat. Med.* 2004. Vol. 10, № 11. P. 1200–1207.
 114. Reynaert N.L. et al. Dynamic redox control of NF- B through glutaredoxin-regulated S-glutathionylation of inhibitory B kinase beta // *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2006. Vol. 103, № 35. P. 13086–13091.
 115. Barrett W.C. et al. Regulation of PTP1B via Glutathionylation of the Active Site Cysteine 215 // *Biochemistry*. 1999. Vol. 38, № 20. P. 6699–6705.
 116. Berndt C. et al. How Does Iron–Sulfur Cluster Coordination Regulate the Activity of Human Glutaredoxin 2? // *Antioxid. Redox Signal.* 2007. Vol. 9, № 1. P. 151–157.
 117. Rodríguez-Manzaneque M.T. et al. Grx5 Is a Mitochondrial Glutaredoxin Required for the Activity of Iron/Sulfur Enzymes // *Mol. Biol. Cell* / ed. Fox T.D. 2002. Vol. 13, № 4. P. 1109–1121.
 118. Wingert R.A. et al. Deficiency of glutaredoxin 5 reveals Fe–S clusters are required for vertebrate haem synthesis // *Nature*. Nature Publishing Group, 2005. Vol. 436, № 7053. P. 1035–1039.
 119. Ye H. et al. Glutaredoxin 5 deficiency causes sideroblastic anemia by specifically impairing heme biosynthesis and depleting cytosolic iron in human erythroblasts // *J. Clin. Invest.* 2010. Vol. 120, № 5. P. 1749–1761.
 120. Schulz G.E. et al. The structure of the flavoenzyme glutathione reductase // *Nature*. 1978. Vol. 273, № 5658. P. 120–124.
 121. Karplus P.A., Schulz G.E. Refined structure of glutathione reductase at 1.54 Å resolution

- // J. Mol. Biol. 1987. Vol. 195, № 3. P. 701–729.
122. Yu J., Zhou C.-Z. Crystal structure of glutathione reductase Glr1 from the yeast *Saccharomyces cerevisiae* // *Proteins Struct. Funct. Bioinforma.* 2007. Vol. 68, № 4. P. 972–979.
 123. Mittl P.R.E., Schulz G.E. Structure of glutathione reductase from *Escherichia coli* at 1.86 Å resolution: Comparison with the enzyme from human erythrocytes // *Protein Sci.* 2008. Vol. 3, № 5. P. 799–809.
 124. Welty S.E. et al. Immunolocalization and Functional Analysis of Human Glutathione Reductase Targeted to the Mitochondria // *Pediatr. Res.* Nature Publishing Group, 1999. Vol. 45, № 4, Part 2 of 2. P. 326A-326A.
 125. Rogers L.K. Nuclear and Nucleolar Glutathione Reductase, Peroxidase, and Transferase Activities in Livers of Male and Female Fischer-344 Rats // *Toxicol. Sci.* 2002. Vol. 69, № 1. P. 279–285.
 126. Chiang H.-S., Maric M. Lysosomal thiol reductase negatively regulates autophagy by altering glutathione synthesis and oxidation // *Free Radic. Biol. Med.* 2011. Vol. 51, № 3. P. 688–699.
 127. Ge C. et al. Import Determinants of Organelle-Specific and Dual Targeting Peptides of Mitochondria and Chloroplasts in *Arabidopsis thaliana* // *Mol. Plant.* 2014. Vol. 7, № 1. P. 121–136.
 128. Oliveira P. et al. The *Anabaena* sp. PCC 7120 Exoproteome: Taking a Peek outside the Box // *Life.* 2015. Vol. 5, № 1. P. 130–163.
 129. Outten C.E., Culotta V.C. Alternative Start Sites in the *Saccharomyces cerevisiae* *GLR1* Gene Are Responsible for Mitochondrial and Cytosolic Isoforms of Glutathione Reductase // *J. Biol. Chem.* 2004. Vol. 279, № 9. P. 7785–7791.
 130. Kelner M.J., Montoya M.A. Structural Organization of the Human Glutathione Reductase Gene: Determination of Correct cDNA Sequence and Identification of a Mitochondrial Leader Sequence // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2000. Vol. 269, № 2. P. 366–368.
 131. Kamerbeek N.M. et al. Molecular basis of glutathione reductase deficiency in human blood cells // *Blood.* 2007. Vol. 109, № 8. P. 3560–3566.
 132. Brigelius-Flohé R., Maiorino M. Glutathione peroxidases // *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* 2013. Vol. 1830, № 5. P. 3289–3303.
 133. Maiorino F.M. et al. [5] Diversity of glutathione peroxidases // *Methods Enzymol.* Academic Press, 1995. Vol. 252. P. 38–53.
 134. Quintana-Cabrera R. et al. γ -Glutamylcysteine detoxifies reactive oxygen species by acting as glutathione peroxidase-1 cofactor // *Nat. Commun.* 2012. Vol. 3, № 1. P. 718.

135. Cheng W.-H. et al. Cellular Glutathione Peroxidase Is the Mediator of Body Selenium To Protect against Paraquat Lethality in Transgenic Mice // *J. Nutr.* 1998. Vol. 128, № 7. P. 1070–1076.
136. Brigelius-Flohé R., Flohé L. Basic Principles and Emerging Concepts in the Redox Control of Transcription Factors // *Antioxid. Redox Signal.* 2011. Vol. 15, № 8. P. 2335–2381.
137. McClung J.P. et al. Development of insulin resistance and obesity in mice overexpressing cellular glutathione peroxidase // *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2004. Vol. 101, № 24. P. 8852–8857.
138. Liu J. et al. Redox Regulation of Pancreatic Cancer Cell Growth: Role of Glutathione Peroxidase in the Suppression of the Malignant Phenotype // *Hum. Gene Ther.* 2004. Vol. 15, № 3. P. 239–250.
139. Chu F.F., Doroshov J.H., Esworthy R.S. Expression, characterization, and tissue distribution of a new cellular selenium-dependent glutathione peroxidase, GSHPx-GI. // *J. Biol. Chem.* 1993. Vol. 268, № 4. P. 2571–2576.
140. Florian S. et al. Loss of GPx2 increases apoptosis, mitosis, and GPx1 expression in the intestine of mice // *Free Radic. Biol. Med.* 2010. Vol. 49, № 11. P. 1694–1702.
141. Whittin J.C. et al. Extracellular glutathione peroxidase is secreted basolaterally by human renal proximal tubule cells // *Am. J. Physiol. Physiol.* 2002. Vol. 283, № 1. P. F20–F28.
142. Köhrle J. Selenium and the Control of Thyroid Hormone Metabolism // *Thyroid.* 2005. Vol. 15, № 8. P. 841–853.
143. Schomburg L., Köhrle J. On the importance of selenium and iodine metabolism for thyroid hormone biosynthesis and human health // *Mol. Nutr. Food Res.* 2008. Vol. 52, № 11. P. 1235–1246.
144. Maeda K. et al. Analysis of an expression profile of genes in the human adipose tissue // *Gene.* 1997. Vol. 190, № 2. P. 227–235.
145. Brigelius-Flohé R. Tissue-specific functions of individual glutathione peroxidases. // *Free Radic. Biol. Med.* 1999. Vol. 27, № 9–10. P. 951–965.
146. Olson G.E. et al. Extracellular glutathione peroxidase (Gpx3) binds specifically to basement membranes of mouse renal cortex tubule cells // *Am. J. Physiol. Physiol.* 2010. Vol. 298, № 5. P. F1244–F1253.
147. Burk R.F. et al. Glutathione peroxidase-3 produced by the kidney binds to a population of basement membranes in the gastrointestinal tract and in other tissues // *Am. J. Physiol. Liver Physiol.* 2011. Vol. 301, № 1. P. G32–G38.
148. Brigelius-Flohé R. Tissue-specific functions of individual glutathione peroxidases // *Free*

