

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

Костюк Александр Игоревич

Исследование гипогалогенного стресса с помощью генетически кодируемых биосенсоров

1.5.3. – Молекулярная биология

*Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук*

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

Москва, 2022

## Оглавление.

Список сокращений.....	4
Введение.....	8
<b>1. Обзор литературы.....</b>	<b>15</b>
<b>1.1. (Псевдо)гипогалогенные кислоты и их производные.....</b>	<b>15</b>
1.1.1. <i>Продукция (псевдо)гипогалогенных кислот в живых организмах и их основные химические свойства.....</i>	15
1.1.2. <i>Молекулярные механизмы воздействия (псевдо)гипогалогенных кислот на клетки.....</i>	29
1.1.3. <i>Методы регистрации (псевдо)гипогалогенных кислот в системах различного уровня сложности.....</i>	39
<b>1.2. Флуоресцентные белки как репортерные модули генетически-кодируемых сенсоров.....</b>	<b>52</b>
1.2.1. <i>Структура и созревание флуоресцентных белков.....</i>	52
1.2.2. <i>Оптические свойства флуоресцентных белков.....</i>	59
1.2.3. <i>Разнообразие цветных вариантов флуоресцентных белков.....</i>	65
<b>1.3. Структурные классы генетически кодируемых сенсоров на основе флуоресцентных белков.....</b>	<b>73</b>
1.3.1. <i>Общая справка.....</i>	73
1.3.2. <i>Сенсоры, основанные на естественной чувствительности флуоресцентных белков.....</i>	74
1.3.3. <i>Сенсоры, основанные на модификации поверхности флуоресцентных белков.....</i>	79
1.3.4. <i>Сенсоры, основанные на активности промоторов.....</i>	85
1.3.5. <i>FRET-сенсоры.....</i>	91
1.3.6. <i>Сенсоры, основанные на Proximity Imaging (PRIM).....</i>	100
1.3.7. <i>Сенсоры с Camgargo-топологией.....</i>	102
1.3.8. <i>Сенсоры на основе круговых пермутантов флуоресцентных белков.....</i>	104
<b>1.4. Исследования гипогалогенного стресса при помощи генетически кодируемых биосенсоров.....</b>	<b>110</b>
<b>2. Материалы и методы.....</b>	<b>114</b>
2.1. <b>Создание генно-инженерных конструкций.....</b>	<b>114</b>
2.2. <b>Проверка работоспособности вариантов NemR-сpYFP в клетках <i>E. coli</i>.....</b>	<b>116</b>
2.3. <b>Экспрессия и очистка NemR<sup>C106</sup>, вариантов NemR-сpYFP, EYFP, интактного сpYFP, HyPer2 и SupHer3s.....</b>	<b>117</b>
2.4. <b>Синтез N-хлоротаурина, NaOBr, HOscN и NaONOO.....</b>	<b>119</b>
2.5. <b>Измерение оптических параметров очищенных препаратов NemR-сpYFP.....</b>	<b>121</b>
2.6. <b>Регистрация эффектов окислителей на оптические свойства белков, а также оценка обратимости наблюдаемых ответов.....</b>	<b>122</b>
2.7. <b>Титрование очищенных препаратов HyProcates (псевдо)гипогалогенными кислотами и их производными.....</b>	<b>123</b>

2.8. Предстаационарная кинетика. ....	123
2.9. Построение профилей селективности.....	124
2.10. Определение $pK_a$ восстановленных и окисленных вариантов <b>NemR-cpYFP</b> .....	125
2.11. Расшифровка пространственной структуры <b>HypocratesCS</b> при помощи метода рентгеноструктурного анализа.....	125
2.12. Определение олигомерного состояния <b>Hypocrates</b> при помощи гель-фильтрации. ..	127
2.13. Измерение активности миелопероксидазы <i>in vitro</i> при помощи <b>Hypocrates</b> .....	127
2.14. Визуализация экзогенной добавки <b>NaOCl</b> в клетках линии <b>HeLa Kyoto</b> при помощи <b>Hypocrates</b> , <b>HypocratesCS</b> и <b>SypHer3s</b> . ....	128
2.15. Получение первичной культуры полиморфноядерных лейкоцитов человека. ....	129
2.16. Визуализация (псевдо)гипогалогенного стресса в живых бактериях, фагоцитируемых первичными нейтрофилами человека. ....	130
2.17. Визуализация (псевдо)гипогалогенного стресса в модели ампутации хвостового плавника <i>Danio rerio</i> . ....	131
3. Результаты и обсуждение.....	132
3.1. Выбор платформы для разработки генетически кодируемого сенсора (псевдо)гипогалогенных кислот и их производных.....	132
3.2. Получение и тестирование первичных версий сенсора для детекции (псевдо)гипогалогенных кислот и их производных.....	140
3.3. Взаимодействие <b>Hypocrates</b> с (псевдо)гипогалогенными кислотами и их производными. ....	145
3.4. Кинетические параметры <b>Hypocrates</b> . ....	150
3.5. Селективность <b>Hypocrates</b> .....	154
3.6. Механизм функционирования <b>Hypocrates</b> . ....	160
3.7. Расшифровка пространственной структуры <b>HypocratesCS</b> . ....	165
3.8. Тестирование <b>Hypocrates</b> в культурах эукариотических клеток. ....	169
3.9. Визуализация (псевдо)гипогалогенного стресса <i>in vivo</i> в модели ампутации хвостового плавника <i>D. rerio</i> . ....	176
4. Заключение. ....	181
Выводы.....	183
Благодарности. ....	184
Список литературы. ....	185

## Список сокращений.

### *Англоязычные сокращения:*

ABAH – гидразид 4-аминобензойной кислоты

ADHP – 10-ацетил-3,7-дигидроксибензоксазин

AEBSF – 4-(2-аминоэтил)-бензолсульфонилфторид-гидрохлорид

AIF – апоптоз-индуцирующий фактор

APF – 2-[6-(4-амино)фенокси-3Н-ксантен-3-он-9-ил]бензойная кислота

BFP – синий флуоресцентный белок

BIL – билирубин

Bla-1 – TEM1  $\beta$ -лактамаза

BLIP – ингибитор TEM1  $\beta$ -лактамазы

BRET – биолюминесцентный резонансный перенос энергии

Btx – бациллиредоксин

BSH – восстановленный бациллитоол

BSSB – окисленный бациллитоол

CaM – кальмодулин

CFP – циановый флуоресцентный белок

CMV – цитомегаловирус

cpFP – круговой пермутант флуоресцентного белка

CUL3 – куллин 3

CytC – цитохром c

DMEM – Dulbecco's Modified Eagle Medium

DOSVS – Dual oxygen-sensing hypoxia responsive sensor/effector viral expression system

DPI – хлорид дифенилениодония

DTT – дитиотриэтол

DUOX – двойная оксидаза

EF-1 $\alpha$  – фактор элонгации 1 $\alpha$

E<sub>GSH</sub> – окислительно-восстановительный потенциал глутатиона

E<sub>m</sub> – эмиссия

EndoG – эндонуклеаза G

ERK1/2 – Extracellular Signal-Regulated Kinase 1/2

ESPT – перенос протона в возбужденном состоянии

Ex – возбуждение

FLIM – измерение времени жизни флуоресценции

FP – флуоресцентный белок

FRET – Фёрстеровский резонансный перенос энергии

GFP – зеленый флуоресцентный белок

Grx – глутаредоксин

GSH – восстановленный глутатион

GSSG – окисленный глутатион

GSTP1 – глутатион-S-трансфераза Pi 1

HIF – Hypoxia Inducible Factor

HMOX1 – гем-оксигеназа 1

HPF – 2-[6-(4-гидрокси)фенокси-3H-ксантен-3-он-9-ил]бензойная кислота

HREs – Hypoxia Response Elements

IAACl – хлорамин имидазол-4-уксусной кислоты

IFN- $\gamma$  – интерферон  $\gamma$

IL – интерлейкин

IPTG – изопропил- $\beta$ -d-1-тиогалактопиранозид

iq-FPs – ion-quenchable Fluorescent Proteins

JMК – c-Jun N-концевая киназа

LB – Lysogenic Broth

LSS – большой Стоксовский сдвиг

Luc – люцифераза

МАРК – митоген-активируемая протеинкиназа

MCP1 – Monocyte Chemoattractant Protein 1

mFP – мономерный флуоресцентный белок

MPTP – Mitochondrial Permeability Transition Pore

Mrx – микоредоксин

MSH – микотиол

NCT – N-хлоротаурин

NOX – NADPH-оксидаза

ODDs – Oxygen-Dependent Degradation Domains

PBS – фосфатно-солевой буфер

PDB – Protein Data Bank

PHD – пролилгидроксилазы  
PI3K – фосфатидил-инозитол-3-киназа  
PKC – протеинкиназа C  
PMA – форбол-12-миристат-13-ацетат  
PRIM – Proximity Imaging  
pVHL – продукт гена-супрессора опухолей фон Гиппеля-Линдау  
QY – квантовый выход  
RFP – красный флуоресцентный белок  
RMSD – среднеквадратичное отклонение  
roCherry – редокс-активный Cherry  
roGFP – редокс-активный зеленый флуоресцентный белок  
rxYFP – редокс-активный желтый флуоресцентный белок  
SD – стандартное отклонение  
SEM – стандартная ошибка среднего  
SERCA – sarco/endoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup>-ATPase  
sfFP – superfolder Fluorescent Protein  
SOD – супероксиддисмутаза  
tdFP – тандемный димер флуоресцентного белка  
TMB – 3,3',5,5'-тетраметилбензидин  
TNB – 5-тио-2-нитробензоат  
TNF $\alpha$  – фактор некроза опухолей  $\alpha$   
TPX – трипаноредоксин  
tsGFP – термочувствительный GFP  
T(SH)<sub>2</sub> – трипанотион  
TXNIP – Thioredoxin Interacting Protein  
Ub – убиквитин  
VPO1 – сосудистая пероксидаза 1  
VSD – вольтаж-чувствительный домен  
YFP – желтый флуоресцентный белок  
X – ксантин  
XOX – ксантиноксидаза

*Русскоязычные сокращения:*

АФА – активные формы азота

АФК – активные формы кислорода

ГАФД – глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа

ЛПО – лактопероксидаза

МПО – миелопероксидаза

ПЦР – полимеразная цепная реакция

СОД – супероксиддисмутаза

ТПО – тиреопероксидаза

ЭДТА – этилендиаминтетрауксусная кислота

ЭПО – эозинофильная пероксидаза

*Другие сокращения:*

$\Delta\psi$  – электрохимический потенциал митохондрий

## Введение.

### *Актуальность исследования.*

Развитие молекулярно-генетических методов, которое пришлось на конец XX века, привело к бурному росту количества аналитических техник для регистрации биохимических событий в живых организмах. Пожалуй, одним из наиболее плодотворных направлений оказалась разработка генетически кодируемых сенсоров на основе флуоресцентных белков. Данные инструменты представляют собой химерные полипептиды, которые состоят из сенсорного и репортерного доменов, взаимодействующих друг с другом. Под действием специфического молекулярного события генетически кодируемые сенсоры изменяют свои оптические свойства, что может быть визуализировано при помощи оптического оборудования. Лучшей иллюстрацией силы описанного подхода служат открытия, которые были получены с использованием подобных индикаторов в сфере окислительно-восстановительных процессов. Поскольку редокс-активные молекулы нестабильны, их прямое измерение в образцах, полученных из живых организмов, представляет существенные трудности. В ходе подготовки препаратов аналиты склонны распадаться и конвертироваться во вторичные интермедиаты, что порождает множество артефактов измерения. В то же самое время, генетически кодируемые сенсоры могут быть проэкспрессированы в тканях модельного объекта *in vivo*, где они будут взаимодействовать со своими мишенями в режиме реального времени. Кроме того, данные инструменты зачастую характеризуются низкой цитотоксичностью, высокой селективностью и замечательными кинетическими параметрами. На текущий момент, разработано большое количество сенсоров, позволяющих регистрировать  $H_2O_2$ , органические пероксиды,  $NO\bullet$ , сульфоксиды метионина, соотношения  $NAD^+/NADH$ ,  $NADP^+/NADPH$ , а также редокс-состояния пулов глутатиона, микотиола и бациллитиола. Но, к сожалению, в этой области остаются свои «белые пятна». Одним из них является отсутствие соответствующих инструментов для визуализации (псевдо)гипогалогенных кислот ( $HOCl$ ,  $HOBr$ ,  $HOscn$ ) и их производных.

(Псевдо)гипогалогенные кислоты представляют собой небольшие молекулы, которые выступают, пожалуй, самыми мощными двухэлектронными окислителями в живых системах. Традиционно их ассоциируют с функционированием иммунной системы, в рамках которого они служат для уничтожения патогенных микроорганизмов. Однако, в последние годы убедительно показано, что многие социально-значимые заболевания (в первую очередь, сердечно-сосудистые и нейродегенеративные) сопровождаются



признаками асептического воспаления. Так, для них характерны инфильтрация нейтрофилов и макрофагов в очаг патологии, повышенная продукция про-воспалительных цитокинов, а также редокс-стресс. Сейчас уже не возникает сомнений, что (псевдо)гипогалогенные кислоты не просто вовлечены в эти процессы, но и, в некоторых случаях, лежат в их основе. К сожалению, современные аналитические техники не позволяют совершить прорыв и значительно продвинуться в установлении конкретных аспектов метаболизма данных молекул. В большинстве случаев исследователям остается полагаться на непрямые методы, такие как *in vitro* измерение активности ферментов, синтезирующих активные формы (псевдо)галогенов, либо же на детекцию вторичных продуктов (псевдо)гипогалогенного стресса, которая сопряжена с низкой чувствительностью протоколов. И хотя каждый год появляются публикации, описывающие создание низкомолекулярных флуоресцентных индикаторов для регистрации НОСІ, их использование сталкивается со множеством проблем, вызванных, в первую очередь, сложностями с доставкой в ткани.

Еще не так давно казалось, что разработка генетически кодируемого сенсора для визуализации (псевдо)гипогалогенных кислот и их производных представляет собой невыполнимый проект, поскольку, будучи агрессивными окислителями, они не могут селективно взаимодействовать с белковыми модулями. Однако, открытие таких транскрипционных факторов как НурТ, НурR, RclR и NemR поставило подобные взгляды под сомнения. Таким образом, создание белкового индикатора, специфичного в отношении (псевдо)гипогалогенных кислот, теперь воспринимается не просто как актуальная, но и как практически осуществимая задача.

#### *Цель и задачи исследования.*

**Целью** настоящей работы является разработка генетически кодируемого флуоресцентного сенсора для визуализации (псевдо)гипогалогенных кислот и их производных, а также описание его основных свойств в модельных системах *in vitro* и *in vivo*.

Для достижения поставленной цели мы выделили следующие **задачи**:

1. Разработать дизайн генетически кодируемого сенсора для визуализации (псевдо)гипогалогенных кислот и их производных.
2. Охарактеризовать свойства полученного сенсора, прежде всего – спектральные характеристики, селективность, чувствительность и кинетические параметры.

3. Охарактеризовать сенсор в эукариотических системах экспрессии, в частности, на модели фагоцитоза бактерий первичными нейтрофилами человека.
4. При помощи созданного сенсора зарегистрировать *in vivo* динамику гипогалогенного стресса в модели воспаления ткани *Danio rerio*, вызванного ампутацией хвостового плавника.

*Научная новизна работы.*

В рамках настоящей работы создан и детально охарактеризован первый в мире генетически кодируемый сенсор для регистрации (псевдо)гипогалогенных кислот и их производных на основе транскрипционного фактора NemR и кругового пермутанта желтого флуоресцентного белка. Разработанный нами инструмент (Hurocrates) не имеет аналогов и обладает множеством преимуществ по сравнению с альтернативными аналитическими методами, используемыми в современной практике. Он сочетает в себе радиометрический сигнал, обратимый характер ответа, высокую селективность и оптимальные кинетические параметры взаимодействия с целевыми аналитами. В отличие от низкомолекулярных агентов, Hurocrates не нуждается в инвазивных методах доставки, поскольку он является молекулой белковой природы и может быть проэкспрессирован в желаемых клеточных типах за счет специфических промоторов, или даже направлен в конкретные органеллы при помощи пептидных меток.

Hurocrates обладает необычными кинетическими свойствами – очищенный белок демонстрирует достаточно высокую константу скорости реакции с N-хлоротаурином ( $\sim 6.1 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ). Таким образом, согласно нашим данным, Hurocrates является самой реакционноспособной молекулой в отношении хлораминов, описанной на текущий момент. Мы также расшифровали пространственную структуру мутантной версии сенсора, HurocratesCS, содержащей замену ключевого остатка Cys355, ответственного за взаимодействие с целевыми аналитами. HurocratesCS представляет собой первый редокс-сенсор на основе кругового пермутанта флуоресцентного белка, для которого известна пространственная укладка.

Наконец, при помощи разработанного нами индикатора мы смогли зарегистрировать (псевдо)гипогалогенный стресс, с которым сталкиваются клетки *Escherichia coli*, поглощаемые первичными нейтрофилами человека, в режиме реального времени. Мы показали, что бактерии испытывают масштабное окисление цитоплазмы с первых секунд после попадания в полость фагосомы. До этого подобные эксперименты осуществляли с использованием неселективных методов, либо техник, не обладающих

достаточным пространственно-временным разрешением. Нам также удалось зарегистрировать *in vivo* динамику (псевдо)гипогалогенных кислот в модели ампутации хвостового плавника *Danio rerio*. Этот результат является еще одним подтверждением гипотезы о том, что градиент пероксида водорода, возникающий в области раны, конвертируется в активные формы галогенов прибывающими лейкоцитами. В предыдущих работах авторы приводили лишь косвенные доказательства протекания данного процесса в физиологических условиях.

*Теоретическая и практическая значимость.*

Практическая значимость настоящей работы состоит в расширении современной палитры аналитических техник для регистрации (псевдо)гипогалогенных кислот и их производных в живых объектах. Нурократес может быть использован в модельных системах различного уровня сложности. Во-первых, среди всех известных нам индикаторов, он в наилучшей мере способен визуализировать субклеточную динамику (псевдо)гипогалогенного стресса в режиме реального времени. Во-вторых, Нурократес может стать основой для высокопроизводительных скринингов, направленных на поиск ингибиторов миелопероксидазы или же агентов, модулирующих активность нейтрофилов. В-третьих, он пригоден для изучения взаимодействия между клетками иммунной системы и патогенными микроорганизмами. Наконец, он открывает широкие возможности по *in vivo* визуализации редокс-стресса в живых организмах. Мы надеемся, что в последующие годы Нурократес станет популярным и востребованным инструментом не только в России, но и в других странах, что позволит существенным образом расширить наши представления о метаболизме (псевдо)гипогалогенных кислот и их роли в патогенезе социально-значимых заболеваний.

Теоретическая значимость настоящей работы может быть описана в нескольких положениях. Во-первых, уникальная чувствительность Нурократес с хлоротаурину свидетельствует о том, что белковое окружение реакционного центра существенным образом модулирует его кинетические свойства. Таким образом, полученные результаты могут стать отправной точкой для поиска других белков, демонстрирующих необычные параметры взаимодействия с активными формами галогенов. Во-вторых, пространственная структура Нурократес позволяет получить представления не только о механизме его функционирования, но и о механизмах функционирования других сенсоров на основе круговых пермутантов флуоресцентных белков. Эти открывает возможность для рациональной оптимизации современных инструментов. Наконец, при помощи

Нурocrates мы смогли зарегистрировать динамику (псевдо)гипогалогенного стресса, испытываемого фагоцитируемыми бактериями, а также поврежденными тканями *Danio rerio* в режиме реального времени. Тем самым наша работа дополняет современную картину редокс-процессов, протекающих в норме и патологии.

*Степень достоверности результатов.*

Результаты, представленные в настоящей работе, были получены с использованием широкого арсенала современных методов. К основным техникам относились: молекулярное клонирование, препаративная аффинная хроматография белков, аналитическая гель-фильтрация белков, спектрофлуориметрия, метод остановленной струи, рентгеноструктурный анализ, изолирование первичных нейтрофилов человека, флуоресцентная микроскопия культур эукариотических клеток и живых мальков *Danio rerio*. Таким образом, полученные нами данные описывают исследуемую научную проблему с различных сторон.

Минимальное количество независимых измерений для большинства *in vitro* тестов составляло 3 повторности, при этом использованное оборудование обеспечивало достаточный уровень сходимости. Для некоторых тестов, в которых мы регистрировали зависимость между переменными, образцы были исследованы по одному разу, однако, в данных случаях необходимую точность достигали за счет количества шагов. Ряд экспериментов осуществляли в единичных повторностях (например, регистрацию спектров возбуждения флуоресценции сенсоров в бактериях), поскольку наша задача состояла в детекции выраженных качественных эффектов. Мы никогда не использовали подобные результаты для построения каких-либо количественных выводов, их целью была лишь демонстрация основных трендов в поведении исследуемых систем. Следует отметить, что многие *in vitro* эксперименты были независимо повторены нашими коллегами из лаборатории профессора Joris Messens (Брюссель, Бельгия). Полученные данные демонстрируют высокий уровень сходимости.

В опытах с использованием культур эукариотических клеток и живых мальков *Danio rerio*, мы всегда сравнивали сигнал Нурocrates с сигналом контрольной версии сенсора, НурocratesCS. В некоторых случаях мы дополнительно задействовали рН-индикатор (SypHer3s). Минимальное количество независимых повторностей для экспериментов с линией HeLa составляло 1 (обычно, 3), при этом минимальное количество обсчитываемых клеток равнялось 25. Для экспериментов с нейтрофилами количество независимых экспериментов равнялось 3, и общее количество исследованных

клеток составляло 35. Мы считаем, что такие размеры выборок являются достаточными, поскольку измеряемые параметры индивидуальных клеток характеризовались дисперсиями существенно меньшими, нежели сила исследуемых эффектов. В целом, подобные объемы выборок являются общепринятыми в данной сфере.