- Radic. Biol. Med. 1999. Vol. 27, № 9–10. P. 951–965.
149. Godeas C. et al. Phospholipid Hydroperoxide Glutathione Peroxidase (PHGPx) in Rat Testis Nuclei Is Bound to Chromatin // *Biochem. Mol. Med.* 1996. Vol. 59, № 2. P. 118–124.
 150. Maiorino M. et al. Functional Interaction of Phospholipid Hydroperoxide Glutathione Peroxidase with Sperm Mitochondrion-associated Cysteine-rich Protein Discloses the Adjacent Cysteine Motif as a New Substrate of the Selenoperoxidase // *J. Biol. Chem.* 2005. Vol. 280, № 46. P. 38395–38402.
 151. Mauri P. et al. Versatility of Selenium Catalysis in PHGPx Unraveled by LC/ESI-MS/MS // *Biol. Chem.* 2003. Vol. 384, № 4.
 152. Ursini F. Dual Function of the Selenoprotein PHGPx During Sperm Maturation // *Science* (80-.). 1999. Vol. 285, № 5432. P. 1393–1396.
 153. Seiler A. et al. Glutathione Peroxidase 4 Senses and Translates Oxidative Stress into 12/15-Lipoxygenase Dependent- and AIF-Mediated Cell Death // *Cell Metab.* 2008. Vol. 8, № 3. P. 237–248.
 154. Mannes A.M. et al. Cysteine mutant of mammalian GPx4 rescues cell death induced by disruption of the wild-type selenoenzyme // *FASEB J.* 2011. Vol. 25, № 7. P. 2135–2144.
 155. Yoo M.-H. et al. Delineating the Role of Glutathione Peroxidase 4 in Protecting Cells Against Lipid Hydroperoxide Damage and in Alzheimer's Disease // *Antioxid. Redox Signal.* 2010. Vol. 12, № 7. P. 819–827.
 156. Brigelius-Flohé R. et al. Phospholipid-hydroperoxide glutathione peroxidase. Genomic DNA, cDNA, and deduced amino acid sequence. // *J. Biol. Chem.* 1994. Vol. 269, № 10. P. 7342–7348.
 157. Schneider M. et al. Mitochondrial glutathione peroxidase 4 disruption causes male infertility // *FASEB J.* 2009. Vol. 23, № 9. P. 3233–3242.
 158. Conrad M. et al. The nuclear form of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase is a protein thiol peroxidase contributing to sperm chromatin stability. // *Mol. Cell. Biol. American Society for Microbiology Journals*, 2005. Vol. 25, № 17. P. 7637–7644.
 159. Puglisi R. et al. The nuclear form of glutathione peroxidase 4 is associated with sperm nuclear matrix and is required for proper paternal chromatin decondensation at fertilization // *J. Cell. Physiol.* 2012. Vol. 227, № 4. P. 1420–1427.
 160. Chabory E. et al. Epididymis seleno-independent glutathione peroxidase 5 maintains sperm DNA integrity in mice // *J. Clin. Invest.* 2009.
 161. Kryukov G. V. Characterization of Mammalian Selenoproteomes // *Science* (80-.). 2003. Vol. 300, № 5624. P. 1439–1443.

162. Nguyen V.D. et al. Two Endoplasmic Reticulum PDI Peroxidases Increase the Efficiency of the Use of Peroxide during Disulfide Bond Formation // *J. Mol. Biol.* 2011. Vol. 406, № 3. P. 503–515.
163. André M., Felley-Bosco E. Heme oxygenase-1 induction by endogenous nitric oxide: influence of intracellular glutathione // *FEBS Lett.* 2003. Vol. 546, № 2–3. P. 223–227.
164. Broniowska K.A., Diers A.R., Hogg N. S-Nitrosoglutathione // *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* 2013. Vol. 1830, № 5. P. 3173–3181.
165. Lakshmi V.M., Nauseef W.M., Zenser T. V. Myeloperoxidase Potentiates Nitric Oxide-mediated Nitrosation // *J. Biol. Chem.* 2005. Vol. 280, № 3. P. 1746–1753.
166. Foster M.W., Hess D.T., Stamler J.S. Protein S-nitrosylation in health and disease: a current perspective // *Trends Mol. Med.* 2009. Vol. 15, № 9. P. 391–404.
167. Sipes I.G., Wiersma D.A., Armstrong D.J. The Role of Glutathione in the Toxicity of Xenobiotic Compounds: Metabolic Activation of 1,2-Dibromoethane by Glutathione. 1986. P. 457–467.
168. Qian Y.-M. et al. Glutathione Stimulates Sulfated Estrogen Transport by Multidrug Resistance Protein 1 // *J. Biol. Chem.* 2001. Vol. 276, № 9. P. 6404–6411.
169. Benathan M. et al. Relationship between melanogenesis, glutathione levels and melphalan toxicity in human melanoma cells. // *Melanoma Res.* 1992. Vol. 2, № 5–6. P. 305–314.
170. Evers R. et al. Transport of glutathione prostaglandin A conjugates by the multidrug resistance protein 1 // *FEBS Lett.* 1997. Vol. 419, № 1. P. 112–116.
171. Agarwal R. et al. Glutathione S-transferase-dependent conjugation of leukotriene a4-methyl ester to leukotriene C4-methyl ester in mammalian skin // *Biochem. Pharmacol.* 1992. Vol. 44, № 10. P. 2047–2053.
172. Lau S.S. et al. Sequential oxidation and glutathione addition to 1,4-benzoquinone: correlation of toxicity with increased glutathione substitution. // *Mol. Pharmacol.* 1988. Vol. 34, № 6. P. 829–836.
173. De Palma G. et al. Polymorphism of Xenobiotic-Metabolizing Enzymes and Excretion of Styrene-Specific Mercapturic Acids // *Chem. Res. Toxicol.* 2001. Vol. 14, № 10. P. 1393–1400.
174. Dohnal V., Wu Q., Kuča K. Metabolism of aflatoxins: key enzymes and interindividual as well as interspecies differences // *Arch. Toxicol.* 2014. Vol. 88, № 9. P. 1635–1644.
175. Stevens J.F., Maier C.S. Acrolein: Sources, metabolism, and biomolecular interactions relevant to human health and disease // *Mol. Nutr. Food Res.* 2008. Vol. 52, № 1. P. 7–25.
176. Allocati N. et al. Glutathione transferases: substrates, inhibitors and pro-drugs in cancer and neurodegenerative diseases // *Oncogenesis.* 2018. Vol. 7, № 1. P. 8.

177. Townsend D.M. et al. Novel Role for Glutathione S -Transferase π // J. Biol. Chem. 2009. Vol. 284, № 1. P. 436–445.
178. Eaton P. et al. Glyceraldehyde Phosphate Dehydrogenase Oxidation During Cardiac Ischemia and Reperfusion // J. Mol. Cell. Cardiol. 2002. Vol. 34, № 11. P. 1549–1560.
179. Wang J. et al. Reversible Glutathionylation Regulates Actin Polymerization in A431 Cells // J. Biol. Chem. 2001. Vol. 276, № 51. P. 47763–47766.
180. Dalle-Donne I. et al. S-glutathionylation in protein redox regulation // Free Radic. Biol. Med. 2007. Vol. 43, № 6. P. 883–898.
181. Popov D. Protein S -glutathionylation: from current basics to targeted modifications // Arch. Physiol. Biochem. 2014. Vol. 120, № 4. P. 123–130.
182. Hutter D.E., Till B.G., Greene J.J. Redox State Changes in Density-Dependent Regulation of Proliferation // Exp. Cell Res. 1997. Vol. 232, № 2. P. 435–438.
183. Lu S.C. Regulation of hepatic glutathione synthesis: current concepts and controversies. // FASEB J. 1999. Vol. 13, № 10. P. 1169–1183.
184. The importance of glutathione in human disease. - PubMed - NCBI [Electronic resource]. URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12818476> (accessed: 18.10.2019).
185. Chen Y.-R. et al. Mitochondrial Complex II in the Post-ischemic Heart // J. Biol. Chem. 2007. Vol. 282, № 45. P. 32640–32654.
186. Ercolani L. et al. A possible S-glutathionylation of specific proteins by glyoxalase II: An in vitro and in silico study // Cell Biochem. Funct. 2016. Vol. 34, № 8. P. 620–627.
187. Ghezzi P., Di Simplicio P. Glutathionylation pathways in drug response // Curr. Opin. Pharmacol. 2007. Vol. 7, № 4. P. 398–403.
188. Grek C.L. et al. Causes and Consequences of Cysteine S -Glutathionylation // J. Biol. Chem. 2013. Vol. 288, № 37. P. 26497–26504.
189. Manevich Y. et al. Allelic variants of glutathione S-transferase P1-1 differentially mediate the peroxidase function of peroxiredoxin VI and alter membrane lipid peroxidation // Free Radic. Biol. Med. 2013. Vol. 54. P. 62–70.
190. Lillig C.H., Berndt C., Holmgren A. Glutaredoxin systems // Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj. 2008. Vol. 1780, № 11. P. 1304–1317.
191. Newton G.L., Dorian R., Fahey R.C. Analysis of biological thiols: Derivatization with monobromobimane and separation by reverse-phase high-performance liquid chromatography // Anal. Biochem. 1981. Vol. 114, № 2. P. 383–387.
192. Toyo'oka T. et al. Determination of thiols and disulfides in normal rat tissues and hamster pancreas treated with N-nitrosobis(2-oxopropyl)amine using 4-(aminosulfonyl)-7-fluoro-2, 1,3-benzoxadiazole and ammonium 7-fluoro-2, 1,3-benzoxadiazole-4-sulfonate // Biomed.

- Chromatogr. 1989. Vol. 3, № 4. P. 166–172.
193. Baty J.W., Hampton M.B., Winterbourn C.C. Detection of oxidant sensitive thiol proteins by fluorescence labeling and two-dimensional electrophoresis // *Proteomics*. 2002. Vol. 2, № 9. P. 1261–1266.
 194. Kaniowska E. et al. Urinary excretion measurement of cysteine and homocysteine in the form of their S-pyridinium derivatives by high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection // *J. Chromatogr. A*. 1998. Vol. 798, № 1–2. P. 27–35.
 195. Bald E., Głowacki R. Analysis of saliva for glutathione and metabolically related thiols by liquid chromatography with ultraviolet detection // *Amino Acids*. 2005. Vol. 28, № 4. P. 431–433.
 196. Hoff S. et al. Quantification of protein thiols using ThioGlo 1 fluorescent derivatives and HPLC separation // *Analyst*. 2013. Vol. 138, № 7. P. 2096.
 197. Chen J. et al. Determination of WR-1065 in human blood by high-performance liquid chromatography following fluorescent derivatization by a maleimide reagent ThioGloTM3 // *J. Chromatogr. B*. 2005. Vol. 819, № 1. P. 161–167.
 198. Dunn L.L. et al. A Critical Role for Thioredoxin-Interacting Protein in Diabetes-Related Impairment of Angiogenesis // *Diabetes*. 2014. Vol. 63, № 2. P. 675–687.
 199. Riener C.K., Kada G., Gruber H.J. Quick measurement of protein sulfhydryls with Ellman's reagent and with 4,4'-dithiodipyridine // *Anal. Bioanal. Chem.* 2002. Vol. 373, № 4–5. P. 266–276.
 200. Long L. et al. Construction of a FRET-based ratiometric fluorescent thiol probe // *Chem. Commun.* 2011. Vol. 47, № 3. P. 893–895.
 201. Chen X. et al. A thiol-specific fluorescent probe and its application for bioimaging // *Chem. Commun.* 2010. Vol. 46, № 16. P. 2751.
 202. Zhou X. et al. Ratiometric fluorescent probe for enantioselective detection of D-cysteine in aqueous solution // *Beilstein J. Org. Chem.* 2011. Vol. 7. P. 1508–1515.
 203. Sreejith S., Divya K.P., Ajayaghosh A. A Near-Infrared Squaraine Dye as a Latent Ratiometric Fluorophore for the Detection of Amino-thiol Content in Blood Plasma // *Angew. Chemie Int. Ed.* 2008. Vol. 47, № 41. P. 7883–7887.
 204. Niu L.-Y. et al. BODIPY-Based Ratiometric Fluorescent Sensor for Highly Selective Detection of Glutathione over Cysteine and Homocysteine // *J. Am. Chem. Soc.* 2012. Vol. 134, № 46. P. 18928–18931.
 205. Kim H.M., Cho B.R. Mitochondrial-Targeted Two-Photon Fluorescent Probes for Zinc Ions, H₂O₂, and Thiols in Living Tissues // *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2013. Vol. 2013. P. 1–11.