В случае экспериментов с *Danio rerio* мы подготавливали 3-4 малька на каждый эксперимент, при этом эксперименты проводили по 3-4 раза. Некоторых животных приходилось исключать из анализа данных, поскольку они выпадали из фокуса в ходе микроскопии. Помимо NurocratesCS, в качестве контролей мы использовали мальков, которым не проводили операцию. Полученные результаты обрабатывали вслепую при помощи двухфакторного дисперсионного анализа, а также критерия Тьюки. Статистический анализ свидетельствует о том, что зарегистрированные нами различия являются достоверными.

#### *Структура диссертации.*

Диссертационная работа изложена на 230 страницах и состоит из Оглавления, Списка сокращений, Введения, Обзора литературы, Материалов и методов исследования, Результаты и обсуждения, Заключение, Выводов, Благодарностей, а также Списка цитируемой литературы, включающего 695 источников. Диссертация содержит 46 рисунков и 5 таблиц.

#### *Апробация работы.*

Основные результаты работы были представлены на 3 конференциях:

1. Genetically encoded fluorescent indicator for hypochlorite ClO<sup>-</sup>. EMBO Conference on Redox Biology. Россия, Москва – Санкт-Петербург, 16-23 Июля 2017.
2. A novel genetically encoded fluorescent biosensor for visualization of (pseudo)hypohalous acids and their derivatives. Thiol-based Redox Switches – From microbes to men. Испания, Сан-Фелиу-де-Гишольс, 15-20 Сентября 2019.
3. Визуализация (псевдо)гипогалогенных кислот и их производных при помощи генетически кодируемого сенсора Nurocrates. VII Съезд биохимиков и молекулярных биологов России и X Российский симпозиум «Белки и пептиды». Россия, Сочи, 3-7 октября 2022.

По материалам работы опубликовано 6 статей в рецензируемых журналах:

1. **Kostyuk, A. I.**, Panova, A. S., Bilan, D. S., & Belousov, V. V. (2018). Redox biosensors in a context of multiparameter imaging. *Free Radical Biology and Medicine*, 128, 23-39. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2018.04.004
2. **Kostyuk, A. I.**, Demidovich, A. D., Kotova, D. A., Belousov, V. V., & Bilan, D. S. (2019). Circularly Permuted Fluorescent Protein-Based Indicators: History, Principles, and Classification. *International journal of molecular sciences*, 20(17), 4200. DOI: 10.3390/ijms20174200
3. **Kostyuk, A. I.**, Kokova, A. D., Podgorny, O. V., Kelmanson, I. V., Fetisova, E. S., Belousov, V. V., & Bilan, D. S. (2020). Genetically Encoded Tools for Research of Cell Signaling and Metabolism under Brain Hypoxia. *Antioxidants*, 9(6), 516. DOI: 10.3390/antiox9060516
4. **Kostyuk, A. I.\***, Panova, A. S.\*, Kokova, A. D., Kotova, D. A., Maltsev, D. I., Podgorny, O. V., Belousov, V. V., & Bilan, D. S. (2020). In vivo imaging with genetically encoded redox biosensors. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(21), 8164. DOI: 10.3390/ijms21218164 (\* - авторы внесли равный вклад в работу)
5. Chebotarev, A. S., Lanin, A. A., Raevskii, R. I., **Kostyuk, A. I.**, Smolyarova, D. D., Bilan, D. S., Savitskii, I. V., Fedotov, A. B., Belousov, V. V., & Zheltikov, A. M. (2021). Single-beam dual-color alternate-pathway two-photon spectroscopy: Toward an optical toolbox for redox biology. *Journal of Raman Spectroscopy*, 52(9), 1552-1560. DOI: 10.1002/jrs.6183
6. **Kostyuk, A. I.\***, Tossounian, M.-A.\*, Panova, A. S., Thauvin, M., Raevskii, R. I., Ezeriņa, D., Wahni, K., Van Molle, I., Sergeeva, A. D., Vertommen, D., Gorokhovatsky, A. Y., Baranov, M. S., Vriz, S., Messens, J., Bilan, D. S. & Belousov, V. V. (2022). Hypocrates is a genetically encoded fluorescent biosensor for (pseudo)hypohalous acids and their derivatives. *Nature Communications*, 13(1), 1-17. DOI: 10.1038/s41467-021-27796-2 (\* - авторы внесли равный вклад в работу)

## 1. Обзор литературы.

### 1.1. (Псевдо)гипогалогенные кислоты и их производные.

*1.1.1. Продукция (псевдо)гипогалогенных кислот в живых организмах и их основные химические свойства.*

Гипогалогенные кислоты – это небольшие высоко реакционноспособные соединения с общей формулой  $\text{HOX}$ , где X соответствует атому галогена. В биологическом контексте наиболее распространенными представителями группы являются хлорноватистая ( $\text{HOCl}$ ) и бромноватистая ( $\text{HOBr}$ ) кислоты. В последние годы научная общественность также активно изучает метаболизм и физиологические эффекты гипотиоциановой кислоты ( $\text{HOSCN}$ ), которая демонстрирует определенные сходства в химических свойствах с уже упомянутыми агентами. Таким образом, все перечисленные молекулы объединяют в единый класс соединений под общим названием «(псевдо)гипогалогенных кислот».  $\text{HOCl}$ ,  $\text{HOBr}$  и  $\text{HOSCN}$  вступают в реакции диссоциации, которые характеризуются величинами  $\text{pK}_a$   $\sim 7.5$  [1],  $\sim 8.7$  [2] и  $\sim 5.3$  [3] единицы. Соответственно, в условиях цитоплазмы клеток обсуждаемые агенты представлены смесью кислот и сопряженных оснований. Данную информацию следует держать в уме, поскольку некоторые процессы с их участием оказываются селективными в отношении статуса протонирования реагентов. Однако, в дальнейшем, под обозначениями « $\text{HOCl}$ », « $\text{HOBr}$ » и « $\text{HOSCN}$ » мы будем иметь в виду равновесные популяции, состоящие из диссоциированных и недиссоциированных молекул.

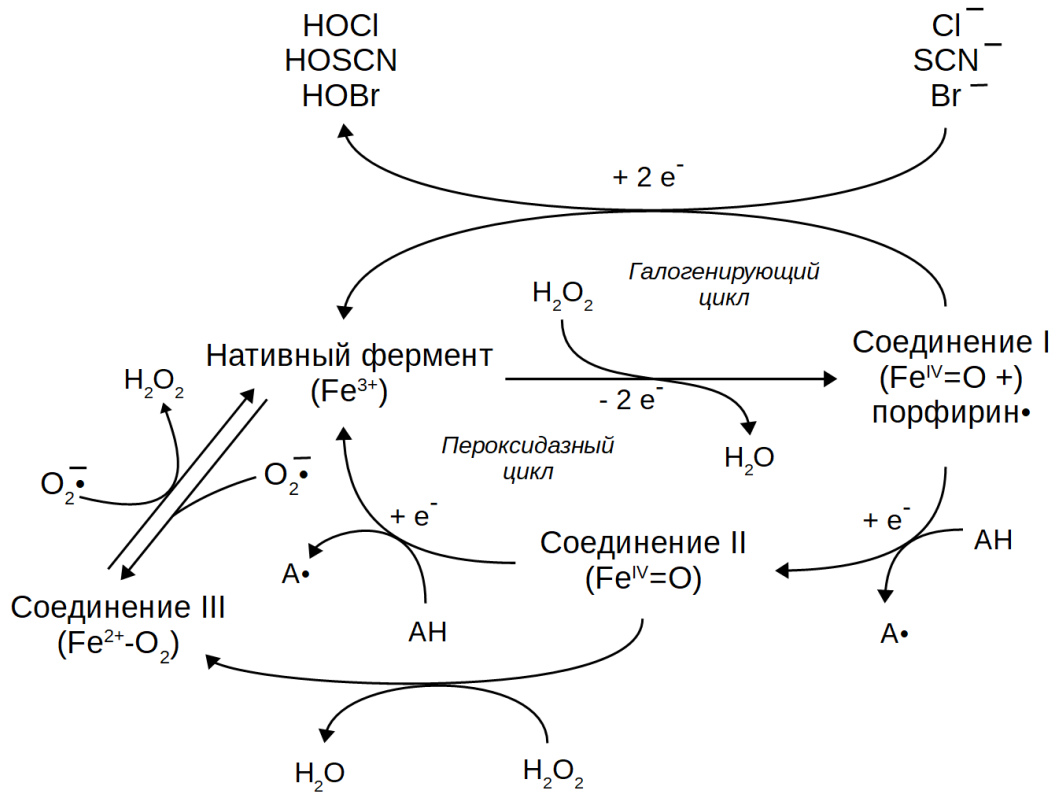
Основным источником (псевдо)гипогалогенных кислот в организмах позвоночных служат ферменты семейства гемовых пероксидаз хордовых, представленные миелопероксидазой (МПО), эозинофильной пероксидазой (ЭПО), лактопероксидазой (ЛПО), а также тиреопероксидазой (ТПО) [4]. В случае человека, все перечисленные ферменты (за исключением ТПО) закодированы гомологичными генами, которые расположены в едином кластере на 17-ой хромосоме и являются результатом тандемных дупликаций [5]. Около пятнадцати лет назад был открыт еще один представитель обсуждаемого семейства – сосудистая пероксидаза 1 ( $\text{VPO1}$ , Vascular Peroxidase 1), также известная как гомолог пероксидазина млекопитающих [6,7]. К сожалению, на текущий момент этот белок недостаточно хорошо исследован ввиду существующих сложностей с его выделением и последующим биохимическим описанием. Характерная черта гемовых пероксидаз хордовых состоит в том, что их простетическая группа соединена с

полипептидным остовом при помощи ковалентных сшивок, что, по всей видимости, защищает их от модификации собственными продуктами [8].

Среди обсуждаемых ферментов наибольшее количество опубликованной информации касается МПО. Длинная история изучения данного белка началась еще во второй половине XIX века, когда Klebs и Struve продемонстрировали изменение цвета гваякола при его смешивании с гноем [9]. Позже было показано, что аналогичная реакция протекает с участием лейкоцитов крови. В 1941 году Agner выделил очищенный препарат МПО, которую, на тот момент, он назвал вердопероксидазой из-за зеленого оттенка, характерного для растворов фермента [10]. Сейчас известно, что упомянутая особенность белка связана с наличием уникальной третьей ковалентной связи, образующейся между гемом и остатком метионина [11]. Данная модификация приводит к искажению пространственной структуры тетрапиррольной системы, что оказывает прямое влияние как на оптические свойства молекулы, так и на ее окислительно-восстановительный потенциал. Наименование «вердопероксидаза» продержалось до 1980 года, после чего уступило место современной номенклатуре, предложенной Theorell [12]. Научная общественность считала, что ассоциация названия белка с органом/тканью, в которых он может быть найден, является более ценной, нежели отсылка к физико-химическим параметрам вещества. МПО представляет собой димер, образованный дисульфидной сшивкой двух субъединиц, каждая из которых состоит из легкой и тяжелой цепей. В целом, обсуждаемый фермент образуется из единого предшественника (апопроМПО) в ходе сложной последовательности множественных пост-трансляционных модификаций [13]. Стоит отметить, что при прохождении через люмен ЭПР тяжелые цепи приобретают высокое количество олигосахаридных остатков, обогащенных маннозой. Некоторые исследователи считают, что данный фактор обуславливает часть неферментативных эффектов МПО, которые белок оказывает в рамках патогенеза социально-значимых заболеваний нервной системы. Так, секреция МПО во внеклеточное пространство потенциально приводит к активации иммунных клеток путем воздействия на их трансмембранные рецепторы [14].

МПО демонстрирует достаточно сложный каталитический цикл, который начинается с двухэлектронного восстановления  $\text{H}_2\text{O}_2$  до молекулы воды (**Рис. 1**). При этом образуется так называемое Соединение I, состоящее из оксиферрильного центра ( $\text{Fe}^{\text{IV}}=\text{O}$ ) и резонансно стабилизированного радикала порфирина [15]. В дальнейшем оно





**Рисунок 1.** Некоторые реакции, протекающие в активном центре миелопероксидазы. АН – пероксидазный субстрат. Пояснения в тексте.

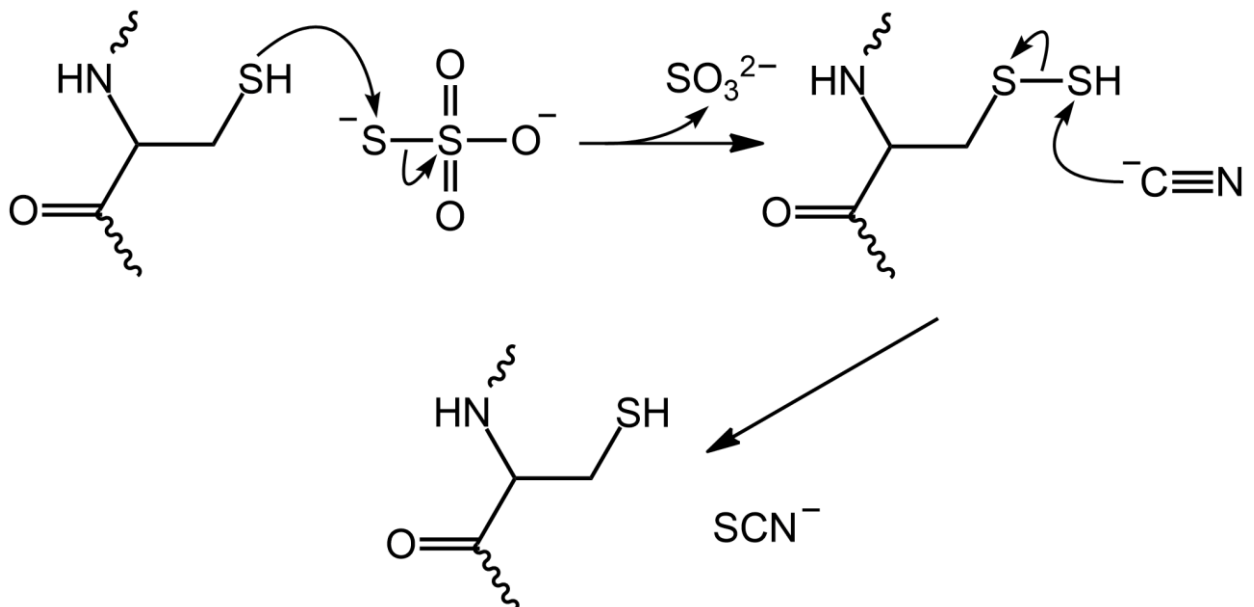
может пойти по одному из двух путей, которые получили названия «пероксидазного» и «галогенирующего». В первом случае Соединение I окисляет подходящий субстрат до соответствующего радикала, в результате чего восстанавливает третрапиррольную систему и конвертируется в интермедиат, известный как Соединение II. Далее, Соединение II вступает в аналогичную реакцию и возвращается в исходное состояние. Считается, что в условиях *in vivo* подобным образом метаболизируются тирозин, аскорбат, стероидные гормоны и мочевая кислота [15]. Интересной особенностью МПО является тот факт, что Соединение I представляет собой гораздо более мощный окислитель, нежели Соединение II [16]. Это приводит к тому, что для обсуждаемого фермента существует большое количество «плохих пероксидазных субстратов», которые способны вступать в первую, но не во вторую реакцию. Соответственно, увеличение их концентрации в системе будет приводить к ингибированию работы белка за счет запираания его в форме Соединения II. Возникающая ситуация может быть разрешена при помощи взаимодействия с  $\text{O}_2\cdot^-$ , который возвращает МПО в каталитически-активное состояние [17]. Отметим, что супероксид в целом можно рассматривать в качестве модулятора активности фермента. Известно, что некоторые факторы конвертируют МПО в достаточно

инертное Соединение III, характеризующееся наличием восстановленного иона  $\text{Fe}^{2+}$  в составе активного центра. К ним относятся воздействие ряда ксенобиотиков [18–20], а также перегрузка системы пероксидом водорода [21].  $\text{O}_2^{\bullet-}$  активно реагирует с Соединением III и тем самым позволяет белку продолжить свою работу [22]. Однако, в условиях недостатка  $\text{H}_2\text{O}_2$  данный агент сам приводит к накоплению обсуждаемой формы МПО, которая теперь начинает функционировать как супероксид-дисмутаза [21,23].

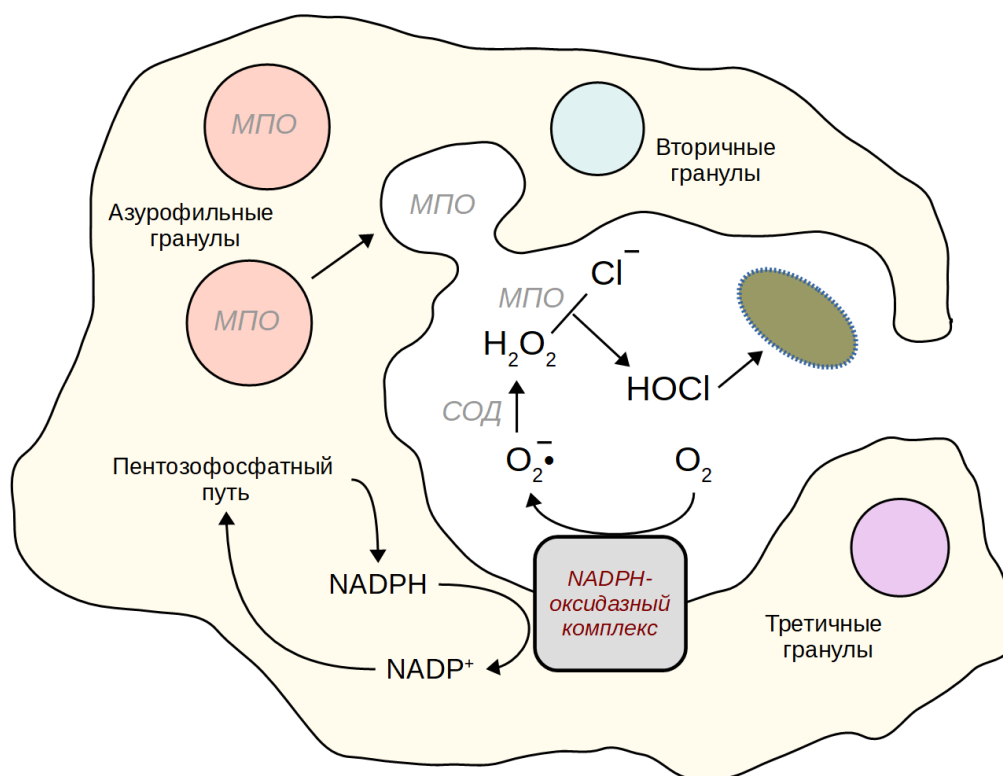
Галогенирующий путь фермента заключается в двухэлектронном окислении (псевдо)галогенид-аниона Соединением I (Рис. 1). Предполагают, что данная реакция протекает в одну стадию и не сопровождается формированием каких-либо интермедиатов [15]. Ранее, некоторые авторы подвергали сомнению саму концепцию о том, что МПО способна производить свободную  $\text{HOCl}$  [24]. В частности, кинетические данные, полученные *in vitro* с использованием таурина, свидетельствуют, что хлорирующим агентом выступает комплекс Соединения I и  $\text{Cl}^-$  [25]. Однако, когда МПО инкубировали в присутствии объемных полисахаридов (например, сульфата гепарина), которые не могут проникать в активный центр белка, в системе все равно наблюдали рост концентрации хлораминов [15]. Таким образом, на текущий момент продукция свободной  $\text{HOCl}$  под действием МПО считается общепризнанным явлением. Впрочем, стоит помнить, что, по всей видимости, небольшие субстраты могут быть хлорированы ферментом напрямую. Отдельного обсуждения заслуживает вопрос о том, какие именно (псевдо)гипогалогенные кислоты являются преимущественными продуктами каталитического цикла МПО *in vivo*. Известно, что некоторые физико-химические факторы оказывают непосредственное влияние на специфичность белка. Так, защелачивание среды приводит к тому, что селективность фермента в отношении  $\text{Br}^-$  существенно возрастает, и при физиологических концентрациях хлорида и бромида до 40% прореагировавшего пероксида расходуется на синтез  $\text{HOBr}$  [26]. Вообще, в современной литературе все чаще встречается точка зрения, согласно которой,  $\text{SCN}^-$  служит одним из основных субстратов МПО. Показано, что константа сродства обсуждаемого белка к  $\text{SCN}^-$  превышает аналогичное значение для  $\text{Cl}^-$  в 730 раз [27]. Более того,  $\text{SCN}^-$  является кинетически наиболее благоприятным реагентом МПО: измеренные константы скоростей равняются  $9.6 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  для  $\text{SCN}^-$ ,  $2.5 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  для  $\text{Cl}^-$  и  $1.1 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  для  $\text{Br}^-$  [28]. И если концентрация  $\text{Cl}^-$  (100-140 мМ), принимающего ключевое участие в регуляции мембранных потенциалов клетки, в плазме крови людей изменяется несильно, то уровни  $\text{Br}^-$  и  $\text{SCN}^-$  могут демонстрировать вариации величиной 5 и 10 раз, соответственно [29,30]. Избыточное накопление цианида или цианогенных гликозидов, которое характерно для курильщиков [31], пациентов,

принимающих ряд препаратов [32], а также людей, потребляющих маниок в качестве одного из основных продуктов питания [33], приводит к активации митохондриальной роданазы, участвующей в детоксификации данных соединений [34] (**Рис. 2**). На выходе, концентрация  $\text{SCN}^-$  в плазме крови может возрастать от 20-30 мкМ вплоть до 250 мкМ [30,35]. Кинетическое моделирование предполагает, что в подобных условиях около 50% прореагировавшего пероксида водорода будет направлено на синтез  $\text{HOSCN}$  [29]. В целом, накопленная информация свидетельствует о том, что основными физиологическими продуктами МПО являются  $\text{HOCl}$  и  $\text{HOSCN}$ , ЭПО генерирует  $\text{NO}^\bullet$  и  $\text{HOSCN}$ , а ЛПО –  $\text{HOSCN}$  [15].