206. Lee J.-S. et al. Diversity-oriented fluorescence library approach for the discovery of sensors and probes // *Mol. Biosyst.* 2009. Vol. 5, № 5. P. 411.
207. Zhai D. et al. A ratiometric fluorescent dye for the detection of glutathione in live cells and liver cancer tissue // *Chem. Commun.* 2013. Vol. 49, № 65. P. 7207.
208. Jiang X. et al. Quantitative Imaging of Glutathione in Live Cells Using a Reversible Reaction-Based Ratiometric Fluorescent Probe // *ACS Chem. Biol.* 2015. Vol. 10, № 3. P. 864–874.
209. Jiang X. et al. Quantitative real-time imaging of glutathione // *Nat. Commun. Nature Publishing Group*, 2017. Vol. 8, № 1. P. 16087.
210. Jiang X. et al. Quantitative Real-Time Imaging of Glutathione with Subcellular Resolution // *Antioxid. Redox Signal.* 2019. Vol. 30, № 16. P. 1900–1910.
211. SHIMOMURA O., JOHNSON F.H., SAIGA Y. Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusan, *Aequorea*. // *J. Cell. Comp. Physiol.* 1962. Vol. 59. P. 223–239.
212. Prasher D.C. et al. Primary structure of the *Aequorea victoria* green-fluorescent protein. // *Gene.* 1992. Vol. 111, № 2. P. 229–233.
213. Chalfie M. et al. Green fluorescent protein as a marker for gene expression // *Science* (80-). 1994. Vol. 263, № 5148. P. 802–805.
214. Kremers G.-J. et al. Fluorescent proteins at a glance. // *J. Cell Sci. Company of Biologists*, 2011. Vol. 124, № Pt 2. P. 157–160.
215. Heim R., Prasher D.C., Tsien R.Y. Wavelength mutations and posttranslational autoxidation of green fluorescent protein. // *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1994. Vol. 91, № 26. P. 12501–12504.
216. Rizzo M.A. et al. An improved cyan fluorescent protein variant useful for FRET // *Nat. Biotechnol.* 2004. Vol. 22, № 4. P. 445–449.
217. Goedhart J. et al. Bright cyan fluorescent protein variants identified by fluorescence lifetime screening // *Nat. Methods.* 2010. Vol. 7, № 2. P. 137–139.
218. Heim R., Tsien R.Y. Engineering green fluorescent protein for improved brightness, longer wavelengths and fluorescence resonance energy transfer // *Curr. Biol.* 1996. Vol. 6, № 2. P. 178–182.
219. Kremers G.-J. et al. Improved Green and Blue Fluorescent Proteins for Expression in Bacteria and Mammalian Cells ^{†, ‡} // *Biochemistry.* 2007. Vol. 46, № 12. P. 3775–3783.
220. Ai H. et al. Exploration of New Chromophore Structures Leads to the Identification of Improved Blue Fluorescent Proteins [†] // *Biochemistry.* 2007. Vol. 46, № 20. P. 5904–5910.

221. Mena M.A. et al. Blue fluorescent proteins with enhanced brightness and photostability from a structurally targeted library // *Nat. Biotechnol.* 2006. Vol. 24, № 12. P. 1569–1571.
222. Tomosugi W. et al. An ultramarine fluorescent protein with increased photostability and pH insensitivity // *Nat. Methods.* 2009. Vol. 6, № 5. P. 351–353.
223. Chudakov D.M. et al. *Fluorescent Proteins and Their Applications in Imaging Living Cells and Tissues* // *Physiol. Rev.* 2010. Vol. 90, № 3. P. 1103–1163.
224. and B.G.R., Flynn* G.C. *Chromophore Formation in Green Fluorescent Protein.* American Chemical Society, 1997.
225. Ward W.W., Bokman S.H. Reversible denaturation of *Aequorea* green-fluorescent protein: physical separation and characterization of the renatured protein // *Biochemistry.* American Chemical Society, 1982. Vol. 21, № 19. P. 4535–4540.
226. Chudakov D.M. et al. Photoswitchable cyan fluorescent protein for protein tracking // *Nat. Biotechnol.* 2004. Vol. 22, № 11. P. 1435–1439.
227. Brejc K. et al. Structural basis for dual excitation and photoisomerization of the *Aequorea victoria* green fluorescent protein // *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1997. Vol. 94, № 6. P. 2306–2311.
228. Chattoraj M. et al. Ultra-fast excited state dynamics in green fluorescent protein: multiple states and proton transfer. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. National Academy of Sciences,* 1996. Vol. 93, № 16. P. 8362–8367.
229. Bokman S.H., Ward W.W. Renaturation of *Aequorea* gree-fluorescent protein. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1981. Vol. 101, № 4. P. 1372–1380.
230. Tsien R.Y. THE GREEN FLUORESCENT PROTEIN // *Annu. Rev. Biochem.* 1998. Vol. 67, № 1. P. 509–544.
231. Verkhusha V. V. et al. High Stability of *Discosoma* DsRed As Compared to *Aequorea* EGFP[†] // *Biochemistry.* 2003. Vol. 42, № 26. P. 7879–7884.
232. Sniegowski J.A. et al. Base Catalysis of Chromophore Formation in Arg⁹⁶ and Glu²²² Variants of Green Fluorescent Protein // *J. Biol. Chem.* 2005. Vol. 280, № 28. P. 26248–26255.
233. Sniegowski J.A., Phail M.E., Wachter R.M. Maturation efficiency, trypsin sensitivity, and optical properties of Arg96, Glu222, and Gly67 variants of green fluorescent protein // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2005. Vol. 332, № 3. P. 657–663.
234. Orm M. et al. Crystal Structure of the *Aequorea victoria* Green Fluorescent Protein // *Science* (80-.). 1996. Vol. 273, № 5280. P. 1392–1395.
235. Petersen J. et al. The 2.0-Å Crystal Structure of eqFP611, a Far Red Fluorescent Protein from the Sea Anemone *Entacmaea quadricolor* // *J. Biol. Chem.* 2003. Vol. 278, № 45. P.