В последние годы все больше работ посвящено изучению того, какие именно ткани в организме млекопитающих содержат каталитически-активную МПО. Ранние исследования предполагали, что экспрессия данного белка ограничена незрелыми клетками миелоидной линии и в дифференцированном состоянии обсуждаемый фермент присутствует исключительно в азурофильных гранулах нейтрофилов [9]. Когда активированный нейтрофил захватывает патогенный микроорганизм, на мембране формирующейся фагосомы происходит сборка  $\text{NADPH}$ -оксидазного комплекса ( $\text{NOX}$ ), служащего для конверсии молекулярного кислорода в супероксид-анион. Далее, под действием супероксид-дисмутазы  $\text{O}_2^{\bullet-}$  превращается в пероксид водорода, выступающий ключевым субстратом для МПО [36] (**Рис. 3**). Klebanoff был одним из первых, кто убедительно продемонстрировал бактерицидные свойства системы МПО/ $\text{H}_2\text{O}_2/\text{Cl}^-$  [37,38]. Однако, дальнейшие исследования обнаружили парадоксальный факт, который состоит в



**Рисунок 2.** Упрощенная схема процессов, происходящих в активном центре фермента роданазы. Пояснения в тексте.



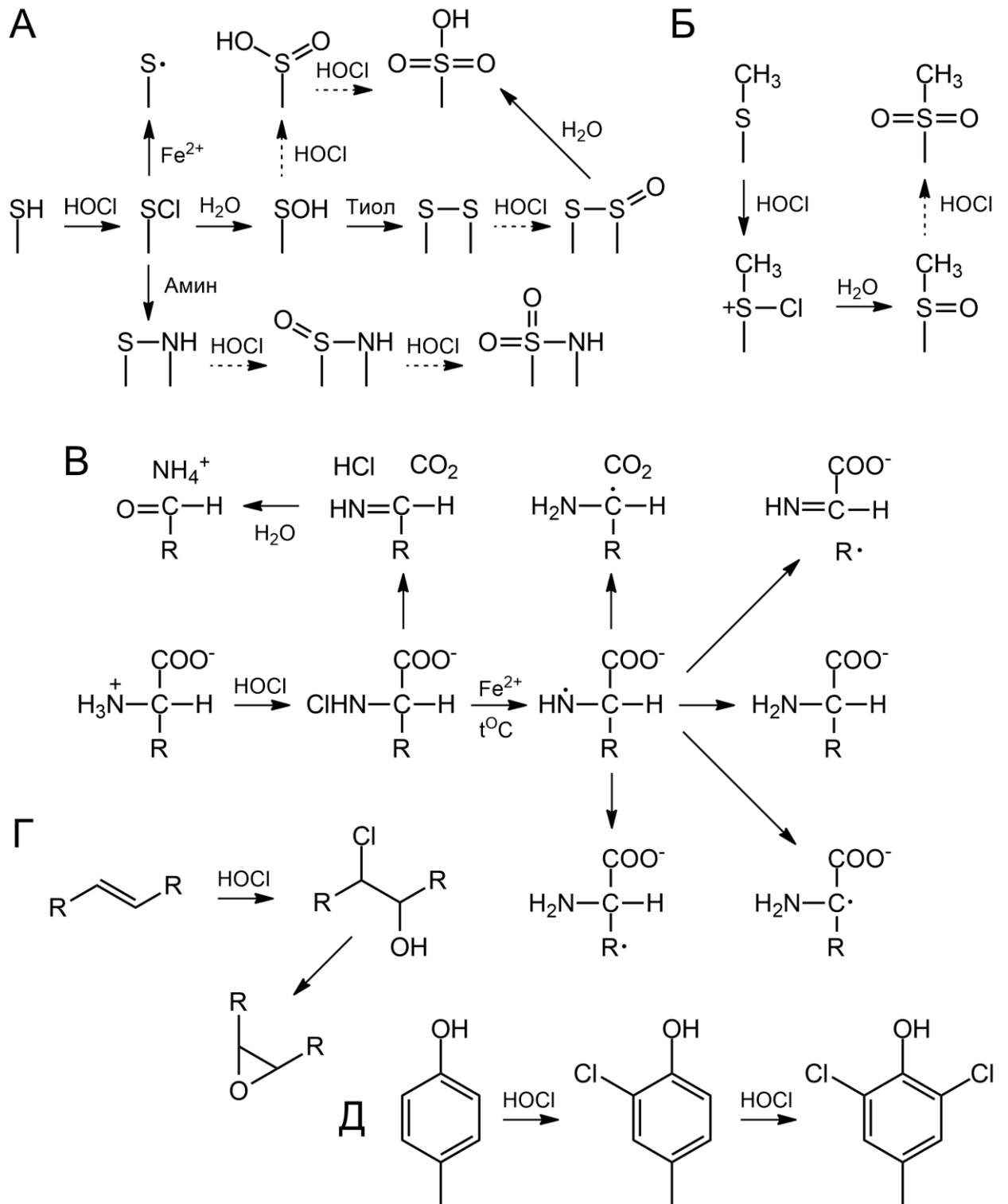
**Рисунок 3.** Участие миелопероксидазы (МПО) в окислительном взрыве нейтрофилов. СОД – супероксиддисмутаза. Пояснения в тексте.

том, что люди, лишённые данного фермента, как правило, не характеризуются выраженными фенотипическими отклонениями [39] за исключением некоторой склонности к грибковым инфекциям [40,41]. Предполагают, что подобное положение дел связано с активацией компенсаторных механизмов, среди которых можно выделить увеличение продолжительности окислительного взрыва, а также повышенную продукцию эозинофилов в костном мозге [39]. В то же самое время, бурный рост публикаций, связывающих (псевдо)гипогалогенный стресс с заболеваниями, сопровождающимися асептическим воспалением, подтолкнул коллективы из разных точек мира к проверке гипотезы о том, что экспрессия МПО может быть инициирована в патологическом контексте. Оказалось, что макрофаги из участков атеросклеротических бляшек действительно содержат каталитически-активный фермент [42,43]. Аналогичные наблюдения были получены в отношении лимфоцитов на фоне ВИЧ-инфекции [44], а также клеток центральной нервной системы – нейронов [45] и микроглии [46,47].

НОСI является одним из самых мощных двухэлектронных окислителей, присутствующих в живых организмах (стандартный восстановительный потенциал

составляет 1.28 В при рН 7.0 в воде [48]). Таким образом, данный агент способен повреждать крайне широкий круг биологических мишеней. Считается, что именно этот параметр делает его настолько эффективным при уничтожении патогенных микроорганизмов в ходе окислительного взрыва. В целом, реакционная способность HOCl возникает из-за наличия частично положительного заряда на атоме хлора, наделяющего его мощными электрофильными свойствами. Подавляющее число работ исследовали взаимодействие хлорноватистой кислоты с модельными аналогами белков и пептидов, поскольку они служат ее основными мишенями в условиях клеток. Константы скоростей соответствующих реакций падают в порядке Met > Cys >> цистин ~ His ~  $\alpha$ -аминогруппа > Trp > Lys >> Tyr ~ Arg ~ пептидная связь >> Gln ~ Asn [49]. Вообще, большую часть процессов с участием HOCl можно разделить на три класса: 1) хлорирование S-содержащих молекул; 2) хлорирование N-содержащих молекул; 3) электрофильное присоединение/замещение по ненасыщенным связям.

Согласно кинетическим данным, наиболее быстрые реакции HOCl вовлекают остатки цистеина и метионина. Соответствующие константы скоростей принимают значения около  $3.2 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$  и  $3.8 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$ . Несколько медленнее реагирует цистин ( $\sim 1.6 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$ ) [50]. Эксперименты предполагают, что взаимодействие с цистеином протекает наиболее активно в том случае, когда реагенты представлены тиолят-анионом и протонированной хлорноватистой кислотой [51]. Однако, в целом, обсуждаемая реакция не очень чувствительна к  $pK_a$  SH-группы, поскольку структурные особенности субстрата изменяют величину константы в пределах пяти раз [52]. Формирующиеся связи S-Cl оказываются нестабильными и в биологических условиях вступают в дальнейшие перегруппировки (**Рис. 4А**). Хлорированные остатки цистеина могут гидролизироваться под действием воды с образованием сульфеновых (-SOH) кислот, которые либо терминируются с образованием дисульфидных связей, либо принимают участие в более глубоких реакциях окисления [53]. Так, взаимодействие сульфеновых кислот с HOCl приводит к накоплению сульфиновых (-SO<sub>2</sub>H) и сульфоновых (-SO<sub>3</sub>H) производных [54]. Следует отметить, что если некоторые сульфиновые кислоты могут быть восстановлены под действием сульфиредоксинов [55], то сульфоновые кислоты на текущий момент считаются нерепарируемыми повреждениями. С другой стороны, связи S-Cl служат мишенями для электрофильных атомов азота, распространенных в боковых радикалах аминокислот. В частности, биологическую значимость имеет формирование сульфенамидных группировок (-S-NH-) с участием остатков лизина. В дальнейшем,



**Рисунок 4.** Основные типы реакций с участием HOCl, протекающие в живых организмах. (А) Реакции с участием сульфгидрильных групп. (Б) Реакции с участием остатков метионина. (В) Реакции с участием аминов на примере свободных  $\alpha$ -аминокислот. (Г) Реакции с участием двойных связей. (Д) Реакции с участием ароматических групп на примере тирозина. Пояснения в тексте.

сульфенамиды могут быть окислены  $\text{HOCl}$  до сульфинамидов ( $-\text{S(O)-NH-}$ ) и сульфонамидов ( $-\text{S(O}_2\text{)-NH-}$ ) [56–58]. Наконец, в некоторых случаях связь  $\text{S-Cl}$  оказывается изолирована от потенциальных реакционноспособных центров, и тогда одним из преимущественных процессов становится ее гомолитический разрыв [59].  $\text{HOCl}$ -опосредованное окисление метионина приводит к двум основным продуктам – к сульфоксиду ( $-\text{S(O)-}$ ) и сульфону ( $-\text{S(O}_2\text{)-}$ ) [54,60] (**Рис. 4Б**). В отличие от первого случая, ферменты, которые бы устраняли вторую модификацию в условиях живой клетки, остаются неизвестными. Интересно, что N-концевые остатки хлорированных метионинов могут вступать в реакцию циклизации, завершающуюся формированием дегидрометионина [61]. По всей видимости, подобный процесс уникален для гипогалогенных кислот и не протекает под действием других окислителей.

Взаимодействие азотсодержащих веществ с  $\text{HOCl}$  характеризуется выраженной зависимостью кинетических свойств от конкретного строения молекулы, а также от окружения реакционного центра. Например, значения кинетических констант для  $\alpha$ -аминогрупп превышают аналогичную величину для боковой цепи лизина примерно на два порядка ( $\sim 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$  против  $\sim 7.9 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$ ) [50]. В отличие от цистеинов, в данном случае наиболее активная реакция протекает с участием сопряженной кислоты ( $-\text{NH}_3^+$ ) и гипохлорит-аниона ( $\text{OCl}^-$ ) [62]. Остаток имидазола в составе гистидина также является достаточно благоприятной мишенью для  $\text{HOCl}$  ( $\sim 1.2 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$ ) [50]. Подобный тренд может быть обнаружен и в случае азотистых оснований нуклеиновых кислот. Так, эндоциклические атомы азота демонстрируют константы скоростей на 3-4 порядка выше, чем эндоциклические атомы [63,64]. Реакции с участием амидных групп характеризуются широким разбросом кинетических параметров. Наибольшие значения были получены в случае пептидных связей ( $\sim 1-100 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$ ), в то время как модельные аналоги боковых групп глутамина и аспарагина оказываются достаточно инертными ( $\sim 10^{-2} \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$ ) [50]. Эффекты влияния окружения на реакционную способность азотсодержащих молекул могут быть проиллюстрированы несколькими примерами. Во-первых, показано, что полимеризация нуклеотидов сама по себе несильно влияет на их взаимодействие с  $\text{HOCl}$  [63,64]. Однако, когда индивидуальные цепи объединяются в дуплекс, потенциальные участки взаимодействия оказываются экранированными от окислителя, что приводит к падению наблюдаемых скоростей реакций. Согласно теоретическим ожиданиям, данный эффект может быть элиминирован путем плавления ДНК [63,64]. Во-вторых, схожим образом стерические факторы снижают кинетические параметры галогенирования N-содержащих полисахаридов по сравнению с индивидуальными мономерами [65]. В-

третьих, присутствие отрицательного заряда в окружении амидной группы приводит к падению константы скорости примерно на один порядок [50]. Аналогичный эффект может быть обнаружен и в случае аминогруппы серина в составе фосфолипидов [66]. В дальнейшем связи N-Cl вступают в многочисленные превращения (**Рис. 4В**). Одним из физиологически важных процессов является элиминация HCl, которая наиболее интенсивно протекает с участием  $\alpha$ -групп аминокислот и сопровождается их декарбоксилированием. Образующиеся имины могут быть гидролизованы до соответствующих альдегидов, которые служат субстратами для формирования оснований Шиффа [67,68]. В других случаях N-Cl связи взаимодействуют с одноэлектронными донорами (например, ионами переходных металлов), что приводит к продукции свободных радикалов, обладающих способностью запускать цепные реакции по типу перекисного окисления липидов [69,70]. Наконец, следует помнить, что хлорамины и хлорамиды сами по себе являются редокс-активными веществами, поскольку они сохраняют хлорирующий потенциал, о чем будет сказано далее в бóльших подробностях.

НОСl способна вступать в реакции электрофильного присоединения по двойным связям (**Рис. 4Г**). Их продуктами оказываются галогидрины, которые в некоторых случаях претерпевают внутримолекулярное нуклеофильное замещение с образованием эпоксидов [71]. В частности, описанный процесс характерен для  $\beta$ -каротина и характеризуется кинетической константой величиной  $\sim 2.3 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$  [72]. НОСl также окисляет модельные аналоги  $\alpha$ -токоферола (Trolox,  $\sim 1.3 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$ ) и убихинола-10 (убихинол-0,  $\sim 1.3 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$ ) [66]. Несмотря на то, что данные вещества в целом демонстрируют достаточно активное взаимодействие с гипохлоритом, приведенные значения оказываются на несколько порядков ниже, чем аналогичные параметры для S- и N-содержащих молекул. Таким образом, едва ли перечисленные гидрофобные антиоксиданты могут служить надежной защитой мембранных белков от НОСl-опосредованных повреждений в условиях живой клетки. Гораздо медленнее реагируют алифатические двойные связи в составе ненасыщенных жирных кислот и холестерина. Экспериментальные оценки соответствующих констант указывают на величины около  $1-10 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$  [73], которые могут быть дополнительно снижены стерическими факторами. Например, в одном из исследований авторы показали, что интеграция липидов в многослойные липосомы снижает кинетические параметры реакции до  $0.5 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$  по сравнению с  $3 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$  для однослойных структур [49,74]. Отдельного упоминания заслуживает взаимодействие НОСl с плазмалогенами, которые содержат простой эфир ненасыщенного спирта в первом положении глицерина. Присоединение хлорноватистой кислоты конвертирует эфирную



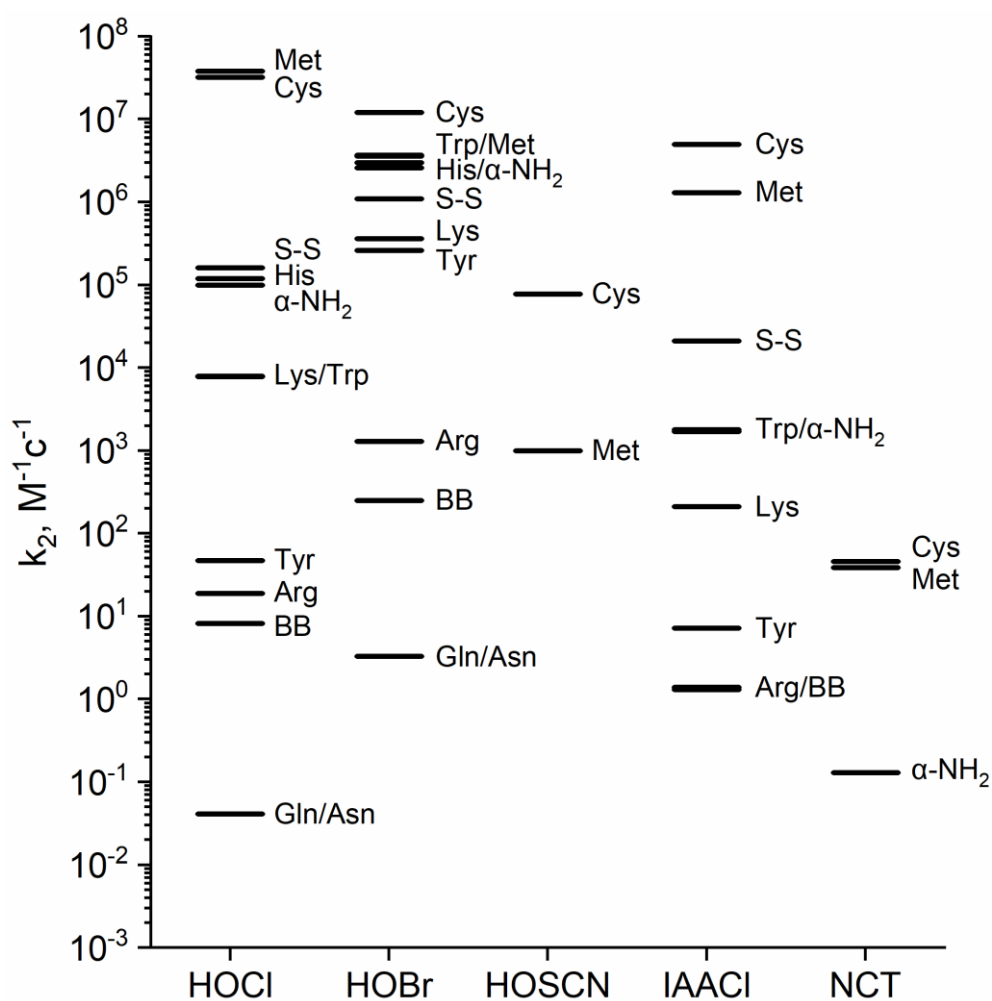
связь в полуацетальную, которая оказывается нестабильной в водных условиях. В конечном итоге, продукт реакции распадается на лизофосфолипид и хлорожирный альдегид [75]. Описанный процесс не только дестабилизирует мембрану, но и привлекает нейтрофилы в регион развивающегося воспаления, поскольку хлорожирные альдегиды являются хемоаттрактантами для иммунных клеток [76]. В случае ароматических соединений HOCl инициирует реакции присоединения-отщепления (Рис. 4Д). Подобные перестройки характерны для боковых цепей триптофана ( $\sim 7.8 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$ ) и тирозина ( $\sim 47 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$ ) [50], а также для ряда азотистых оснований. В то время как моно- и дигалоген производные тирозина по ортоположению демонстрируют относительно высокую стабильность, соответствующий продукт триптофана достаточно быстро гидролизует до 2-гидроксииндольного производного [54,77]. Известно, что защелачивание среды, которое приводит к депротонированию фенолов, способствует увеличению электронной плотности в ароматической системе и, тем самым, повышает реакционную способность остатков тирозина в отношении HOCl [49,78]. К сожалению, крайне мало известно про кинетику формирования таких соединений как 5-хлороцитозин and 5-хлоро(2'-деокси)цитидин, 5-хлороурацил, 8-хлороаденин, 8-хлоро(2'-деокси)аденозин и 8-хлоро(2'-деокси)гуанозин, хотя некоторые из них были обнаружены в образцах тканей, подверженных воспалению *in vivo* [49].