- 44626–44631.
236. Wachter R.M. et al. Structural basis of spectral shifts in the yellow-emission variants of green fluorescent protein. // *Structure*. 1998. Vol. 6, № 10. P. 1267–1277.
 237. Patterson G.H., Lippincott-Schwartz J. A Photoactivatable GFP for Selective Photolabeling of Proteins and Cells // *Science* (80-.). 2002. Vol. 297, № 5588. P. 1873–1877.
 238. Baird G.S., Zacharias D.A., Tsien R.Y. Biochemistry, mutagenesis, and oligomerization of DsRed, a red fluorescent protein from coral // *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2000. Vol. 97, № 22. P. 11984–11989.
 239. Cotlet M. et al. Identification of different emitting species in the red fluorescent protein DsRed by means of ensemble and single-molecule spectroscopy. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. National Academy of Sciences*, 2001. Vol. 98, № 25. P. 14398–14403.
 240. Gross L.A. et al. The structure of the chromophore within DsRed, a red fluorescent protein from coral // *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2000. Vol. 97, № 22. P. 11990–11995.
 241. Yarbrough D. et al. Refined crystal structure of DsRed, a red fluorescent protein from coral, at 2.0-Å resolution // *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2001. Vol. 98, № 2. P. 462–467.
 242. Campbell R.E. et al. A monomeric red fluorescent protein // *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2002. Vol. 99, № 12. P. 7877–7882.
 243. Shaner N.C. et al. Improved monomeric red, orange and yellow fluorescent proteins derived from *Discosoma* sp. red fluorescent protein // *Nat. Biotechnol.* 2004. Vol. 22, № 12. P. 1567–1572.
 244. Shaner N.C. et al. Improving the photostability of bright monomeric orange and red fluorescent proteins // *Nat. Methods*. Nature Publishing Group, 2008. Vol. 5, № 6. P. 545–551.
 245. Subach F. V et al. Photoactivatable mCherry for high-resolution two-color fluorescence microscopy // *Nat. Methods*. 2009. Vol. 6, № 2. P. 153–159.
 246. Stiel A.C. et al. Generation of Monomeric Reversibly Switchable Red Fluorescent Proteins for Far-Field Fluorescence Nanoscopy // *Biophys. J. Cell Press*, 2008. Vol. 95, № 6. P. 2989–2997.
 247. Subach F. V. et al. Red Fluorescent Protein with Reversibly Photoswitchable Absorbance for Photochromic FRET // *Chem. Biol.* 2010. Vol. 17, № 7. P. 745–755.
 248. Subach O.M. et al. A photoswitchable orange-to-far-red fluorescent protein, PSmOrange // *Nat. Methods*. 2011. Vol. 8, № 9. P. 771–777.
 249. Merzlyak E.M. et al. Bright monomeric red fluorescent protein with an extended fluorescence lifetime // *Nat. Methods*. Nature Publishing Group, 2007. Vol. 4, № 7. P.

- 555–557.
250. Kredel S. et al. mRuby, a Bright Monomeric Red Fluorescent Protein for Labeling of Subcellular Structures // *PLoS One* / ed. Gladfelter A.S. Public Library of Science, 2009. Vol. 4, № 2. P. e4391.
 251. Lam A.J. et al. Improving FRET dynamic range with bright green and red fluorescent proteins // *Nat. Methods*. 2012. Vol. 9, № 10. P. 1005–1012.
 252. Bindels D.S. et al. mScarlet: a bright monomeric red fluorescent protein for cellular imaging // *Nat. Methods*. Nature Publishing Group, 2017. Vol. 14, № 1. P. 53–56.
 253. Shemiakina I.I. et al. A monomeric red fluorescent protein with low cytotoxicity // *Nat. Commun*. 2012. Vol. 3, № 1. P. 1204.
 254. Shaner N.C. et al. Improved monomeric red, orange and yellow fluorescent proteins derived from *Discosoma* sp. red fluorescent protein // *Nat. Biotechnol*. 2004. Vol. 22, № 12. P. 1567–1572.
 255. Merzlyak E.M. et al. Bright monomeric red fluorescent protein with an extended fluorescence lifetime // *Nat. Methods*. 2007. Vol. 4, № 7. P. 555–557.
 256. Wiedenmann J. et al. A far-red fluorescent protein with fast maturation and reduced oligomerization tendency from *Entacmaea quadricolor* (Anthozoa, Actinaria) // *Proc. Natl. Acad. Sci*. 2002. Vol. 99, № 18. P. 11646–11651.
 257. Shemiakina I.I. et al. A monomeric red fluorescent protein with low cytotoxicity // *Nat. Commun*. 2012. Vol. 3, № 1. P. 1204.
 258. Kredel S. et al. mRuby, a Bright Monomeric Red Fluorescent Protein for Labeling of Subcellular Structures // *PLoS One* / ed. Gladfelter A.S. 2009. Vol. 4, № 2. P. e4391.
 259. Shcherbo D. et al. Bright far-red fluorescent protein for whole-body imaging // *Nat. Methods*. 2007. Vol. 4, № 9. P. 741–746.
 260. Shcherbo D. et al. Far-red fluorescent tags for protein imaging in living tissues. // *Biochem. J. NIH Public Access*, 2009. Vol. 418, № 3. P. 567–574.
 261. Wang L. et al. Evolution of new nonantibody proteins via iterative somatic hypermutation // *Proc. Natl. Acad. Sci*. 2004. Vol. 101, № 48. P. 16745–16749.
 262. Lin M.Z. et al. Autofluorescent Proteins with Excitation in the Optical Window for Intravital Imaging in Mammals // *Chem. Biol*. 2009. Vol. 16, № 11. P. 1169–1179.
 263. Morozova K.S. et al. Far-Red Fluorescent Protein Excitable with Red Lasers for Flow Cytometry and Superresolution STED Nanoscopy // *Biophys. J*. 2010. Vol. 99, № 2. P. L13–L15.
 264. Piatkevich K.D. et al. Extended Stokes Shift in Fluorescent Proteins: Chromophore–Protein Interactions in a Near-Infrared TagRFP675 Variant // *Sci. Rep*. 2013. Vol. 3, № 1.