Как уже было сказано выше, взаимодействие HOCl с N-содержащими молекулами генерирует хлорамины/хлорамиды, которые сохраняют окислительный потенциал и могут участвовать в дальнейших редокс-процессах. При обсуждении их кинетических свойств следует выделить несколько основных трендов. Во-первых, ароматические хлорамины, например, хлорамины имидазола и производных гистидина, оказываются значительно более реакционноспособными, нежели хлорированные производные аминокислот. Так, соединения первого класса обычно демонстрируют значения констант скоростей всего в 5-10 раз меньшие, нежели HOCl [79]. В то же самое время, хлорамины таурина, глицина и N- $\alpha$ -ацетил-лизина взаимодействуют с S-содержащими группами примерно на пять порядков медленнее, чем гипохлорит [52]. Схожая ситуация может быть обнаружена при кинетическом сравнении экзо- и эндоциклических производных азотистых оснований [63,80,81]. Во-вторых, как для хлораминов, так и для хлорамидов показана повышенная селективность в отношении тиолов. Например, в случае хлоротаурина (NCT) соответствующие константы скоростей реакций с цистеином и метионином составляют  $\sim 205 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$  и  $\sim 39 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$  [52]. Для хлорамидов обсуждаемый разрыв оказывается еще более выраженным [80]. Таким образом, предполагают, что по сравнению с HOCl эти

агенты приводят к более точечному выключению тиол-содержащих ферментов в условиях клеток. Кроме того, реакции хлораминов в существенной мере зависят как от конкретного строения молекулы, так и от эффектов, связанных с микроокружением мишени. В частности, скорость модификаций SH-групп растет по мере падения значений их  $pK_a$ , отражающих нуклеофильную силу атома серы [52]. При этом наличие отрицательного заряда в непосредственной близости к N-Cl связи снижает реакционную способность окислителей, поскольку препятствует их сближению с тиолят-анионами. Так, кинетические параметры падают в ряду гистамин > N- $\alpha$ -ацетил-лизин > глицин > таурин [82]. Для хлораминов зарегистрировано явление переноса атома хлора на другие азотсодержащие вещества, которое приводит к получению равновесных смесей с преобладанием наиболее стабильных продуктов. Однако, данные реакции протекают достаточно медленно и едва ли имеют большое значение в физиологических условиях [83]. Наконец, современные данные предполагают, что хлорамины выступают важными медиаторами хлорирования остатков тирозина [84]. Впрочем, следует помнить, что интенсивность этого процесса в существенной мере зависит от природы окислителя. Так, хлорамины имидазола приводят к 95% включению атомов хлора в состав N-ацетилтирозина, в то время как менее активные агенты дают выход не превышающий 10-40%, что отражает не только их сниженную реакционную способность, но и существование альтернативных механизмов разрушения исходного вещества [79,85]. Вообще, многие клетки животных накапливают достаточно высокие концентрации низкомолекулярных азотсодержащих молекул. В качестве примеров можно упомянуть таурин, присутствующий в нейтрофилах [86], гистамин из тучных клеток [87] и карнозин, встречающийся в поперечнополосатых мышцах [88]. Учитывая тот факт, что хлорамины, в целом, являются менее интенсивными окислителями, нежели HOCl, хочется предполагать, что подобное явление представляет собой часть антиоксидантной защиты организма, увеличивающей устойчивость тканей к гипохлоритному стрессу. Впрочем, нельзя исключать, что в некоторых ситуациях повышенная селективность обсуждаемых агентов, напротив, оказывает неблагоприятные эффекты, поскольку инактивирует ключевые мишени, критичные для нормального метаболизма.

К сожалению, кинетические свойства других (псевдо)гипогалогенных кислот, NOBr и NOSCN, охарактеризованы значительно хуже (**Рис. 5**). Реакционные профили NOBr и химическая природа соответствующих продуктов в общих чертах повторяют аналогичные параметры HOCl. Однако, главное различие состоит в том, что данный окислитель демонстрирует существенно сниженную селективность. Так, взаимодействие

НОBr с остатками цистеинов и метионинов происходит примерно на один порядок медленнее, чем в случае HOCl [89]. В то же самое время, реакции с азотсодержащими центрами как правило ускоряются в 20-100 раз [89]. Наибольшую силу обсуждаемый эффект достигает в отношении остатков триптофана и тирозина, для которых может быть обнаружен рост кинетических констант на два и три порядка, соответственно [89]. Таким образом, ароматические аминокислоты, по всей видимости, являются одними из важнейших мишеней НОВr в условиях живой клетки, и сопоставление концентраций хлоро- и бром-тирозина с целью сравнения выраженности гипохлоритного и гипобромитного стрессов бессмысленно. В целом, реакционная способность НОВr в



**Рисунок 5.** Кинетические параметры взаимодействия некоторых активных форм (псевдо)галогенов с компонентами белков. IAACl – хлорамин имидазол-4-уксусной кислоты, модельное соединение хлорамина гистидина. NCT – N-хлоротаурин. S-S – модельные аналоги цистина. BB – соединения с пептидной связью, остов белка.  $\alpha$ -NH<sub>2</sub> –  $\alpha$ -аминогруппа аминокислот. Трехбуквенные обозначения аминокислот соответствуют взаимодействию окислителей с их боковыми цепями.

отношении пептидов падает в следующем ряду: Cys > Trp ~ Met ~ His ~  $\alpha$ -аминогруппа > цистин > Lys ~ Tyr >> Arg > пептидная связь > Gln ~ Asn [49]. Наиболее благоприятными мишенями HOCl выступают тиолы ( $10^3$ - $10^5$  M<sup>-1</sup> c<sup>-1</sup>) [90,91] и селенолы ( $\sim 10^6$  M<sup>-1</sup> c<sup>-1</sup>) [92], при этом скорость взаимодействия зависит от рK<sub>a</sub> субстрата [90,91]. Интересно, что, в то время как связи S-Cl подвержены быстрому гидролизу, соответствующие HOCl-опосредованные модификации (-S-SCN) могут сохраняться в течение минут и даже часов [93,94]. Оценка кинетических параметров реакции между HOCl и метионином свидетельствует о верхнем пределе, не превышающем  $10^3$  M<sup>-1</sup> c<sup>-1</sup> [91]. Азотсодержащие вещества не рассматривают в качестве физиологически значимых мишеней обсуждаемого окислителя, хотя некоторые работы предполагают возможность формирования -N-SCN производных [95]. Наконец, для системы ЛПО/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/SCN<sup>-</sup> описано взаимодействие с ароматическими остатками (тирозин и триптофан), которое, однако, происходит лишь в условиях, когда остальные субстраты оказываются недоступными [96,97]. Экспериментальные данные свидетельствуют, что в этом случае источником модификаций может выступать (SCN)<sub>2</sub>, образующийся под действием фермента [97].

При завершении текущего раздела следует поднять важный вопрос – какую информацию мы можем извлечь из реакционных профилей (псевдо)гипогалогенных кислот в отношении их способности влиять на метаболизм клетки? Очевидно, что данные агенты модифицируют белки и, тем самым, напрямую модулируют их функционирование. Ферменты, содержащие активные тиоловые группы (например, глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа и альдегиддегидрогеназа) инактивируются уже эквимольными концентрациями окислителя. Эксперименты с участием альдолазы свидетельствуют, что при снижении реакционной способности остатков цистеина, требуются несколько большие количества агента [72]. В других работах показано, что HOCl-опосредованные модификации фибронектина [98] и коллагена [99] изменяют их пространственную структуру, что выражается в росте чувствительности к протеолизу. Дальнейшее увеличение концентрации гипогалогенных кислот приводит к формированию белковых агрегатов, которые не могут быть полностью разрушены воздействием восстанавливающих агентов [98,100]. Таким образом, предполагают, что данные сшивки представлены не только дисульфидными связями, но и димерами остатков тирозина, а также основаниями Шиффа, возникающими в результате повреждения лизина и гистидина [56,57,98,100–102]. Наконец, критический избыток HOCl запускает фрагментацию полипептидного остова. Интересно, что разные белки демонстрируют неодинаковую чувствительность к подобному повреждению. Например, для

фибронектина обсуждаемое явление запускается при молярном соотношении полипептид/окислитель 40-90 раз [98], а для IgM – около 800 раз [103]. Считается, что зарегистрированная разница связана с долей аминокислот в первичной структуре, способных вытравливать НОС1. Так, модификация остатков лизина в бычьем сывороточном альбумине увеличивает его склонность к фрагментации, поскольку возрастает вероятность взаимодействия окислителя с пептидной связью [69]. Впрочем, при длительной инкубации эффект оказывается противоположным. По всей видимости, N-центрированные радикалы, образующиеся на боковых группах остатков лизина, могут мигрировать на  $\alpha$ -атомы углерода, где они испытывают резонансную стабилизацию [69]. В дальнейшем, подобные интермедиаты запускают возникновение разрывов. Однако, стоит четко осознавать, что, вопреки расхожему мнению, *in vivo* метаболизм (псевдо)гипогалогенных кислот не сводится к простому повреждению клеточных компонентов. Среди множества биомолекул, одновременно присутствующих в живых клетках, встречаются как менее, так и более благоприятные мишени. Таким образом, (псевдо)гипогалогенный стресс, очевидно, запускает достаточно селективные перестройки биохимических процессов. Кроме того, (псевдо)гипогалогенные кислоты активно взаимодействуют с (псевдо)галогенид-анионами, что приводит к их взаимной конверсии и формированию сложных популяций [104,105]. В следующем разделе Обзора литературы мы попытаемся обобщить информацию по данному вопросу, доступную на текущий момент.

#### *1.1.2. Молекулярные механизмы воздействия (псевдо)гипогалогенных кислот на клетки.*

Повышенный интерес к изучению метаболизма (псевдо)гипогалогенных кислот связан с тем фактом, что за последние десятилетия накоплено огромное количество экспериментальных данных, убедительно свидетельствующих о ключевой роли обсуждаемых окислителей в патогенезе социально-значимых заболеваний. Некоторые, наиболее исследованные, примеры включают в себя атеросклероз [106], коронарные синдромы [107], болезни Альцгеймера [108] и Паркинсона [109], инфаркт миокарда [110], инсульт головного мозга [111], ревматоидный артрит [112], астму [113], хроническую обструктивную болезнь легких [114], а также определенные виды рака [115]. Данное обстоятельство бросает вызов научному сообществу, ответом на который становится попытка разработать селективные ингибиторы МПО, которые бы обладали удовлетворительными фармакокинетикой и фармакодинамикой для использования в

терапевтической практике. В рамках предварительных исследований тиоксантин-2 [116], PF-1355 [117] и INV315 [118] продемонстрировали обещающие результаты в отношении хронической обструктивной болезни легких, васкулита/гломерулонефрита, а также атеросклероза. На текущий момент AZD4831 проходит вторую фазу клинических испытаний, целью которой является проверка его способности улучшать гемодинамику у пациентов с сердечной недостаточностью [119]. Однако, стоит четко осознавать, что рациональная разработка методов лечения заболеваний, сопровождающихся (псевдо)гипогалогенным стрессом, невозможна без понимания молекулярных механизмов, посредством которых HOCl и родственные соединения влияют на ткани организма. К сожалению, современные представления об этом вопросе все еще достаточно скудны.

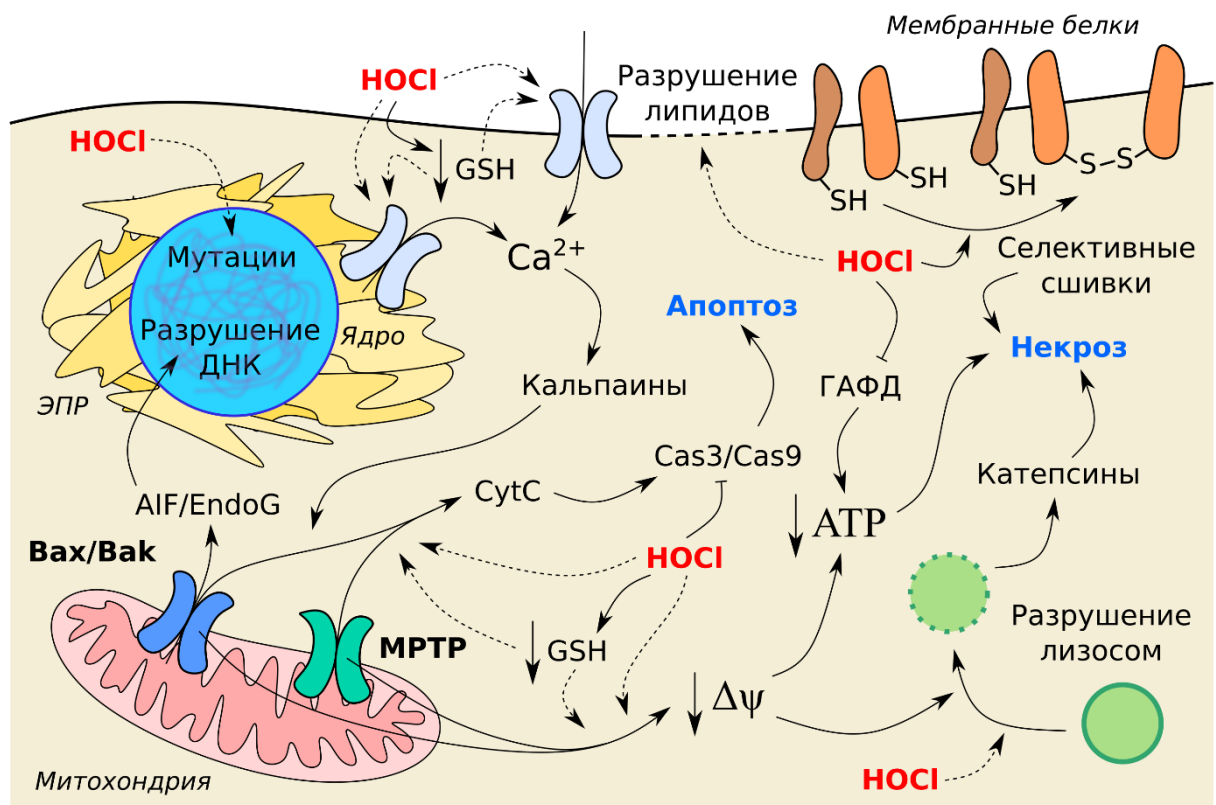
Результатом первых работ по изучению химических свойств HOCl в биологическом контексте стало формирование во многом ложной картины, согласно которой, будучи мощным окислителем, гипохлорит вызывает масштабные неселективные повреждения компонентов клеток. В частности, по сравнению с большинством других редокс-активных молекул лишь HOCl приводит к выраженной денатурации белков [120]. Однако, дальнейшие эксперименты однозначно опровергли данную гипотезу, поскольку было показано, что в зависимости от используемой концентрации гипохлорит способен индуцировать как апоптоз-подобные, так и некроз-подобные сценарии гибели [121–123]. Более того, низкие количества агента приводят к аресту клеточного цикла с сохранением жизнеспособности культуры [121]. Очевидно, что ингибирование пролиферации и апоптоз представляют собой специализированные метаболические программы, поэтому полученные эмпирические данные должны быть проинтерпретированы как свидетельства в пользу существования сигнальной роли активных форм хлора. Впрочем, даже некротическая гибель клеток под действием гипогалогенных кислот не является результатом «неспецифического окисления». Известно, что по сравнению с HOCl, HOBr гораздо легче приводит к лизису клеточной мембраны [124]. Данное свойство не может быть связано с общей силой редокс-стресса, поскольку оба агента вызывают сравнимое по силе падение клеточного пула тиолов [124]. Несмотря на то, что в кинетических тестах HOBr активнее взаимодействует с двойными связями жирных кислот, это также не является удовлетворительным объяснением наблюдений. Дело в том, что выраженный лизис клеток происходит уже при таких концентрациях веществ, при которых процент модифицированных липидов все еще достаточно мал [124]. В целом, имеющиеся данные предполагают, что по сравнению с HOCl, HOBr более селективно повреждает

определенные белковые компоненты мембран, что приводит к нарушению целостности бислоя и дезорганизации локального цитоскелета.

Характерной чертой гипохлоритного стресса является выраженное нарушение энергетического метаболизма клеток. Так, во многих работах авторы наблюдали существенное падение уровня АТФ, вызванное добавкой окислителя [125–129]. Однако, остается не до конца понятным, какие именно факторы вносят основной вклад в обсуждаемый феномен. С одной стороны,  $\text{HOCl}$  ингибирует поступление питательных веществ в цитозоль путем инактивации мембранных переносчиков глюкозы и аминокислот [125]. С механистической точки зрения в основе данного эффекта может лежать как прямое взаимодействие окислителя с транспортными белками, так и опосредованная коммуникация через нарушение ионных градиентов, формируемых  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ - и  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФазами [125]. С другой стороны, некоторые ферменты, содержащие ключевые остатки цистеина в активных центрах, выступают благоприятными мишенями гипохлорита [126]. В частности, к ним относятся глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа и креатинкиназа, метаболические функции которых имеют прямое отношение к поддержанию энергетического статуса клетки. Несмотря на то, что в условиях *in vitro* обсуждаемые белки реагирует с  $\text{HOCl}$  при прямом контакте [130], сложный состав клеточной среды неизбежно влечет за собой вопрос о том, насколько подобные редукционистские эксперименты отражают физиологические события. Высокая реакционная способность гипохлорита очевидно препятствует его миграции в глубокие регионы клетки. При этом, по сравнению с  $\text{H}_2\text{O}_2$ ,  $\text{HOCl}$  вызывает катастрофическое падение концентрации свободных тиолов – не только в составе  $\text{GSH}$ , но и в составе полипептидов [124–129, 131–133]. Механизм обсуждаемых редокс-перестроек неизвестен: являются ли они результатом актов прямого окисления субстратов активными формами хлора, или же они возникают в ходе распространения «окислительной волны», продвигающейся от участков плазматической мембраны через реакции тиол-дисульфидного обмена? Наконец, клеточные модели свидетельствуют о том, что почти все гипохлорит-специфичные процессы так или иначе нарушают метаболизм митохондрий. В случае раковых клеток, принадлежащих линиям HT-29, Panc-01 и SK-OV-3, именно  $\text{HOCl}$  вызывала окислительный стресс в данных органеллах, в то время как  $\text{H}_2\text{O}_2$  и пероксинитрит не воспроизводили подобный эффект [134]. Схожие наблюдения были получены при сравнительном изучении влияния различных окислителей на электрохимический потенциал ( $\Delta\psi$ ) митохондрий как в изолированном состоянии, так и в контексте цитоплазмы кардиомиоцитов [135]. В целом, гипохлорит-

опосредованное падение  $\Delta\psi$  сопровождается выраженным набуханием митохондрий, а также критическим нарушением целостности их мембран.

На текущий момент в литературе описаны как минимум три основных сценария программируемой клеточной гибели в ответ на воздействие  $\text{HOCl}$  (Рис. 6). В первом случае, характерном для гепатоцеллюлярной карциномы HepG2 и фетальных клеток печени человека, гипохлорит активирует белки митохондриальной поры (Mitochondrial Permeability Transition Pore, MPTP), что приводит к формированию канала, обеспечивающего выход цитохрома с и последующую активацию каспаза-зависимого апоптоза [128]. Данный результат может быть подтвержден тем фактом, что предварительная обработка культуры ингибиторами MPTP (циклоспорин А, Бонгкрековая кислота) и каспаз (Ac-DEVD-CHO, ZVAD-FMK) значительно увеличивает выживаемость. Известно, что транслокатор адениновых нуклеотидов, являющийся одним из ключевых компонентов митохондриальной поры, содержит несколько редокс-активных цистеинов



**Рисунок 6.** Обобщенная схема влияния  $\text{HOCl}$  на живые клетки. ЭПР – эндоплазматический ретикулум. GSH – глутатион. MPTP – комплекс белков митохондриальной поры. AIF – апоптоз-индуцирующий фактор. CytC – цитохром с. ГаФД – глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа. EndoG – эндонуклеаза G.  $\Delta\psi$  – электрохимический потенциал митохондрий. Пунктирные стрелки отображают предполагаемые связи между молекулярными событиями. Пояснения в тексте.



(Cys56, Cys159 и Cys256), которые обеспечивают его регуляцию [136–138]. В этом свете, кажется привлекательной гипотеза, согласно которой HOCl взаимодействует с перечисленными остатками напрямую. Однако, следует помнить, что активность МРТР зависит от состояния пулов GSH, тиоредоксинов и NAD(P)H [136,139], которые также изменяются под действием активных форм хлора. Более того, гипогалогенный стресс усиливает перекисное окисление липидов, при этом его продукты, такие как 4-гидроксиноненаль и малоновый диальдегид, служат индукторами МРТР [140–142]. Таким образом, остается неясным, как именно HOCl вызывает перечисленные события с молекулярной точки зрения.

Второй сценарий был зарегистрирован при изучении биохимических эффектов активных форм хлора на культуре мезенхимальных стволовых клеток [143]. В данном случае обработка HOCl приводила к каспаза-независимой гибели, о чем свидетельствовали несколько параллельных контролей (применение селективных ингибиторов, использование флуорогенных субстратов, а также результаты Вестерн-блоттинга). При помощи стауроспорина авторы смогли продемонстрировать, что в их модели низкие концентрации гипохлорита ингибируют каспазы по редокс-зависимому механизму [143]. Ключевым фактором, запускающим апоптоз, оказалась активация Bax, происходящая в ответ на окисление и направляющая его из цитозоля в митохондриальную мембрану. Образующийся канал обеспечивал выход апоптоз-индуцирующего фактора (Apoptosis Inducing Factor, AIF) и эндонуклеазы G, которые отвечали за дальнейшее развитие сигнальной программы. В том случае, если экспрессию Bax подавляли при помощи РНК-интерференции, клетки приобретали повышенную устойчивость к HOCl, и, кроме того, окислитель вызывал меньшее падение  $\Delta\psi$  [143]. Поскольку мезенхимальные стволовые клетки содержат более низкие количества GSH, нежели клетки печени (разница составляет примерно два раза) [143], можно предположить, что в предыдущем примере [128] системе хватало антиоксидантной емкости для поддержания каспаз в функциональном состоянии. Таким образом, это позволяло данным белкам вносить существенный вклад в определение механизма клеточной гибели. Представленную гипотезу поддерживает тот факт, что воздействие Ac-DEVD-CHO и ZVAD-FMK ингибировало апоптоз не полностью [128] – подобное наблюдение может быть связано с существованием параллельных (дублирующих) путей, отвечающих за инициацию смерти. Вообще, каспазы являются не единственными потенциальными редокс-мишенями HOCl в апоптотической программе. Известно, что взаимодействие Araf-1 и цитохрома c зависит

от пост-трансляционных модификаций остатков лизина в его составе [144]. В другой работе авторы продемонстрировали способность активных форм хлора окислять обсуждаемые аминокислоты [145]. К сожалению, нам неизвестны статьи, которые бы проверяли значимость обсуждаемых реакций в физиологическом контексте.

Уже в ранних исследованиях было показано, что  $\text{HOCl}$  существенно нарушает клеточные градиенты ионов [125], в частности, распространенным эффектом оказывается рост концентрации  $\text{Ca}^{2+}$  в цитозоле [123,129,133]. Эксперименты с использованием низкомолекулярных ингибиторов установили, что в обсуждаемом феномене задействованы как SERCA (sarco/endoplasmic reticulum  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase) [133,146] и рианодиновые рецепторы [123,129], расположенные в мембранах ЭПР, так и каналы L-типа [123,129] из плазмалеммы. Интересно, что SERCA представляет собой один из самых восстановленных белков ЭПР и содержит 20 свободных тиоловых групп, некоторые из которых важны для его регуляции [147,148]. Механизмы редокс-контроля также известны для рианодиновых рецепторов и каналов L-типа [149–151]. В моделях мышечных кортикальных нейронов и человеческих макрофагов, гипохлорит-опосредованный рост цитоплазматического  $\text{Ca}^{2+}$  стимулировал активацию кальпаинов с последующим падением  $\Delta\psi$  за счет открытия МРТР [123,129]. Это событие каким-то образом дестабилизировало лизосомы, и разрушение их мембран влекло за собой высвобождение катепсинов, которые выступали конечными эффекторами клеточной смерти. И хотя опыты с изолированными микросомами подтверждают способность  $\text{HOCl}$  модулировать работу SERCA и рианодиновых рецепторов [147,148,151–154], остается неизвестным, происходит ли прямое взаимодействие между данными белками и окислителем в клеточном контексте. Отметим, что авторы обсуждаемых статей также подтвердили отсутствие вклада каспаз в исследуемые процессы. Помимо уже упомянутых факторов, описанное наблюдение может быть связано со способностью кальпаинов гидролизовать не только сами каспазы [155], но и их вышележащие регуляторы – например, Araf-1 [156].

Следует упомянуть, что гибель грамотрицательных бактерий под действием  $\text{HOCl}$  также является результатом достаточно специфических механизмов. Большая часть работ предполагает, что в данном случае ключевой мишенью агента оказывается внутренняя мембрана клетки [120]. Дело в том, что инактивация цитозольных ферментов, а также интенсивность окисления белков, расположенных во внешней мембране и в периплазматическом пространстве, плохо коррелируют с наступлением смерти. В то же самое время, концентрации  $\text{HOCl}$ , достаточные для нарушения работы АТФ-синтазы и

транспорта веществ через внешнюю мембрану, совпадают с дозами, необходимыми для уничтожения микроорганизмов [120].

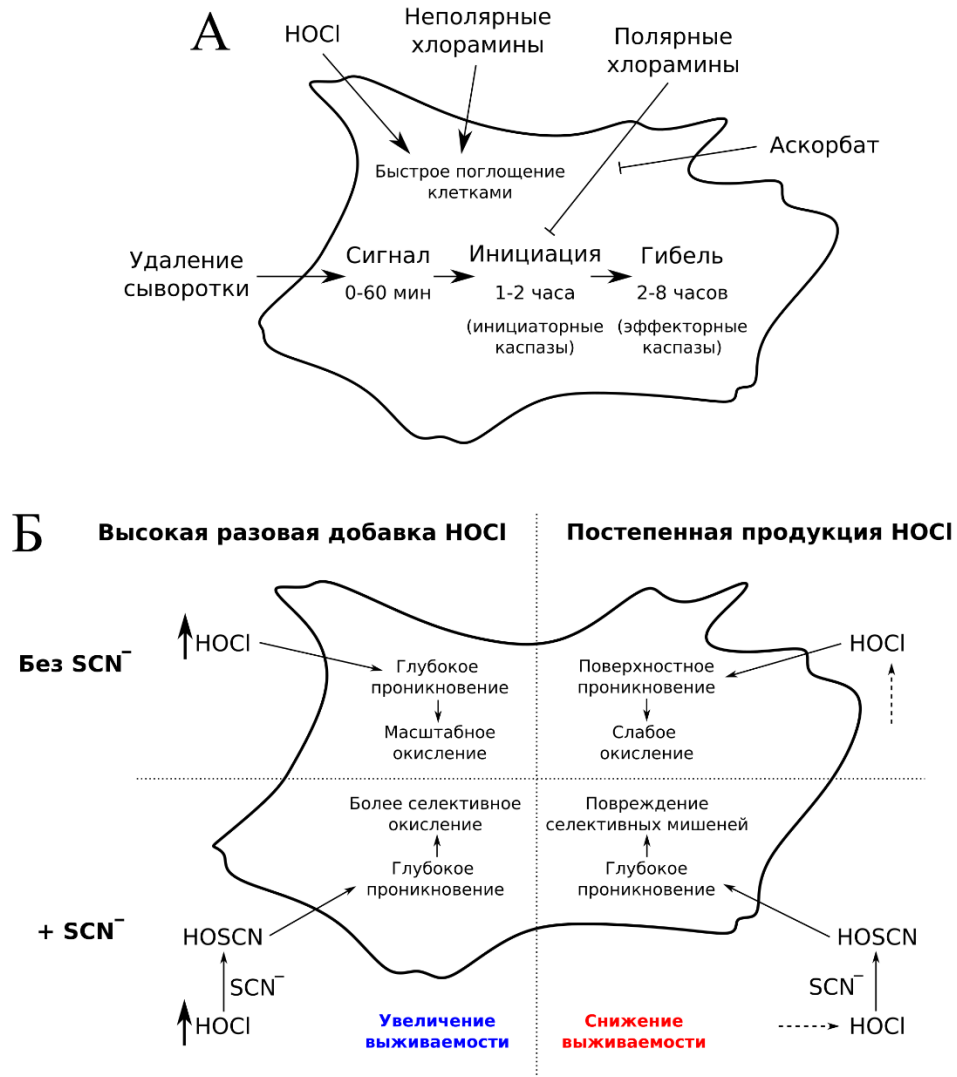
Согласно анализу литературы, на текущий момент наблюдается бурный рост количества статей, убедительно свидетельствующих, что гипохлорит способен играть роль сигнальной молекулы. Показано, что обработка  $\text{HOCl}$  повышает уровень p53 в фибробластах кожи [157], активирует NF- $\kappa$ B в T-лимфоцит подобных клетках [158], запускает синтез про-воспалительных цитокинов (TNF $\alpha$ , MCP1 и про-IL-1 $\beta$ ) в линии J774A.1 [133], являющейся моделью для изучения макрофагов. Авторы последней работы также зарегистрировали усиление экспрессии Nrf2-зависимых генов, участвующих в антиоксидантной защите. Наибольшие изменения в количестве нарабатываемой мРНК были обнаружены в случае TXNIP (thioredoxin interacting protein), HMOX1 (гем-оксигеназа 1), SOD2 (супероксид-дисмутаза 2) и GSTP1 (глутатион-S-трансфераза Pi 1) [133]. Схожие результаты опубликованы и для других макрофаг-подобных, а также эпителиальных клеток [159–161]. Молекулярный механизм обсуждаемых событий связан с окислением редокс-активного остатка цистеина в составе Keap1 [162], что препятствует его взаимодействию с куллином 3 (CUL3) и, тем самым, элиминирует убиквитин-лигазную активность белка [163]. Описанная реакция приводит к уменьшению скорости деградации Nrf2 и усилению транскрипции генов, расположенных под его контролем. Участники MAPK-каскада являются другими известными мишенями  $\text{HOCl}$ , однако, характер эффектов зависит от используемой линии и/или экспериментальных условий. Так, сублетальные концентрации гипохлорита вызывают активацию ERK1/2 и p38, но не JNK, в фибробластах и клетках эндотелия. [164] Поскольку ингибирование данного процесса приводит к снижению выживаемости культуры, можно предположить, что обсуждаемые события лежат в основе адаптивного ответа, направленного на противостояние гипохлоритному стрессу. Показано, что для демонстрации аналогичных эффектов  $\text{H}_2\text{O}_2$  должен быть использован в куда больших количествах [164]. Когда  $\text{HOCl}$  добавляли к линии J774A.1, степень фосфорилирования росла для JNK и p38, при этом в случае ERK1/2 она изменялась в обратном направлении [133]. Таким образом, в современном научном сообществе не возникает сомнений, что гипохлорит не работает как некоторый «общий» и «неселективный» окислитель. Напротив, он воздействует на специфические мишени, расположенные в самых различных органеллах клетки, и тем самым вызывает строго очерченный репертуар метаболических ответов.

К сожалению, гораздо меньше известно про механизмы физиологических эффектов остальных активных форм (псевдо)галогенов. В литературе до сих пор

продолжается дискуссия о способности хлораминов, в частности, NCT, проникать через мембраны клеток. В то время как некоторые авторы детектируют активное поглощение данного агента эритроцитами [165] или же макрофаг-подобной линией RAW 264.7 [166], другие коллективы склонны считать, что он работает путем переноса атома хлора на соединения, которые легче попадают в цитозоль и служат вторичными посредниками стресса [83]. Нам известна одна работа, в рамках которой были исследованы конкретные молекулярные механизмы токсичности NCT [167]. Эксперименты с использованием радиоактивно-меченого окислителя продемонстрировали его накопление в митохондриях клеток линии JLP-119, где он вызывал открытие МРТР с последующим набуханием органелл и потерей  $\Delta\psi$ . Данный эффект был редокс-зависимым, поскольку его сила могла быть снижена путем предварительной обработки культуры восстанавливающими агентами. Конечным итогом описываемых событий выступала каспаза-зависимая клеточная смерть [167]. Следует заметить, что представленные результаты не обязательно доказывают способность NCT проникать в митохондрии. Дело в том, что регистрируемая метка находилась в составе таурина [167], таким образом, авторы могли измерять накопление свободной аминокислоты, образующейся в результате реакций трансгалогенирования. В целом, литературные данные свидетельствуют о том, что по сравнению с HOCl хлорамины являются менее токсичными для клеток и способствуют развитию апоптотической, а не некротической, программы смерти [122,168–170]. Возможно, это лежит в основе определенных механизмов, при помощи которых животные защищают собственные ткани от атаки иммунной системой. Кроме того, нейтрофилы накапливают высокие концентрации таурина [86], и кажется привлекательной гипотеза о том, что он выступает своеобразным цитопротектором, оберегающим их от избыточного повреждения в ходе дыхательного взрыва. Однако, в ряду работ описаны интересные наблюдения, которые подвергают сомнению предложенную картину. В частности, было показано, что замена  $\text{Cl}^-$  на  $\text{Br}^-$  в среде усиливает  $\text{H}_2\text{O}_2$ -индуцированный апоптоз нейтрофил-подобных клеток HL-60 [171]. При этом данный феномен строго зависит от присутствия азот-содержащих веществ во внеклеточном пространстве. Иначе говоря, по всей видимости, в рамках эндогенной модели продукции активных форм галогенов, бромамины оказываются токсичнее, чем HOBr [171]. Другое интересное наблюдение состоит в том, что инкубация клеток с полярными хлораминами (глицин-NHCl и гистамин-NHCl), плохо проникающими через мембраны, ингибирует апоптоз, вызванный элиминацией сыворотки из культуральной жидкости [131]. HOCl и  $\text{NH}_2\text{Cl}$  не просто не оказывают подобный эффект, а, напротив, благоприятствуют наступлению смерти.

Дальнейшие эксперименты показали, что, по сравнению с  $\text{HOCl}$  и  $\text{NH}_2\text{Cl}$ , которые быстро поглощаются клетками, глицин- $\text{NHCl}$  и гистамин- $\text{NHCl}$  присутствуют в среде в течение длительного времени. Это приводит к ингибированию активности каспаз во временном окне 2-4 часа после апоптотического стимула, что может быть нейтрализовано путем обработки образцов аскорбатом [131] (**Рис. 7А**). Поскольку данный агент не оказывал никакого влияния на редокс-статус пула  $\text{GSH}$ , природа обсуждаемого явления, очевидно, связана с окислительным статусом специфических мишеней. Авторы предполагают, что подавление апоптоза может представлять собой еще один механизм токсичности активных форм хлора – например, в модели атеросклероза подобные процессы будут препятствовать обновлению поврежденного эндотелия [131]. Схожим образом добавление МПО к системе, состоящей из глюкозы, оксидазы глюкозы и  $\text{Cl}^-$ , которое обеспечивает непрерывную и медленную продукцию  $\text{HOCl}$ , ингибирует клеточную гибель макрофаг-подобной линии J774A.1 [172].

Согласно имеющимся данным, биологические эффекты  $\text{HOscN}$  также во многом связаны с нарушением митохондриального метаболизма. Обработка клеток данным окислителем приводит к образованию сульфеновых кислот в составе белков матрикса, ингибирует дыхательную цепь, а также активирует МРTP-опосредованное падение  $\Delta\psi$  с последующим выходом цитохрома  $c$ , AIF и эндонуклеазы G в цитозоль [132,173,174]. В большинстве случаев исследователи регистрируют подавление работы каспаз [132,174]. При этом, по сравнению с  $\text{HOCl}$ ,  $\text{HOscN}$  не склонна вызывать сдвиги в клеточной концентрации  $\text{Ca}^{2+}$  [133,173]. Традиционная точка зрения состоит в том, что обсуждаемый агент является менее токсичным, нежели гипогалогенные кислоты, поскольку внесение  $\text{SCN}^-$  в клеточные модели как правило увеличивает жизнеспособность культуры, а также снижает вероятность наступления некроза [132,133,171]. Аналогичные эффекты могут быть обнаружены и в условиях *in vivo*. Например, добавление  $\text{SCN}^-$  в питьевую воду, улучшало клиническую картину мышей, подверженных атеросклерозу за счет экспрессии человеческой МПО [175,176]. Существует несколько возможных объяснений наблюдаемых различий. Во-первых, биохимические события, индуцируемые  $\text{HOscN}$ , характеризуются большей обратимостью – это касается и окисления пула  $\text{GSH}$ , и активации участников MAPK-каскадов [133]. Во-вторых, предполагают, что эукариотическая тиоредоксин-редуктаза служит специфической системой по нейтрализации гипотиоцианата [177]. Замена остатка селеноцистеина на остаток цистеина в ее составе приводит к тому, что фермент теряет способность разрушать  $\text{HOscN}$ ,



**Рисунок 7.** Некоторые сравнительные аспекты клеточных эффектов различных активных форм (псевдо)галогенов. **(А)** По сравнению с НОСІ и неполярными хлораминами, полярные хлорамины проникают в клетки достаточно медленно, что увеличивает их время жизни в среде и позволяет им инактивировать белки, участвующие в инициации апоптоза. **(Б)** В зависимости от режима продукции НОСІ добавление  $SCN^-$  в систему может как увеличивать, так и уменьшать выживаемость культуры. Пояснения в тексте.

поскольку испытывает окислительное ингибирование. Схожим образом, обработка клеточных культур ауранофином снижает их устойчивость к обсуждаемому веществу. Интересно, что тиоредоксин-редуктазы бактерий в принципе не содержат селеноцистеина [178] и не обладают описанными свойствами. Впрочем, в последние годы появляется все больше сообщений, которые подвергают сомнению описанные выше взгляды [172,174]. Расхождения в получаемых результатах могут быть отчасти связаны с разницей в экспериментальных условиях. Дело в том, что в то время, как одни авторы используют

минимальные среды, которые не способны реагировать с HO<sub>2</sub>SCN, другие коллективы проводят эксперименты в присутствии нуклеофильных агентов, вытитровывающих окислители. Другим важным фактором является режим генерации активного вещества. Например, в условиях медленной продукции HOCl, данное соединение скорее всего не сможет проникать в глубокие регионы клеток, и его эффекты будут ограничены областью плазмалеммы. Однако, при наличии свободных ионов SCN<sup>-</sup>, оно будет конвертироваться в более стабильный гипотиоционат, который обладает повышенной селективностью и способностью инактивировать специфические мишени в цитоплазме [172] (**Рис. 7Б**). Стоит также учитывать молярное соотношение между HOCl и SCN<sup>-</sup>. В случае недостатка последнего возможно его переокисление с образованием HO<sub>2</sub>SCN [179]. И хотя кинетические профили этого вещества не были охарактеризованы детально, предполагают, что оно демонстрирует сниженную реакционную способность и токсичность.

На настоящий момент основным препятствием, затрудняющим формирование полноценной картины сравнительной биохимии (псевдо)гипогалогенных кислот и их производных, является отсутствие надежной аналитической техники, которая бы позволяла регистрировать данные соединения на субклеточном уровне в режиме реального времени. В следующем разделе Обзора литературы мы рассмотрим основные методы, которые используются в современных исследованиях, а также обсудим перспективы по их совершенствованию.

### *1.1.3. Методы регистрации (псевдо)гипогалогенных кислот в системах различного уровня сложности.*

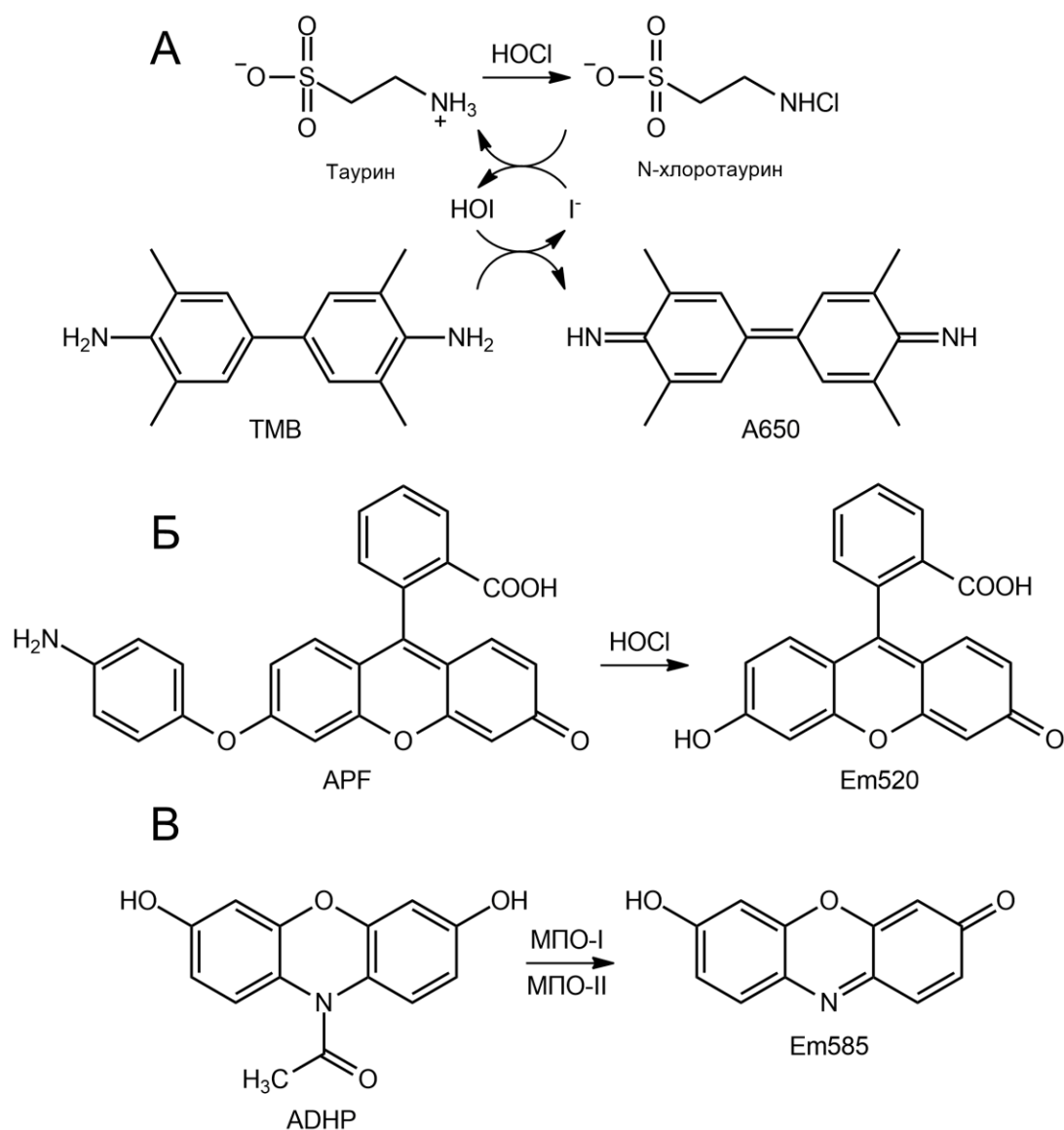
Количественное измерение концентрации (псевдо)гипогалогенных кислот в клетках и тканях представляет собой существенный вызов для аналитической биохимии, поскольку, как мы обсуждали ранее, данные агенты обладают крайне высокой реакционной способностью и из-за этого демонстрируют малые времена жизни в сложных биологических контекстах. Большинство традиционных подходов исходят из предположения, что количество МПО так или иначе отражает активность фермента в образце, поэтому они базируются на оценке этого параметра в *in vitro* системах. К текущему времени наибольшую популярность приобрели оптические методы с использованием низкомолекулярных веществ, которые либо являются мишенями активных форм галогенов, либо же выступают прямыми субстратами МПО в пероксидазном цикле.