- P. 1847.
265. Chu J. et al. Non-invasive intravital imaging of cellular differentiation with a bright red-excitable fluorescent protein // *Nat. Methods*. 2014. Vol. 11, № 5. P. 572–578.
 266. Wang L. et al. Evolution of new nonantibody proteins via iterative somatic hypermutation // *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2004. Vol. 101, № 48. P. 16745–16749.
 267. Lin M.Z. et al. Autofluorescent Proteins with Excitation in the Optical Window for Intravital Imaging in Mammals // *Chem. Biol.* 2009. Vol. 16, № 11. P. 1169–1179.
 268. Shcherbo D. et al. Bright far-red fluorescent protein for whole-body imaging // *Nat. Methods*. 2007. Vol. 4, № 9. P. 741–746.
 269. Shcherbo D. et al. Far-red fluorescent tags for protein imaging in living tissues // *Biochem. J.* 2009. Vol. 418, № 3. P. 567–574.
 270. Morozova K.S. et al. Far-Red Fluorescent Protein Excitable with Red Lasers for Flow Cytometry and Superresolution STED Nanoscopy // *Biophys. J.* 2010. Vol. 99, № 2. P. L13–L15.
 271. Piatkevich K.D. et al. Extended Stokes Shift in Fluorescent Proteins: Chromophore–Protein Interactions in a Near-Infrared TagRFP675 Variant // *Sci. Rep.* 2013. Vol. 3, № 1. P. 1847.
 272. Chu J. et al. Non-invasive intravital imaging of cellular differentiation with a bright red-excitable fluorescent protein // *Nat. Methods*. 2014. Vol. 11, № 5. P. 572–578.
 273. Yang J. et al. mBeRFP, an Improved Large Stokes Shift Red Fluorescent Protein // *PLoS One* / ed. Jones D.D. Public Library of Science, 2013. Vol. 8, № 6. P. e64849.
 274. Piatkevich K.D. et al. Monomeric red fluorescent proteins with a large Stokes shift // *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2010. Vol. 107, № 12. P. 5369–5374.
 275. Shcherbakova D.M. et al. An Orange Fluorescent Protein with a Large Stokes Shift for Single-Excitation Multicolor FCCS and FRET Imaging // *J. Am. Chem. Soc.* 2012. Vol. 134, № 18. P. 7913–7923.
 276. Kogure T. et al. A fluorescent variant of a protein from the stony coral *Montipora* facilitates dual-color single-laser fluorescence cross-correlation spectroscopy // *Nat. Biotechnol.* 2006. Vol. 24, № 5. P. 577–581.
 277. Chatteraj M. et al. Ultra-fast excited state dynamics in green fluorescent protein: multiple states and proton transfer. // *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1996. Vol. 93, № 16. P. 8362–8367.
 278. Piatkevich K.D. et al. Monomeric red fluorescent proteins with a large Stokes shift // *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2010. Vol. 107, № 12. P. 5369–5374.
 279. Jayaraman S. et al. Mechanism and Cellular Applications of a Green Fluorescent Protein-based Halide Sensor // *J. Biol. Chem.* 2000. Vol. 275, № 9. P. 6047–6050.

280. Xu X. Detection of programmed cell death using fluorescence energy transfer // *Nucleic Acids Res.* 1998. Vol. 26, № 8. P. 2034–2035.
281. Bozza W.P. et al. The Use of a Stably Expressed FRET Biosensor for Determining the Potency of Cancer Drugs // *PLoS One* / ed. Xu W. 2014. Vol. 9, № 9. P. e107010.
282. Li M. et al. A high-throughput FRET-based assay for determination of Atg4 activity // *Autophagy.* 2012. Vol. 8, № 3. P. 401–412.
283. EICHORST J.P., CLEGG R.M., WANG Y. Red-shifted fluorescent proteins monitor enzymatic activity in live HT-1080 cells with fluorescence lifetime imaging microscopy (FLIM) // *J. Microsc.* 2012. Vol. 248, № 1. P. 77–89.
284. Miura H., Matsuda M., Aoki K. Development of a FRET Biosensor with High Specificity for Akt // *Cell Struct. Funct.* 2014. Vol. 39, № 1. P. 9–20.
285. Seong J. et al. Distinct biophysical mechanisms of focal adhesion kinase mechanoactivation by different extracellular matrix proteins // *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2013. Vol. 110, № 48. P. 19372–19377.
286. Vevea J.D. et al. Ratiometric Biosensors that Measure Mitochondrial Redox State and ATP in Living Yeast Cells // *J. Vis. Exp.* 2013. № 77.
287. Fehr M. et al. ***In Vivo* Imaging of the Dynamics of Glucose Uptake in the Cytosol of COS-7 Cells by Fluorescent Nanosensors** // *J. Biol. Chem.* 2003. Vol. 278, № 21. P. 19127–19133.
288. San Martín A. et al. A Genetically Encoded FRET Lactate Sensor and Its Use To Detect the Warburg Effect in Single Cancer Cells // *PLoS One* / ed. Jekabsons M. 2013. Vol. 8, № 2. P. e57712.
289. Grashoff C. et al. Measuring mechanical tension across vinculin reveals regulation of focal adhesion dynamics // *Nature.* 2010. Vol. 466, № 7303. P. 263–266.
290. Conway D.E. et al. Fluid Shear Stress on Endothelial Cells Modulates Mechanical Tension across VE-Cadherin and PECAM-1 // *Curr. Biol.* 2013. Vol. 23, № 11. P. 1024–1030.
291. Urra J. et al. A genetically encoded ratiometric sensor to measure extracellular pH in microdomains bounded by basolateral membranes of epithelial cells // *Pflügers Arch. - Eur. J. Physiol.* 2008. Vol. 457, № 1. P. 233–242.
292. Potzkei J. et al. Real-time determination of intracellular oxygen in bacteria using a genetically encoded FRET-based biosensor // *BMC Biol.* 2012. Vol. 10, № 1. P. 28.
293. Bernardini A. et al. Type I cell ROS kinetics under hypoxia in the intact mouse carotid body ex vivo: a FRET-based study // *Am. J. Physiol. Physiol.* 2015. Vol. 308, № 1. P. C61–C67.