Одна из самых распространенных техник заключается в конверсии  $\text{HOCl}$ , возникающей в ходе окисления хлорид-анионов пероксидом водорода в активном центре белка, в NCT, который при содержании на льду сохраняется в течение нескольких часов. В дальнейшем, концентрацию полученного NCT оценивают при помощи 3,3',5,5'-тетраметилбензидина (ТМВ) в реакции, катализируемой ионами йода [180] (**Рис. 8А**). Общая логика процесса состоит в том, что галамины превращают  $\text{I}^-$  в  $\text{HOI}$ , которая затем окисляет ТМВ до голубого продукта. В том случае, если исследователи хотят оценить бромлирующую активность МПО или же другого родственного фермента, необходимость использовать йодид-анионы отсутствует, поскольку бромамины способны взаимодействовать с ТМВ напрямую [26]. Исторически описанный метод берет свое начало в схожем протоколе, где в качестве соединения-репортера выступал 5-тио-2-нитробензоат (ТНВ) [181]. Однако, данный агент обладает рядом практических неудобств, основным из которых является то, что специфический ответ заключается в падении интенсивности поглощения. Таким образом, исследователям необходимо иметь предварительные оценки концентрации NCT, чтобы попасть в динамический диапазон протокола.

К сожалению, ТМВ не подходит для регистрации активности МПО в режиме реального времени, что значительно увеличивает количество экспериментальных образцов, подлежащих тестированию. С целью преодолеть данную проблему ряд коллективов предложил альтернативные подходы, которые базируются на изменении оптических свойств NADH при его конверсии в галогидрин [182] или же аскорбата при его окислении под действием  $\text{HOCl}$  [183]. Во втором случае следует помнить, что используемый агент способен выступать прямым субстратом МПО, находящейся как в виде Соединения I, так и в виде Соединения II. Варьируя концентрацию хлорид-анионов, возможно добиться ситуации, когда прямая реакция между аскорбатом и Соединением I окажется кинетически неблагоприятной [184]. Однако, в том случае, если протокол задействуют для изучения ингибиторов МПО, запирающих фермент в Соединении II, репортер будет препятствовать снижению видимой активности путем «спасения» белка.

Другой популярный подход основан на регистрации флуоресценции, исходящей от комбинации двух молекул – 2-[6-(4-гидрокси)фенокси-3Н-ксантен-3-он-9-ил]бензойной кислоты (HPF) и 2-[6-(4-амино)фенокси-3Н-ксантен-3-он-9-ил]бензойной кислоты (APF) [185] (**Рис. 8Б**). Несмотря на то, что данные репортеры отвечают на  $\bullet\text{OH}$  и  $\text{ONOO}^-$ , *in vitro* тесты свидетельствуют, что лишь APF чувствительна к  $\text{HOCl}$ . Таким образом, считается,





**Рисунок 8.** Некоторые *in vitro* методы для регистрации концентрации HOCl или активности МПО. (А) Колориметрический метод на основе таурина, ионов йода и тетраметилбензидина (ТМВ). На выходе образуется продукт, демонстрирующий поглощение при длине волны 650 нм. (Б) Флуориметрический метод на основе 2-[6-(4-амино)фенокси-3Н-ксантен-3-он-9-ил]бензойной кислоты (APF). Под действием HOCl данное соединение конвертируется в флуоресцеин, демонстрирующий эмиссию при 520 нм. (В) 10-ацетил-3,7-дигидроксифеноксазин (ADHP) окисляется под действием МПО-I/МПО-II до резорурфина, флуоресцирующего при 585 нм.

что отношение эмиссии APF/HPF может служить относительно надежным маркером продукции активных форм хлора в исследуемой системе.

Большая группа методов, которые нашли широкое применение в лабораторной практике, полагается на регистрацию не галогенирующей, а пероксидазной активности МПО. Чаще всего в качестве хромогенных/флуорогенных субстратов используют о-дианизидин, гваякол или же 10-ацетил-3,7-дигидроксифеноксазин (ADHP/Amplex Red)

(Рис. 8В). По сравнению с первыми двумя вариантами, ADHP менее подвержен окислению атмосферным воздухом, более чувствителен и демонстрирует расширенный динамический диапазон [186,187].

В последние годы приобретает популярность визуализация работы МПО при помощи люминола и родственных ему соединений [188]. Подобные протоколы подразумевают регистрацию хемиллюминесценции, возникающей в результате окисления репортеров. Интересно, что результаты, полученные на клеточных культурах и в *in vivo* моделях, свидетельствуют о том, что в биологическом контексте сигнал люминола зависит от присутствия каталитически активной МПО [189]. Однако, стоит помнить, что в условиях *in vitro* данное соединение способно взаимодействовать с широким спектром АФК, что может служить источником достаточно большого количества артефактов [190,191]. L-012 является аналогом люминола, который обеспечивает более интенсивное свечение и увеличенную чувствительность [192]. Другая стратегия оптимизации основана на внесении в систему молекул, которые служат акцепторами хемиллюминесцентного резонансного переноса энергии и тем самым амплифицируют сигнал [193].

Наконец, некоторые коллективы предлагают использовать электрохимические методы измерения активности МПО или концентрации ее продуктов. В частности, в одной из работ авторы производили оценку количества  $\text{HOCl}$  в воде при помощи платинового электрода [194]. Очевидно, что данный подход обладает низкой селективностью и не может быть применен к сложным биологическим смесям. Другой вариант заключается в непрерывной регистрации концентрации  $\text{H}_2\text{O}_2$ , поглощаемого в ходе миелопероксидазной реакции [195]. Систему дополнительно снабжают метионином, который вытравливает  $\text{HOCl}$ , не давая ей разрушать фермент в ходе нежелательных редокс-процессов. Описанный подход может быть конвертирован в колориметрический протокол, в рамках которого сульфат аммония-железа(II) окисляется под действием  $\text{H}_2\text{O}_2$ , после чего  $\text{Fe}^{3+}$  образует цветной комплекс с ксиленовым оранжевым [196,197]. Его основным недостатком является невозможность наблюдения за изменением состояния системы в режиме реального времени.

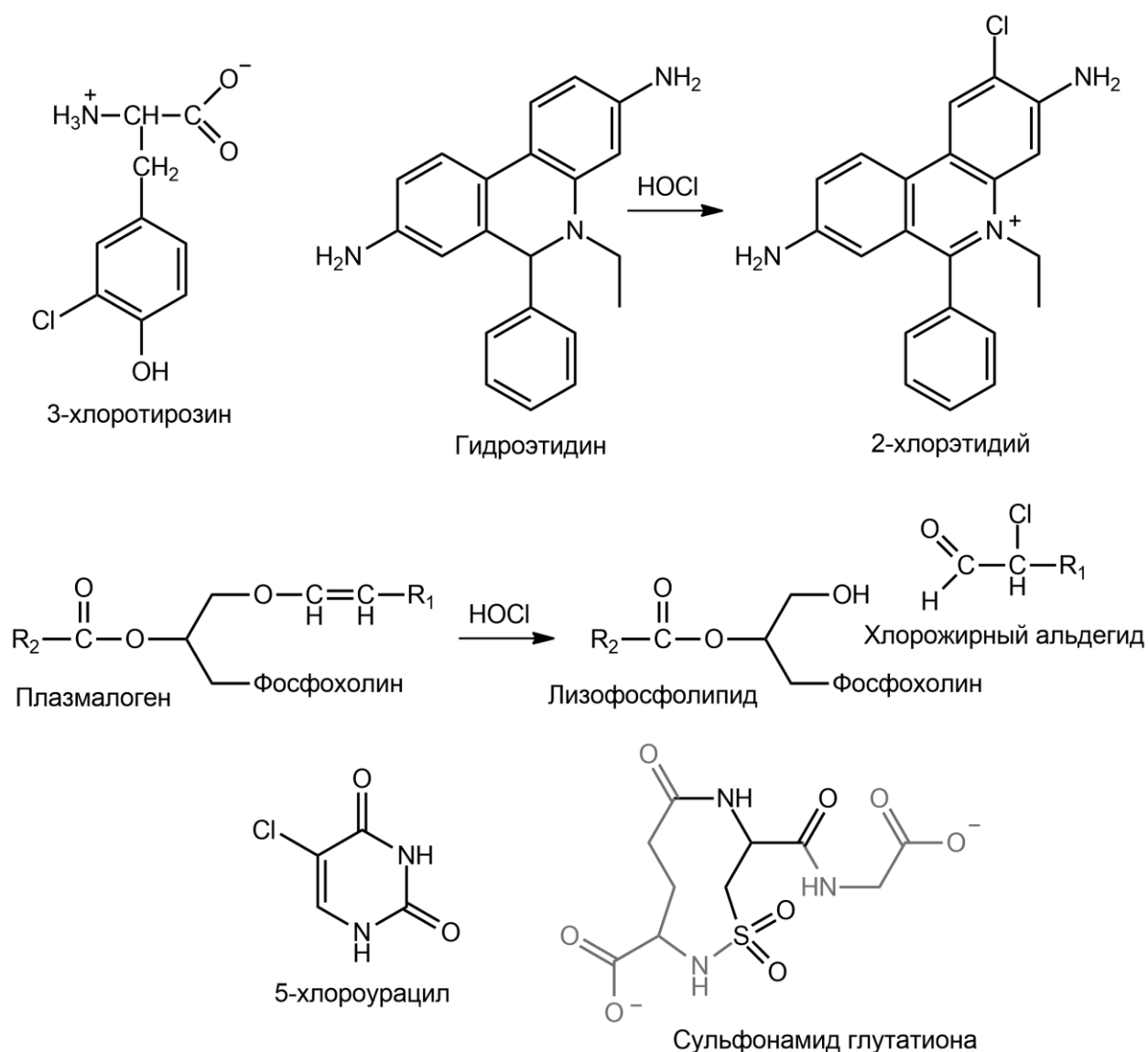
К сожалению, несмотря на разнообразие техник, описанных выше, попытки перенести их на визуализацию (псевдо)гипогалогенного стресса в живых объектах сопряжены с колоссальным количеством трудностей. В 2013 году была опубликована статья, в рамках которой авторы сравнивали наиболее популярные протоколы для измерения активности МПО в биологических образцах [198]. Результаты их работы продемонстрировали, что применение ADHP, люминола и APF/HPF приводит к

получению противоречивых данных, плохо коррелирующих друг с другом. При этом для различных тканей и органов невозможно даже выделить какие-либо четкие тренды [198]. Поскольку тестируемые подходы не подразумевали тщательную очистку анализируемых препаратов, они оказывались загрязнены высокими количествами белков, вносящих множество артефактов измерения. В частности, гемоглобин и миоглобин, широко распространенные в тканях животных, способны проявлять пероксидазную активность [199]. На выходе авторам удавалось «зарегистрировать» работу МПО даже в тех случаях, когда использовали образцы, полученные от животных, которые были нокаутированы по этому ферменту [198]. На основании описанной информации был сделан вывод, что надежное измерение активности МПО возможно лишь в том случае, если протокол содержит стадию очистки при помощи антител. Впрочем, биологическая значимость результатов, получаемых с использованием предложенной модификации, все еще остается предметом оживленной дискуссии. Дело в том, что в физиологических условиях МПО взаимодействует с рядом регуляторов, контролирующих ее работу [184]. Более того, в живых клетках галогенирующий и пероксидазный циклы фермента конкурируют друг с другом – в итоге, белок производит сложную смесь продуктов, среди которых представлены не только (псевдо)гипогалогенные кислоты, но и некоторые активные формы азота и кислорода, а также окисленные органические молекулы [200]. В частности, традиционные методы оказываются неспособными обнаружить ингибирование МПО, вызванное введением в мышей гидразида 4-аминобензойной кислоты (АВАН), в то время как техника для *in vivo* визуализации (обсуждается далее) однозначно свидетельствует о снижении каталитической активности [198]. Аналогичные вопросы возникают и в отношении любых подходов по прямой регистрации МПО, будь то иммуноферментный анализ, гистохимия или же оценка уровня экспрессии гена. Однако, несмотря на всю озвученную критику, они сохраняют свою популярность до сих пор. Например, во многих работах авторы обрабатывают ткани животных смесью  $H_2O_2$  (для конверсии белка в Соединение I) и хромогенного субстрата с целью визуализировать зоны, обогащенные ферментом [9]. В том случае, если из протокола исключают стадию внесения пероксида, считается, что окрашенные регионы соответствуют белку, активному в физиологических условиях [201].

Методологические проблемы, описанные выше, побуждают научное сообщество искать селективные маркеры (псевдо)гипогалогенного стресса, которые свидетельствуют о его силе напрямую, а не полагаются на присутствие МПО в образце. К сожалению, реакционные профили НОС1 и родственных соединений существенно осложняют данную

задачу. Идеальный маркер должен обладать рядом свойств. Во-первых, он возникает исключительно в ответ на активные формы галогенов и обладает достаточной стабильностью для надежной регистрации. Во-вторых, определенные ограничения касаются и кинетических параметров соответствующих реакций, которые должны иметь высокие скорости в живых системах. Результаты математического моделирования предполагают, что в условиях гипохлоритного стресса галамины белков возникают в достаточно больших количествах, однако, они обладают малыми временами жизни, поскольку выступают субстратами клеточных антиоксидантов, либо же гидролизуются до соответствующих карбонильных соединений [202]. За последние десятилетия регистрация остатков хлоротирозина при помощи тандемной хроматографии/масс-спектрометрии стала своеобразным «золотым стандартом» в обсуждаемой сфере [203,204] (**Рис. 9**). В общих чертах протокол метода заключается в следующем. Анализируемый образец разделяют, после чего белковую фракцию подвергают гидролизу при помощи метансульфоновой кислоты. Известно, что использование соляной кислоты или же водного раствора бромоводорода связано с увеличением вероятности возникновения артефактов галогенирования [197]. В пробы также добавляют стабильные изотопы тирозина и хлоротирозина, которые позволяют учесть потерю материала в ходе обработки, а также ионную супрессию при последующей масс-спектрометрии. На текущий момент жидкостная хроматография постепенно вытесняет газовую, поскольку она не требует предварительной дериватизации аминокислот, увеличивающей вероятность искусственного галогенирования [197]. Результаты метода выражают в микромолях хлоротирозина на моли немодифицированной аминокислоты. Также существует надежда, что в ближайшем будущем будут разработаны достаточно селективные антитела, способные визуализировать белки, содержащие НОСІ-индуцированные модификации. Так, неплохие предварительные результаты получены в отношении НОР1 [205].

Описанный подход позволил пролить свет на многие аспекты метаболизма (псевдо)гипогалогенных кислот. В частности, благодаря ему удалось доказать ключевую роль НОСІ в развитии атеросклеротического повреждения сосудов [206], и не возникает сомнений, что он будет широко применяться и далее. Однако, данный метод сложно назвать оптимальным. Дело в том, что живые клетки содержат высокие концентрации нуклеофильных молекул (остатки цистеина, метионина, аминогруппы белков и другие), которые являются кинетически более благоприятными мишенями для НОСІ, нежели



**Рисунок 9.** Некоторые естественные и искусственные маркеры, которые можно использовать для регистрации гипохлоритного стресса в живых системах. Пояснения в тексте.

остатки тирозина [50]. При этом их взаимодействие с окислителем приводит к возникновению неспецифических модификаций, характерных также и для других форм редокс-стресса. Таким образом, сигнал, соответствующий хлоротирозину, теряется на фоне сигнала, исходящего от большого количества немодифицированных остатков, что существенно снижает чувствительность техники. Аккуратный забор образцов исключительно из региона воспаления позволяет отчасти разрешить описанную проблему. Еще одна стратегия заключается в обогащении препаратов тирозин-содержащими фрагментами белков, особенно чувствительными к окислителю [207,208]. Следует также иметь в виду, что хлоротирозины не являются абсолютно стабильными в биологическом контексте и вступают в определенные пути метаболизма, снижающие их концентрацию. В частности, обсуждаемые соединения могут дегалогенироваться или же конвертироваться

в дихлоротирозины, а также в моно- и ди-хлорированные 4-гидроксифенилацетиальдегиды [209–211]. Таким образом, измеряемая концентрация хлоротирозина скорее отражает не интенсивность продукции  $\text{HOCl}$  как таковую, а некоторое равновесное состояние, достигаемое в тканях за счет наложения реакций, которые приводят к синтезу и распаду маркера.

Интересной модификацией метода, позволяющей отчасти избежать описанных сложностей, является использование искусственных меток для последующего масс-спектрометрического анализа [212]. Известно, что в условиях *in vitro*  $\text{HOCl}$ -опосредованное окисление гидроэтидина приводит к получению 2-хлорэтидия, который не возникает в ответ на другие агенты (Рис. 9). При этом экспериментальные результаты конкурентной кинетики с использованием урата свидетельствуют, что константа скорости соответствующей реакции превосходит аналогичный параметр для тирозина примерно на четыре порядка ( $\sim 1.5 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$  против  $\sim 40 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$ ) [213]. Таким образом, скорее всего, гидроэтидин способен эффективно конкурировать с клеточными мишенями за активные формы хлора. Более того, его можно вводить в организм животного в требуемый момент времени, что позволяет осуществлять оценку интегральной продукции  $\text{HOCl}$  в течение периода наблюдения. Впрочем, в будущих исследованиях предстоит установить, существуют ли в живых организмах какие-либо реакции, которые бы приводили к разрушению 2-хлорэтидия. Методологическая ценность описанной техники может быть проиллюстрирована следующим примером. Известно, что по сравнению с иммунными клетками человека, соответствующие клетки мышей содержат значительно меньшие количества МПО (10-20%) [214]. Ряд исследователей предпринимал попытки зарегистрировать остатки хлоротирозина в сосудах животных, страдающих от атеросклероза, однако, они не увенчались успехом. Полученные результаты легли в основу вывода о том, что мыши являются плохой моделью атеросклеротического формирования бляшек, и эмпирические наблюдения, собранные в ходе их изучения, не могут быть транслированы на человека [42]. Однако, в тех случаях, когда животным вводили гидроэтидин в кровь, последующий масс-спектрометрический анализ показал накопление его хлорированного продукта в регионах патологии [212]. Таким образом, новые данные позволяют предположить, что механизм развития атеросклероза у мышей характеризуется наличием тех же самых основных процессов, что и у человека.

В последние годы научные коллективы по всему миру активно пытаются расширить доступную панель маркеров (псевдо)гипогалогенного стресса, раздвинув ее границы за пределы детекции хлоротирозина. Одними из наиболее перспективных

кандидатов являются продукты гипохлорит-опосредованной деградации плазмалогенов – особых липидов, распространенных в мембранах эндотелиальных и гладких мышечных клеток, а также кардиомиоцитов [215]. Суть реакции заключается в присоединении HOCl по двойной связи, прилегающей к атому кислорода, после чего нестабильный интермедиат распадается с образованием хлорожирного альдегида [75] (Рис. 9). В дальнейшем, хлорожирные альдегиды метаболизируются до соответствующих спиртов или карбоновых кислот [216]. Обсуждаемые маркеры были обнаружены как в моделях *in vitro*, так и в очагах патологии *in vivo* [217], и существует надежда, что в будущем они позволят дополнить нашу картину (псевдо)гипогалогенного стресса за счет предоставления ценной информации о редокс-процессах, происходящих в липидной фазе. Несмотря на то, *in vitro* галогенирование азотистых оснований ДНК является хорошо охарактеризованной реакцией [218], и 5-хлороурацил (Рис. 9) может быть найден в регионах воспаления [219], считается, что в биологическом контексте эти процессы играют минорную роль [220]. На текущий момент соединения данного класса не рассматривают в качестве перспективных маркеров (псевдо)гипогалогенного стресса.

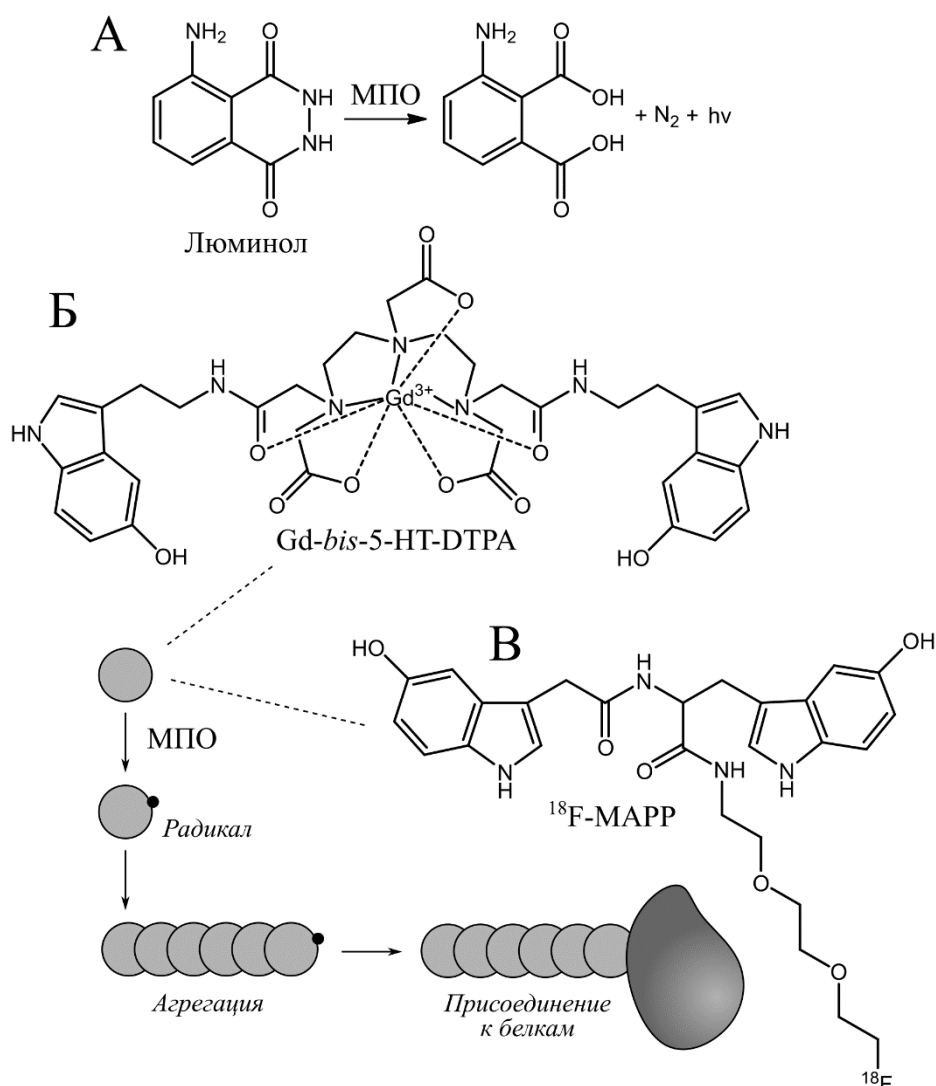
Интересно, что некоторые окислительные реакции с участием HOCl приводят к образованию относительно специфических продуктов. В частности, галогенированные остатки цистеина могут быть атакованы атомами азота, входящими в состав аминогрупп, с возникновением сульфенамидных связей [56]. Далее, обсуждаемые соединения вступают в более глубокие реакции окисления, завершающиеся формированием сульфинамидов и сульфонамидов. Экспериментальные данные свидетельствуют, что циклический сульфонамид глутатиона [58] может служить надежным маркером гипохлоритного стресса, поскольку подавляющая часть других окислителей почти не приводит к его синтезу (Рис. 9). NO<sub>2</sub> и пероксинитрит представляют собой два известных исключения, однако, их способность генерировать обсуждаемое вещество достаточно ограничена [221]. Известно, что концентрация глутатиона в жидкости, омывающей эпителиальные клетки легких, достигает 400 мкМ [222]. Таким образом, предполагают, что при развитии воспалительных процессов в дыхательной системе, он является одной из основных мишеней гипогалогенных кислот, выделяемых активированными клетками иммунной системы. Неудивительно, что большая часть работ, изучавших продукцию сульфонамида глутатиона так или иначе касалась респираторных заболеваний [223–226]. В частности, было показано, что по сравнению с концентрацией хлоротирозина и активностью МПО, уровень данного маркера лучше коррелировал с интенсивностью бактериального роста при инфекции [223].