294. Hochreiter B., Pardo-Garcia A., Schmid J. Fluorescent Proteins as Genetically Encoded FRET Biosensors in Life Sciences // *Sensors*. 2015. Vol. 15, № 10. P. 26281–26314.
295. Luger K. et al. Correct folding of circularly permuted variants of a beta alpha barrel enzyme in vivo // *Science* (80-.). 1989. Vol. 243, № 4888. P. 206–210.
296. Shen Y., Lai T., Campbell R.E. Red fluorescent proteins (RFPs) and RFP-based biosensors for neuronal imaging applications // *Neurophotonics*. 2015. Vol. 2, № 3. P. 031203.
297. Belousov V. V et al. Genetically encoded fluorescent indicator for intracellular hydrogen peroxide // *Nat. Methods*. 2006. Vol. 3, № 4. P. 281–286.
298. Markvicheva K.N. et al. A genetically encoded sensor for H₂O₂ with expanded dynamic range // *Bioorg. Med. Chem.* 2011. Vol. 19, № 3. P. 1079–1084.
299. Bilan D.S. et al. HyPer-3: A Genetically Encoded H₂O₂ Probe with Improved Performance for Ratiometric and Fluorescence Lifetime Imaging // *ACS Chem. Biol.* 2013. Vol. 8, № 3. P. 535–542.
300. Ermakova Y.G. et al. Red fluorescent genetically encoded indicator for intracellular hydrogen peroxide // *Nat. Commun.* 2014. Vol. 5, № 1. P. 5222.
301. Yang Y. et al. Improved calcium sensor GCaMP-X overcomes the calcium channel perturbations induced by the calmodulin in GCaMP // *Nat. Commun.* 2018. Vol. 9, № 1. P. 1504.
302. Zhao Y. et al. An Expanded Palette of Genetically Encoded Ca²⁺ Indicators // *Science* (80-.). 2011. Vol. 333, № 6051. P. 1888–1891.
303. Hung Y.P., Yellen G. Live-Cell Imaging of Cytosolic NADH–NAD⁺ Redox State Using a Genetically Encoded Fluorescent Biosensor. 2014. P. 83–95.
304. Bilan D.S. et al. Genetically encoded fluorescent indicator for imaging NAD⁺/NADH ratio changes in different cellular compartments // *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* 2014. Vol. 1840, № 3. P. 951–957.
305. Zhao Y. et al. SoNar, a Highly Responsive NAD⁺/NADH Sensor, Allows High-Throughput Metabolic Screening of Anti-tumor Agents // *Cell Metab.* 2015. Vol. 21, № 5. P. 777–789.
306. Ostergaard H. et al. Shedding light on disulfide bond formation: engineering a redox switch in green fluorescent protein // *EMBO J.* 2001. Vol. 20, № 21. P. 5853–5862.
307. Kuner T., Augustine G.J. A genetically encoded ratiometric indicator for chloride: capturing chloride transients in cultured hippocampal neurons. // *Neuron*. 2000. Vol. 27, № 3. P. 447–459.
308. Hanson G.T. et al. Investigating Mitochondrial Redox Potential with Redox-sensitive

- Green Fluorescent Protein Indicators // *J. Biol. Chem.* 2004. Vol. 279, № 13. P. 13044–13053.
309. Meyer A.J., Dick T.P. Fluorescent Protein-Based Redox Probes // *Antioxid. Redox Signal.* 2010. Vol. 13, № 5. P. 621–650.
310. Dooley C.T. et al. Imaging Dynamic Redox Changes in Mammalian Cells with Green Fluorescent Protein Indicators // *J. Biol. Chem.* 2004. Vol. 279, № 21. P. 22284–22293.
311. Østergaard H., Tachibana C., Winther J.R. Monitoring disulfide bond formation in the eukaryotic cytosol // *J. Cell Biol.* 2004. Vol. 166, № 3. P. 337–345.
312. Meyer A.J. et al. Redox-sensitive GFP in *Arabidopsis thaliana* is a quantitative biosensor for the redox potential of the cellular glutathione redox buffer // *Plant J.* 2007. Vol. 52, № 5. P. 973–986.
313. Gutscher M. et al. Real-time imaging of the intracellular glutathione redox potential // *Nat. Methods.* 2008. Vol. 5, № 6. P. 553–559.
314. SCHWARZLÄNDER M. et al. Confocal imaging of glutathione redox potential in living plant cells // *J. Microsc.* 2008. Vol. 231, № 2. P. 299–316.
315. Peltoniemi M.J. et al. Insights into Deglutathionylation Reactions // *J. Biol. Chem.* 2006. Vol. 281, № 44. P. 33107–33114.
316. Gutscher M. et al. Real-time imaging of the intracellular glutathione redox potential // *Nat. Methods.* 2008. Vol. 5, № 6. P. 553–559.
317. Trautsch I. et al. Optogenetic Monitoring of the Glutathione Redox State in Engineered Human Myocardium // *Front. Physiol.* 2019. Vol. 10.
318. Breckwoldt M.O. et al. Multiparametric optical analysis of mitochondrial redox signals during neuronal physiology and pathology in vivo // *Nat. Med.* 2014. Vol. 20, № 5. P. 555–560.
319. Albrecht S.C. et al. In Vivo Mapping of Hydrogen Peroxide and Oxidized Glutathione Reveals Chemical and Regional Specificity of Redox Homeostasis // *Cell Metab.* 2011. Vol. 14, № 6. P. 819–829.
320. Rebrin I., Sohal R.S. Comparison of thiol redox state of mitochondria and homogenates of various tissues between two strains of mice with different longevities // *Exp. Gerontol.* 2004. Vol. 39, № 10. P. 1513–1519.
321. Kemp M., Go Y.-M., Jones D.P. Nonequilibrium thermodynamics of thiol/disulfide redox systems: A perspective on redox systems biology // *Free Radic. Biol. Med.* 2008. Vol. 44, № 6. P. 921–937.
322. Hwang C., Sinsky A., Lodish H. Oxidized redox state of glutathione in the endoplasmic reticulum // *Science (80-.).* 1992. Vol. 257, № 5076. P. 1496–1502.