Масс-спектрометрические подходы, описанные выше, могут быть легко масштабированы, что позволяет исследовать большое количество образцов, полученных от разных организмов или в различных условиях. Это оказывается полезным для оценки зависимости степени (псевдо)гипогалогенного стресса от генетического контекста или же приема потенциальных терапевтических препаратов. Однако, данные методики обладают существенным недостатком, а именно – они не способны регистрировать быструю динамику аналитов *in vivo* в режиме реального времени. На текущий момент в литературе описано несколько техник, так или иначе преодолевающих указанную проблему. Одна из них основана на введении в животное люминола, который испускает кванты света исключительно в присутствии активной МПО [189] (Рис. 10А). При помощи предложенного метода, авторам работы удалось визуализировать воспалительные процессы в модели острого дерматита мышей, а также в регионах, соответствующих опухолям, обогащенным нейтрофилами. Несмотря на кажущуюся простоту протокола, мы считаем, что к результатам, полученным в ходе его применения, стоит относиться с осторожностью. Дело в том, что селективность люминола была подтверждена исключительно косвенными методами. В частности, внесение АВАН в систему снижало сигнал, приходящий от образца. Аналогичный эффект мог быть достигнут путем использования материала от животных, нокаутированных по гену МПО [189]. Однако, следует четко осознавать, что эти факты не доказывают специфичность пробы в отношении (псевдо)гипогалогенных кислот. Нельзя исключать вероятность, что люминол выступает прямым субстратом пероксидазного цикла фермента. Интересно, что при тестировании агента в реакции гиперчувствительности *Mpo*<sup>-/-</sup> мышей, авторам не удалось зарегистрировать увеличение интенсивности хемилюминисцентного сигнала, несмотря на приход эозинофилов в очаг патологии [189]. В обсуждении результатов коллектив предлагает две возможных интерпретации данного феномена. Первое объяснение состоит в предположении, что люминол способен окисляться исключительно под действием НОСl, но не НОВr и не НОSCN. Эта гипотеза не кажется нам убедительной, поскольку в физиологическом контексте гемовые пероксидазы млекопитающих производят сложную смесь (псевдо)гипогалогенных кислот [27], которые, к тому же, неферментативно конвертируются друг в друга [227]. Второе объяснение сводится к тому, что в случае нейтрофилов индикатор проникает в полость фагосомы, характеризующуюся высокой продукцией НОСl. В то же самое время, эозинофилы выделяют ЭПО в окружающую среду, где ее концентрация, а также концентрации ее продуктов, оказываются разбавленными. Однако, если эти рассуждения верны, получается, что люминол обладает



достаточно низкой чувствительностью и детектирует не гипогалогенный стресс, испытываемый тканью, а зоны присутствия активированных нейтрофилов. Позже описанный метод был усовершенствован путем дополнительного введения околоинфракрасных квантовых точек, которые служили акцепторами хемилюминесцентного резонансного переноса энергии и тем самым сдвигали сигнал, исходящий от пробы, в область низких энергий, облегчая визуализацию глубоких тканей [228].

Другие подходы для *in vivo* регистрации (псевдо)гипогалогенного стресса основаны на принципах ядерной физики. В 2006 году Chen и соавторы разработали контрастное вещество, представляющее собой комплекс Gd(III) и химических аналогов серотонина [229] (**Рис. 10Б**). Под действием активной МПО данный индикатор олигомеризуется и ковалентно присоединяется к белкам, что приводит к его накоплению в ткани и увеличению интенсивности сигнала. Еще один агент,  $^{18}\text{F}$ -МАРР, работает аналогичным образом, однако, для его регистрации используют позитронную эмиссионную томографию [230] (**Рис. 10В**). Более того, он способен проникать через гематоэнцефалический барьер. Существует надежда, что в будущем упомянутые работы станут источником вдохновения для создания аналитических препаратов в медицине. Они позволят визуализировать воспалительные процессы в глубоких тканях пациентов и следить за динамикой лечения в каждом индивидуальном случае. В том случае, если описываемые техники будут действительно разработаны, они станут настоящим прорывом, поскольку на текущий момент диагностика большинства воспалительных процессов базируется на измерении уровня системных маркеров [231]. К сожалению, использование Gd-bis-5-НТ-ДТРА и  $^{18}\text{F}$ -МАРР в исследовательских задачах сталкивается со множеством проблем. Во-первых, олигомеризация аналогов серотонина инициируется не (псевдо)гипогалогенными кислотами, а пероксидазным циклом МПО [232]. Таким образом, сигнал обсуждаемых инструментов свидетельствует о наличии в тканях активного фермента, а не специфичных продуктов его работы. Во-вторых, насколько нам известно, оба препарата не способны проникать в клетки и, соответственно, они регистрируют лишь внеклеточную фракцию белка. Наконец, их производительность во времени оказывается явно недостаточной для визуализации быстрых событий. Еще один экзотический подход основан на использовании  $^{11}\text{C}$ -меченого ингибитора МПО, AZD3241 [233]. Помимо того, что для него в целом характерны все перечисленные выше недостатки, очевидно, что он сам по себе влияет на метаболические процессы, протекающие в организме.



**Рисунок 10.** Некоторые методы для регистрации концентрации НОС1 или активности МПО *in vivo*. (А) Окисление люминола под действием МПО. (Б) Gd-bis-5-HT-DTPA – метка для визуализации регионов активности МПО с применением магнитно-резонансной томографии. (В)  $^{18}\text{F}$ -МАРР – метка для визуализации регионов активности МПО с применением позитронной эмиссионной томографии. Пояснения в тексте.

Недостаточно удовлетворительное пространственно-временное разрешение современных аналитических техник для регистрации (псевдо)гипогалогенных кислот побуждает научные коллективы по всему миру разрабатывать низкомолекулярные флуоресцентные красители, селективно изменяющие свои оптические свойства в ответ на окисление. На текущий момент в литературе описаны десятки подобных проб, детальное обсуждение которых выходит далеко за границы текущего текста. Несколько отличных обзорных статей суммируют особенности их синтеза и применения [234–237]. В качестве распознающих групп могут выступать халькогениды, ацилгидразины, ацилгидразоны,

гидроксиламины, основания Шиффа, двойные С-С связи, *p*-метоксифенолы, анизидины и некоторые другие. Несмотря на широкое разнообразие обсуждаемых красок, почти все они представляют большой интерес скорее для химиков-синтетиков, и лишь некоторые из них были использованы для получения ответов на реальные биологические вопросы. С чем же связано подобное положение дел?

Во-первых, многие искусственные пробы обладают необратимым ответом, поскольку они не являются природными молекулами и не распознаются клеточными антиоксидантными системами. Таким образом, эти вещества характеризуются «эффектом памяти» и не подходят для многократных измерений. Во-вторых, далеко не все низкомолекулярные краски содержат внутренний контроль нормировки, позволяющий осуществлять радиометрическую визуализацию. В то же самое время, интенсификационные сигналы подвержены множеству артефактов, связанных с неравномерным распределением агента в исследуемом образце, клеточной подвижностью и внутренним шумом оптических установок. В-третьих, для большинства флуоресцентных красок неизвестны кинетические параметры взаимодействия с (псевдо)гипогалогенными кислотами, поэтому остается неясным, способны ли они конкурировать с биологическими мишенями за свои аналиты. И если общие соображения позволяют предположить, что индикаторы на основе халькогенидов соответствуют данному требованию, то пробы, полагающиеся на окисление двойных связей, едва ли обладают достаточной чувствительностью [197]. Наконец, многие искусственные инструменты взаимодействуют с НОС1 при помощи реакций, в ходе которых выделяются побочные продукты с неизученным влиянием на метаболические пути [238].

Отдельного обсуждения заслуживают проблемы, возникающие при загрузке и удержании низкомолекулярных агентов в клетках и их компартментах. Для подобных соединений в принципе характерно малое время жизни в организме. Одним из возможных способов преодоления данного обстоятельства является включение репортеров в состав относительно объемных наночастиц. В частности, такая стратегия позволила увеличить время полувыведения оксазинового индикатора из крови животных с 40 минут до 9 часов [239]. Большинство красок, разработанных для детекции НОС1 в митохондриях, используют трифенилфосфоний в качестве направляющей метки. Однако, известно, что его эффект зависит от наличия нормального митохондриального потенциала, который, как уже было сказано ранее, разрушается в подавляющем числе модельных систем при наступлении (псевдо)гипогалогенного стресса. Это приводит к неизбежному вытеканию пробы в цитозоль. Некоторые коллективы предлагают использовать фиксирующие

группы, которые взаимодействуют с химически-активными фрагментами белков и тем самым удерживают индикатор в матриксе [240].

Несмотря на все недостатки низкомолекулярных агентов для визуализации НОС1, не возникает сомнений, что их палитра будет пополняться в будущем и они еще прольют свет на интересные процессы с участием активных форм галогенов. На данный момент уже существуют краски, позволяющие регистрировать гипохлоритный стресс в митохондриях [238,240–249], ЭПР [250,251], лизосомах [252–258], комплексе Гольджи [259] и ядре [260]. Некоторые из них подходят для двухфотонного режима возбуждения [246,248,251,252,258], либо же демонстрируют почти-инфракрасную эмиссию [247,248,256]. Единичные работы описывают пробы, совместимые с микроскопией сверхвысокого разрешения [259]. Однако, на наш взгляд, основным белым пятном на карте аналитической биохимии (псевдо)гипогалогенных кислот является отсутствие генетически кодируемого флуоресцентного сенсора для визуализации обсуждаемых аналитов. Дело в том, что инструменты, относящиеся к данному классу, сконструированы на основе белков, что наделяет их уникальными свойствами [261]. Зачастую они обладают обратимыми ответами, высокой селективностью, могут быть проэкспрессированы лишь в желаемых клеточных типах, а также направлены в конкретные органеллы при помощи известных аминокислотных последовательностей. Важно заметить, что обсуждаемые сенсоры позволяют осуществлять регистрацию процессов на уровне единичных клеток, что открывает возможности по исследованию гетерогенности, присущей всем живым системам. Наконец, с их помощью можно создавать трансгенные организмы, обеспечивающие высокую воспроизводимость результатов, получаемых в разное время и в разных лабораториях. В следующих разделах Обзора литературы мы обсудим флуоресцентные белки, которые выступают репортерными модулями данных инструментов, а также их основные архитектурные классы.

## **1.2. Флуоресцентные белки как репортерные модули генетически-кодируемых сенсоров.**

### *1.2.1. Структура и созревание флуоресцентных белков.*

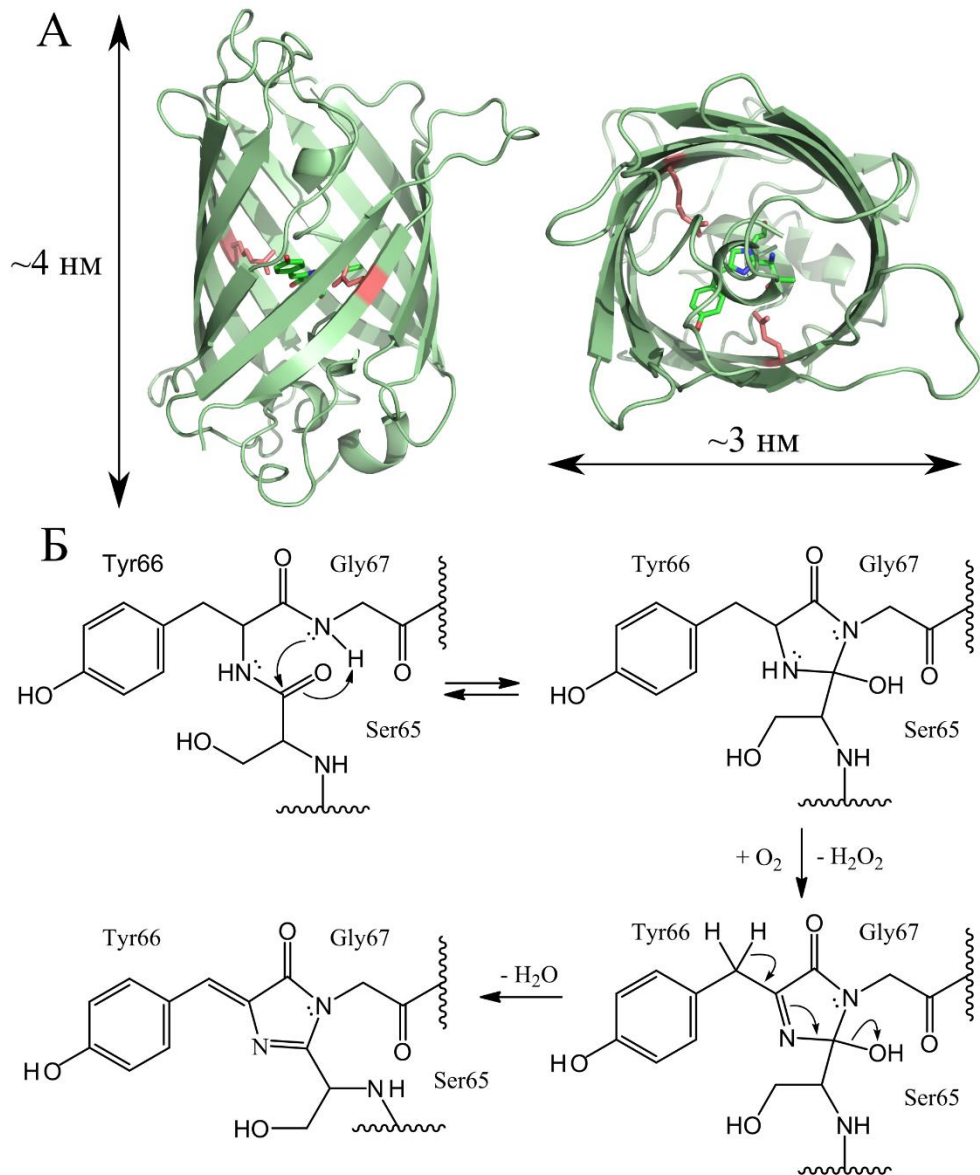
Первый флуоресцентный белок (FP, fluorescent protein) был обнаружен в 1962 году Shimomura et al. при изучении феномена биолюминесценции гидроидной медузы *Aequorea victoria* [262]. Анализ лизата светящихся органов из околоротового кольца показал, что за испускание света отвечает кальций-зависимая люцифераза экворин, которая генерирует фотоны в синей области спектра при кислород-зависимом

декарбоксилировании целентеразина [263]. Открытие данной реакции не могло объяснить, почему люминесцентные клетки медузы характеризуются зеленым излучением, однако, Shimomura и коллеги показали, что в лизатах присутствует компонент, демонстрирующий выраженную флуоресценцию в области 508 нм при воздействии ультрафиолета [262]. Дополнительные эксперименты прояснили природу данного вещества: оказалось, что им является полипептид, который был назван GFP (Green Fluorescent Protein) [264,265]. Morin и Hastings высказали оправдавшееся предположение, что между экворинном и GFP происходит биолюминесцентный резонансный перенос энергии (BRET, Bioluminescence Resonance Energy Transfer), который позволяет «настроить» оптические параметры системы под физиологические требования организма [264,266]. С этого момента началось многолетнее исследование биофизических свойств и разнообразия флуоресцентных белков, которое продолжается вплоть до настоящего времени.

При помощи протеолиза очищенного препарата GFP папаином с последующей высокоэффективной жидкостной хроматографией Cody и коллеги показали, что единственный гексапептид, начинающийся с 64-ого аминокислотного остатка, отвечает за способность белка поглощать видимый свет [267]. Авторы установили, что данный фрагмент содержит хромофор с протяженной системой сопряженных  $\pi$ -орбиталей, а расшифровка его химической структуры идентифицировала его как *p*-гидроксибензилиден-имидазолинон [267,268]. К концу XX века интерес научной общественности был прикован к поиску флуоресцентных меток, которые могли бы быть использованы для визуализации биологических процессов *in vivo*, в том числе – для создания генетически-кодируемых сенсоров. Например, в лаборатории Roger Tsien был получен индикатор для регистрации цАМФ на основе протеинкиназы А, который в качестве репортерных модулей задействовал молекулы флуоресцеина и родамина [269]. Разработанный Tsien инструмент был использован в ряде интересных моделей, в частности, он показал возникновение градиентов цАМФ в индивидуальных нейронах моллюска аплизии в ходе формирования памяти [270]. Однако описанный сенсор не был полностью генетически-кодируемым, поскольку требовал проведение очистки детекторного модуля, его конъюгацию с низкомолекулярным хромофором, а также последующее введение сформированного комплекса в исследуемые клетки в ходе микроинъекции. На тот момент научному сообществу не были известны белки, которые бы обладали авто-флуоресцентными свойствами (т.е. способностью к свечению в отсутствие внешнего хромофора). К 1990 году уже были клонированы единичные гены фикобилипротеинов, но внедрение низкомолекулярных хромофоров в их структуру

зависело от активности стороннего фермента [271]. Таким образом, экспериментальные системы на их основе все еще требовали доставку хромофора внутрь клеток. Альтернативным подходом могло быть внесение в клетку генов, необходимых для его синтеза, что представлялось еще более сложной задачей ввиду их большого количества. Ситуация резко изменилась в 1992 году, когда Douglas Prasher с коллегами клонировали ген GFP из библиотеки кДНК, полученной на основе мРНК *A. victoria* [268]. В оригинальной статье авторы предполагали, что хромофор GFP формируется в ходе пост-трансляционной модификации полипептида, и тем самым является его интегральной частью. Немногим позже экспериментальное подтверждение данной гипотезы было получено Chalfie [272], а также Inouе и Tsuji [273] путем гетерологичной экспрессии гена в нематодах и бактериях, что привело к бурному росту числа технологий на основе флуоресцентных белков.

Несмотря на то, что GFP был впервые закристаллизован в 1974 году [264], а дифракционные паттерны кристаллов – получены в 1988 году [274], его структура была расшифрована лишь в 1996 году в результате независимой работы двух коллективов [275,276]. GFP представляет собой небольшой белок массой 27 кДа, состоящий из 238 аминокислотных остатков, образующих укладку  $\beta$ -бочонка с пространственными размерами 42 на 24 Å [277]. В глубине структуры, окруженная 11  $\beta$ -листами, расположена искаженная  $\alpha$ -спираль, в центре которой находятся хромофор и его микроокружение (**Рис. 11А**). Последнее, неожиданным образом, включает в свой состав достаточно большое количество полярных и даже заряженных групп (наиболее важные – Gln69, Arg96, His148, Thr203, Ser205 и Glu222), а также скоординированных молекул воды [278]. И хотя поверхность цилиндра несколько расходится в области, куда направлен хромофор (участки 145-150 и 164-169) [279], описанная укладка надежно защищает его от внешней среды, что, по всей видимости, объясняет устойчивость белка к большинству повреждающих факторов, таких как высокая температура, повышение концентрации протонов, воздействие мочевины и гуанидин гидрохлорида, а также фиксации параформальдегидом [280–282]. Опубликованные работы описывают крайне медленную кинетику денатурации: в частности, времена необходимые для достижения равновесия составляют месяцы [283], в то время как для большинства малых белков они не выходят за минутный диапазон [284]. Таким образом, процесс разрушения вторичной и третичной структур характеризуется значительными энергетическими барьерами.



**Рисунок 11.** Основные аспекты строения GFP из *Aequorea victoria*. (А) Пространственная укладка белка (вид сбоку и вид сверху, PDB ID: 1EMA). Хромофор изображен в виде стержневой модели. Красным цветом отмечены ключевые остатки Arg96 и Glu222. (Б) Упрощенная схема созревания хромофора. Пояснения в тексте.