323. Go Y.-M., Jones D.P. Redox compartmentalization in eukaryotic cells // *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* 2008. Vol. 1780, № 11. P. 1273–1290.
324. Lohman J.R., Remington S.J. Development of a Family of Redox-Sensitive Green Fluorescent Protein Indicators for Use in Relatively Oxidizing Subcellular Environments[†] ‡ // *Biochemistry.* 2008. Vol. 47, № 33. P. 8678–8688.
325. Ermakova Y.G. et al. Red fluorescent genetically encoded indicator for intracellular hydrogen peroxide // *Nat. Commun.* 2014. Vol. 5, № 1. P. 5222.
326. Shen Y. et al. A genetically encoded Ca²⁺ indicator based on circularly permuted sea anemone red fluorescent protein eqFP578. // *BMC Biol. BioMed Central*, 2018. Vol. 16, № 1. P. 9.
327. Fan Y., Chen Z., Ai H. Monitoring Redox Dynamics in Living Cells with a Redox-Sensitive Red Fluorescent Protein // *Anal. Chem.* 2015. Vol. 87, № 5. P. 2802–2810.
328. Fan Y. et al. Monitoring thioredoxin redox with a genetically encoded red fluorescent biosensor // *Nat. Chem. Biol.* 2017. Vol. 13, № 9. P. 1045–1052.
329. Hanson G.T. et al. Investigating Mitochondrial Redox Potential with Redox-sensitive Green Fluorescent Protein Indicators // *J. Biol. Chem.* 2004. Vol. 279, № 13. P. 13044–13053.
330. Björnberg O., Østergaard H., Winther J.R. Mechanistic Insight Provided by Glutaredoxin within a Fusion to Redox-Sensitive Yellow Fluorescent Protein // *Biochemistry.* 2006. Vol. 45, № 7. P. 2362–2371.
331. Sugiura K. et al. Redox sensor proteins for highly sensitive direct imaging of intracellular redox state // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2015. Vol. 457, № 3. P. 242–248.
332. Hall C.N., Garthwaite J. What is the real physiological NO concentration in vivo? // *Nitric Oxide.* 2009. Vol. 21, № 2. P. 92–103.
333. Ostergaard H. et al. Shedding light on disulfide bond formation: engineering a redox switch in green fluorescent protein. // *EMBO J.* 2001. Vol. 20, № 21. P. 5853–5862.
334. Rizzuto R. et al. Chimeric green fluorescent protein as a tool for visualizing subcellular organelles in living cells. // *Curr. Biol.* 1995. Vol. 5, № 6. P. 635–642.
335. Mrowietz U. et al. Efficacy and safety of LAS41008 (dimethyl fumarate) in adults with moderate-to-severe chronic plaque psoriasis: a randomized, double-blind, Fumaderm[®] - and placebo-controlled trial (BRIDGE) // *Br. J. Dermatol.* 2017. Vol. 176, № 3. P. 615–623.
336. Kappos L. et al. Efficacy and safety of oral fumarate in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis: a multicentre, randomised, double-blind, placebo-controlled phase IIb study // *Lancet.* 2008. Vol. 372, № 9648. P. 1463–1472.

337. Dethlefsen L.A. et al. Toxic Effects of Acute Glutathione Depletion by Buthionine Sulfoximine and Dimethylfumarate on Murine Mammary Carcinoma Cells // *Radiat. Res.* Academic Press, Inc. , 1988. Vol. 114, № 2. P. 215.
338. Schmidt M.M., Dringen R. Fumaric acid diesters deprive cultured primary astrocytes rapidly of glutathione // *Neurochem. Int.* Pergamon, 2010. Vol. 57, № 4. P. 460–467.
339. Linker R.A. et al. Fumaric acid esters exert neuroprotective effects in neuroinflammation via activation of the Nrf2 antioxidant pathway // *Brain*. 2011. Vol. 134, № 3. P. 678–692.
340. Hoffmann C. et al. Dimethyl Fumarate Induces Glutathione Recycling by Upregulation of Glutathione Reductase // *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2017. Vol. 2017. P. 1–8.
341. Granger D.N., Kvietys P.R. Reperfusion injury and reactive oxygen species: The evolution of a concept // *Redox Biol.* Elsevier, 2015. Vol. 6. P. 524–551.
342. Liberti M. V., Locasale J.W. The Warburg Effect: How Does it Benefit Cancer Cells? // *Trends Biochem. Sci.* 2016. Vol. 41, № 3. P. 211–218.
343. Wallace D.C. Mitochondria and cancer // *Nat. Rev. Cancer.* 2012. Vol. 12, № 10. P. 685–698.
344. Whitehouse S., Randle P.J. Activation of pyruvate dehydrogenase in perfused rat heart by dichloroacetate (Short Communication). // *Biochem. J.* Portland Press Ltd, 1973. Vol. 134, № 2. P. 651–653.
345. Bonnet S. et al. A Mitochondria-K⁺ Channel Axis Is Suppressed in Cancer and Its Normalization Promotes Apoptosis and Inhibits Cancer Growth // *Cancer Cell*. 2007. Vol. 11, № 1. P. 37–51.
346. Ermakova Y.G. et al. SypHer3s: a genetically encoded fluorescent ratiometric probe with enhanced brightness and an improved dynamic range. // *Chem. Commun. (Camb)*. 2018. Vol. 54, № 23. P. 2898–2901.
347. Kaludercic N., Deshwal S., Di Lisa F. Reactive oxygen species and redox compartmentalization // *Front. Physiol.* 2014. Vol. 5.
348. Pollegioni L. et al. Yeast D-amino acid oxidase: structural basis of its catalytic properties. // *J. Mol. Biol.* 2002. Vol. 324, № 3. P. 535–546.
349. Karlenius T.C., Tonissen K.F. Thioredoxin and Cancer: A Role for Thioredoxin in all States of Tumor Oxygenation. // *Cancers (Basel)*. Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI), 2010. Vol. 2, № 2. P. 209–232.
350. Zhang J. et al. Targeting the Thioredoxin System for Cancer Therapy // *Trends Pharmacol. Sci.* 2017. Vol. 38, № 9. P. 794–808.
351. Rackham O. et al. Substrate and inhibitor specificities differ between human cytosolic and mitochondrial thioredoxin reductases: Implications for development of specific inhibitors