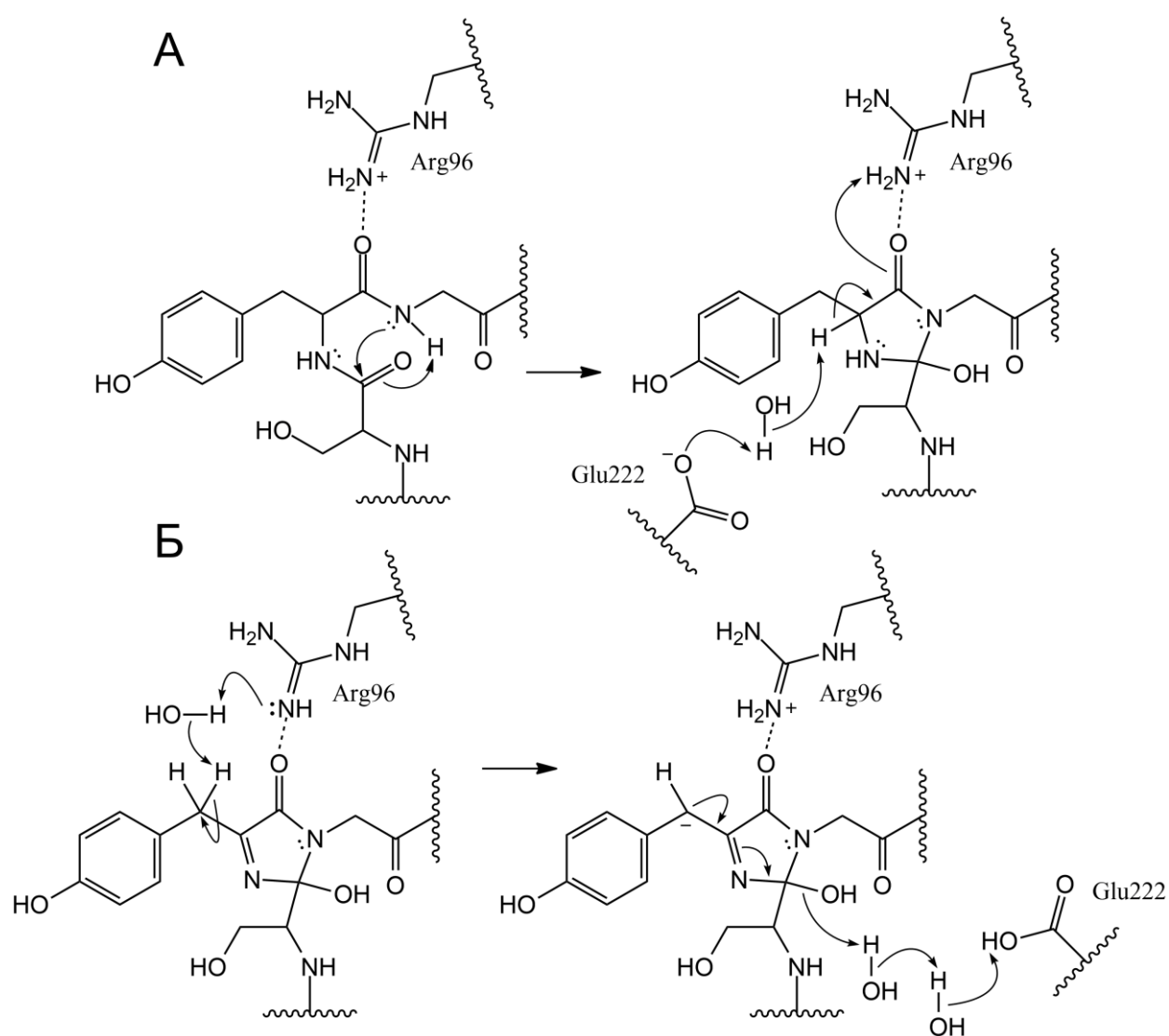
Созревание хромофора GFP является автокаталитическим процессом и включает в себя три основные стадии: 1) циклизацию; 2) окисление молекулярным кислородом; 3) дегидратацию (**Рис. 11Б**). На первом этапе происходит пространственное сближение амидного азота Gly67 и карбонильного углерода Ser65, которое завершается нуклеофильной атакой и образованием имидазолинона [285]. В данном контексте интересен тот факт, что все природные флуоресцентные белки содержат лишь четыре абсолютно консервативные позиции: Tyr66, Gly67, Arg96 и Glu222. В том случае, если мы

расширяем область рассмотрения за счет генно-инженерных вариантов, обязательными для созревания оказываются лишь Gly67 и Arg96 [286]. По всей видимости, среди всех аминокислот только глицин обладает достаточной конформационной подвижностью для того, чтобы принять пространственную конфигурацию необходимую для нуклеофильной атаки. Замена Gly67Ala существенным образом снижает эффективность созревания, поскольку дополнительная метильная группа нарушает плотную упаковку микрооружения хромофора и препятствует образованию корректных водородных связей с участием Arg96 [287]. Экспериментальные данные предполагают, что Arg96 выступает в качестве электрофильного катализатора, который, с одной стороны, поляризует пептидную связь и тем самым облегчает потерю амидного протона, активируя атом азота, а с другой стороны – стабилизирует отрицательный заряд при последующей енолизации продукта [288–291] (**Рис. 12А**). Мутант Arg96Ala изначально дает бесцветный белок, созревание которого занимает около трех месяцев [285]. По всей видимости, определенную роль в обсуждаемом процессе также играет Glu222, который служит общим основанием и через скоординированную молекулу воды отнимает протон у субстрата [291]. Циклизация созревающего хромофора является обратимым процессом [285,292]. Более того, согласно расчетам, образующийся продукт обладает большей энергией – таким образом, смещение равновесия происходит на последующих стадиях [285]. Важно отметить, что похожие циклизации были обнаружены и в других белках, например при формировании активного центра гистидин-аммиак-лиазы и аналогичных ферментов [293]. Второй этап созревания заключается в окислении образующегося хромофора молекулярным кислородом с образованием пероксида водорода в качестве побочного продукта [294]. Данная реакция, по всей видимости, происходит по радикальному механизму [289] и является скоростью-лимитирующей для всего процесса [295,296]. Ее смысл заключается во внесении дополнительной двойной связи в структуру полипептида, которая в будущем будет задействована в сопряженной системе электронов. Важно отметить, что в присутствии мощных восстанавливающих агентов флуоресцентные белки обратимо теряют свои оптические свойства за счет разрушения хромофора [297,298]. На практике данное свойство позволяет изучать процессы созревания, поскольку дает возможность синхронизировать молекулы, присутствующие в растворе. Ранние эксперименты по направленному мутагенезу флуоресцентных белков показали, что замена Trp66 на любой ароматический остаток сохраняет способность молекулы к эмиссии видимого света (см. ниже). Однако, все флуоресцентные белки, обнаруженные в природе, демонстрируют консервативность обсуждаемой позиции [278]. Механистические



исследования предполагают, что данный факт связан с тем обстоятельством, что именно тирозин направляет одноэлектронные химические процессы в глубине флуоресцентного белка в сторону созревания хромофора. В частности, для мутантов Tyr66Phe показана усиленная конкуренция реакций окисления (дегидрирования) и разрыва связи углерод-углерод [299].

На последнем этапе созревания хромофора происходит образование еще одной двойной связи за счет ухода молекулы воды, что приводит к формированию длинной сопряженной системы  $\pi$ -орбиталей. Предполагают, что Arg96 выступает в качестве



**Рисунок 12.** Некоторые каталитические аспекты созревания хромофора GFP. (А) Arg96 играет роль электрофильного катализатора при циклизации хромофора. Glu222 выступает в качестве общего основания. (Б) Arg96 играет роль общего основания при дегидратации хромофора. Glu222 выступает в качестве общей кислоты. Пояснения в тексте.

общего основания, инициирующего элиминацию путем связывания протона [300], а Glu222 конвертирует гидроксил-анион в хорошую уходящую группу, действуя как общая кислота [296] (**Рис. 12Б**). Экспериментальные работы свидетельствуют о том, что обсуждаемая реакция чувствительна к ароматическому характеру боковой цепи ббого остатка – делокализация ново образуемой двойной связи выступает движущей силой процесса [289,301].

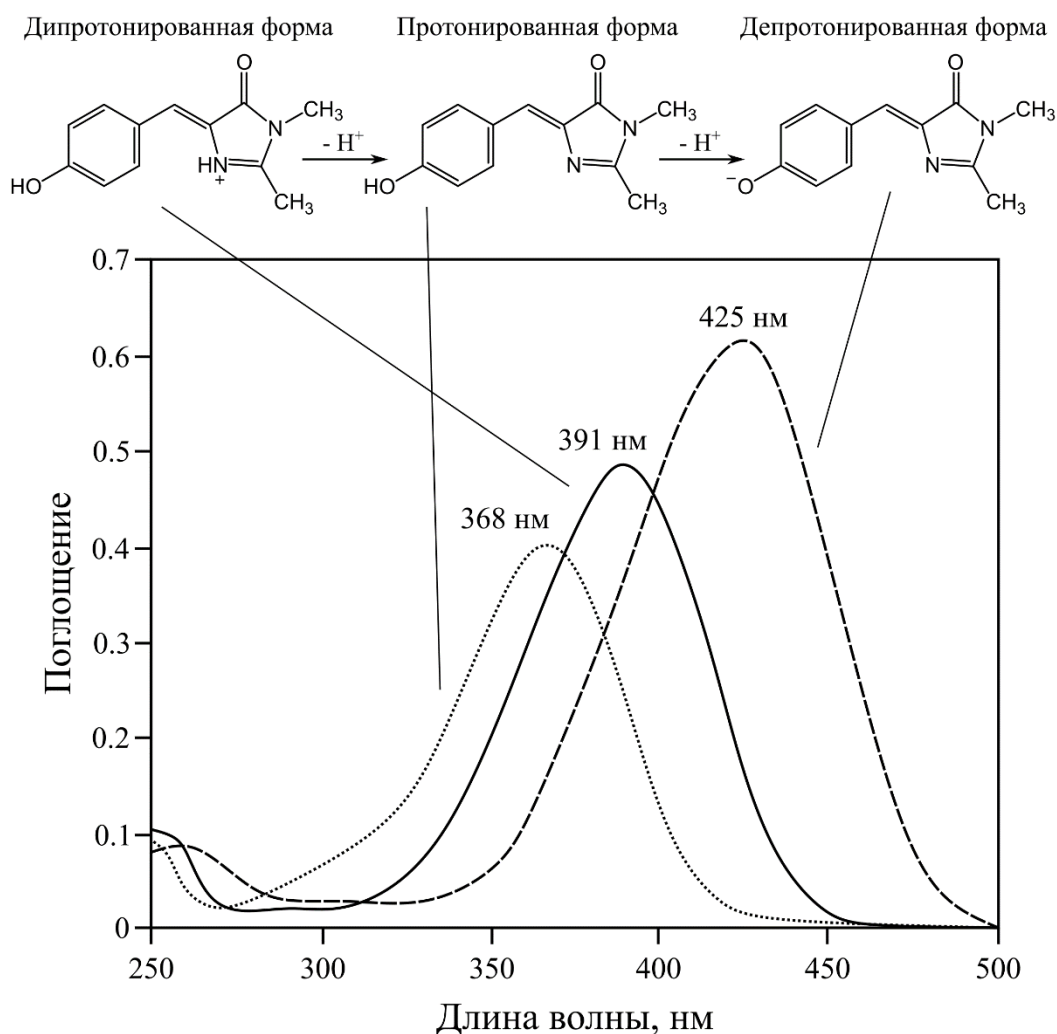
Отметим, что первые исследования, которые затрагивали вопрос созревания хромофора, предполагали, что стадия дегидратации предшествует окислению. Одним из наиболее существенных аргументов выступал тот факт, что по данным масс-спектрометрии GFP, синтезированный в отсутствие кислорода, терял  $1 \pm 4$  Да после обработки атмосферным воздухом [286]. Однако, измеренное значение не противоречит альтернативному механизму, в рамках которого за этапом циклизации следуют два возможных пути: 1) необратимые окисление и последующая дегидратация; 2) обратимая дегидратация со сдвигом равновесия в сторону продукта реакции. Таким образом, в анаэробных условиях GFP преимущественно находится в дегидратированном состоянии, но после доступа к кислороду присоединяет воду, после чего процессируется согласно первому сценарию. Существует как минимум три аргумента в пользу данной гипотезы. Во-первых, колориметрическое измерение концентрации  $H_2O_2$  свидетельствует о продукции АФК, предшествующей появлению флуоресценции [292]. Во-вторых, масс-спектрометрический анализ GFP на разных стадиях созревания выявляет интермедиаты, массы которых отклоняются от массы исходного полипептида на следующие значения:  $-0.13 \pm 0.26$  Да,  $-2.08 \pm 0.34$  Да и  $-20.06 \pm 0.29$  Да [292]. Они, очевидно, соответствуют циклизованному состоянию (нет потери массы), дегидрированному состоянию ( $-2$  Да) и полностью созревшему состоянию ( $-20$  Да). Наконец, обсуждаемый механизм поддерживают эксперименты по регистрации кинетического изотопного эффекта [300].

Анализ трехмерных структур природных флуоресцентных белков свидетельствует о высокой консервативности пространственной укладки. По всей видимости, это наблюдение отражает то обстоятельство, что третичная структура данных молекул играет ключевую роль как в «настройке» оптических свойств хромофора (см. ниже), так и в его созревании. В частности, искаженная структура центральной спирали способствует сближению N67 и C65, при этом ориентация орбиталей оказывается благоприятной для нуклеофильной атаки [302]. Анализ мутантов GFP, характеризующихся более эффективным созреванием (Phe99Ser/Met153Thr/Val163Ala, а также индивидуальные замены – Phe64Leu, Ser147Phe), показывает, что в данных случаях

скручивание остова становится еще более выраженным, дополнительно сближая реакционные центры [303]. Помимо этого, мутации Met153Thr, Val163Ala и Ser147Phe усиливают контакт Arg96 и карбонильного кислорода имидазола. Отметим, что как в незрелом, так и в созревшем состояниях, центральная спираль содержит лишь три из двенадцати возможных водородных связей, что, по всей видимости, уменьшает энтальпийный барьер реакции, поскольку для формирования хромофора не требуется разрывать существующие контакты [285]. Интересно, что упомянутая выше мутация Gly67Ala приводит к образованию трех дополнительных водородных связей, которые, вероятно, стабилизируют исходный субстрат [302]. Наконец, сниженная эффективность созревания характерна для версий GFP, которые имеют замены, прилегающие к остаткам пролина, кэпирующим концы центральной спирали [304]. Предполагают, что данный феномен также связан с их влиянием на геометрию внутренних регионов полипептидного остова.

### *1.2.2. Оптические свойства флуоресцентных белков.*

Титрование модельных аналогов *p*-гидроксibenзилиден-имидазолинона в буферах с различными значениями pH выявляет два ключевых перехода, для которых характерны следующие величины  $pK_a$ : 1.8 и 8.2 единицы. Первая реакция соответствует потере протона с атома азота имидазолинона и, как результат, конверсии положительно заряженного хромофора в нейтральную форму. Второй переход происходит при ионизации гидроксильной группы *p*-гидроксibenзилидена; соответственно, хромофор приобретает отрицательный заряд [305,306]. Катионная, нейтральная и анионная формы «свободного» хромофора характеризуются пиками поглощения с максимумами около 391 нм, 368 нм и 425 нм [307] (**Рис. 13**). Наблюдаемый при ионизации сдвиг в красную область происходит из-за нескольких эффектов, к которым в первую очередь относятся увеличение поляризации системы сопряженных  $\pi$ -орбиталей и возрастание степени конъюгации в области экзоциклического этиленового мостика, которое оказывается наибольшим в случае депротонированного хромофора. Среди трех упомянутых форм *p*-гидроксibenзилиден-имидазолинона катионная структура не имеет биологического значения, поскольку она не встречается при физиологических значениях pH. В то же самое время, переход между двумя оставшимися формами (мы будем называть их протонированной и депротонированной) лежит в основе многих оптических свойств флуоресцентных белков. Интересно, что в белковом окружении максимумы поглощения

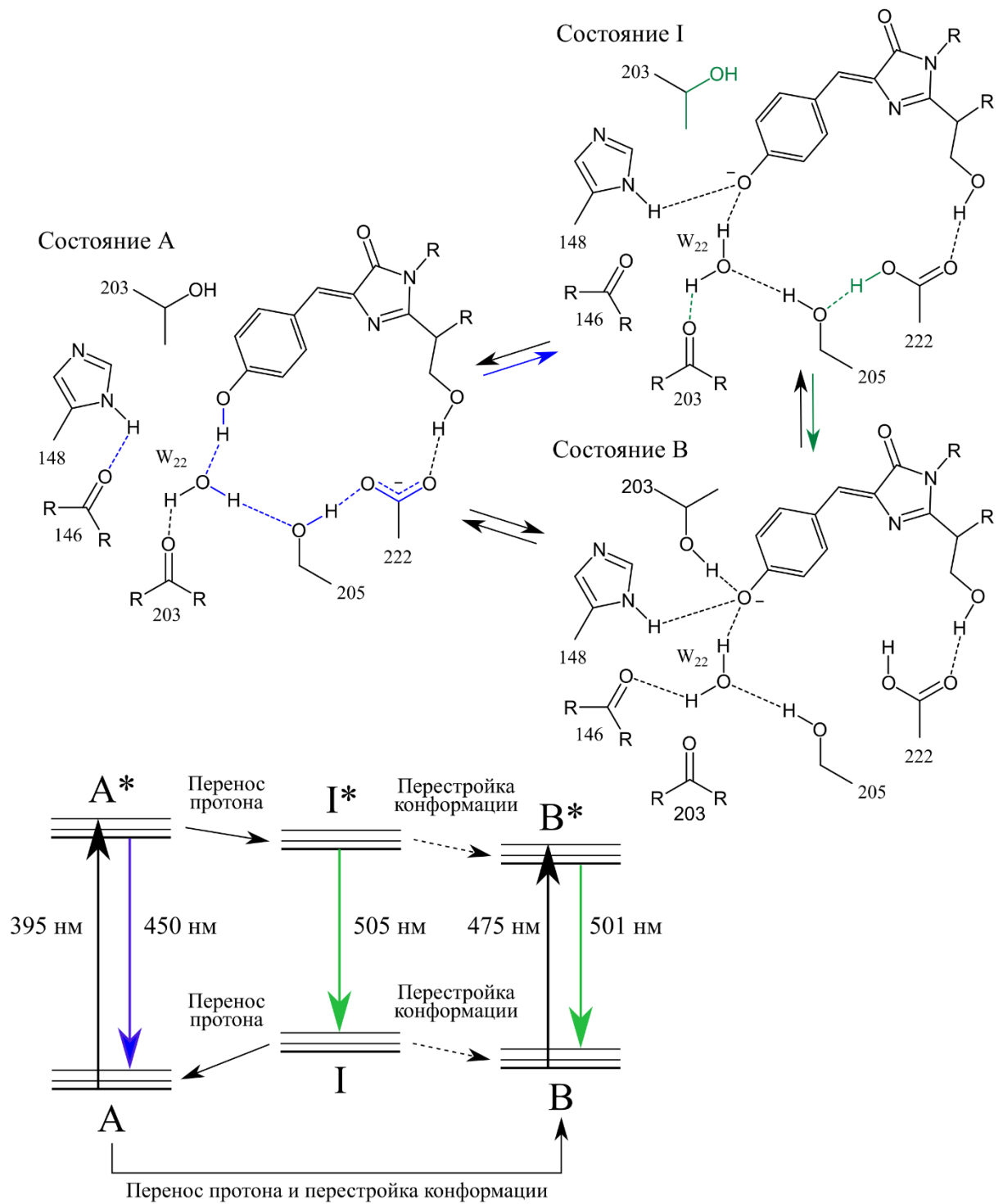


**Рисунок 13.** Кислотно-основные переходы 4-гидроксibenзилиден-1,2-диметил-имидазолинона, модельного аналога хромофора GFP, а также оптические свойства различных форм данного соединения. Пояснения в тексте.

обсуждаемых соединений подвержены крайне выраженному красному смещению – они принимают значения 395 и 475 нм [308]. Данный факт иллюстрирует важнейшую идею о том, что микроокружение хромофора обеспечивает не только его корректное созревание, но и «оптическую настройку». Считается, что основной вклад в красный сдвиг вносит контакт между положительно заряженной боковой группой Arg96 и карбонильным кислородом имидазолинона, который дополнительно поляризует систему делокализованных электронов [278]. Мутация Arg96Ala не только приводит к выраженному замедлению созревания хромофора, о чем было сказано выше, но и сдвигает его поглощение в область более высоких энергий [285]. При денатурации GFP наблюдаемые пики также смещаются в синий регион спектра – к 384 нм и 448 нм, соответственно [309].

В отличие от «свободного» хромофора, хромофор в белковом окружении оказывается относительно устойчив к кислотно-основному титрованию. Постепенное защелачивание среды, особенно – в регионе рН от 6 до 9 единиц, почти не приводит к изменению соотношения пиков поглощения [310]. Лишь при значениях превышающих 10 единиц, когда белок находится на грани денатурации, происходит выраженный переход нейтральной формы хромофора в анионное состояние [311]. Со структурной точки зрения данный феномен можно объяснить тем обстоятельством, что кислород *p*-гидроксibenзилидена взаимодействует с боковой цепью Glu222 через сеть водородных связей, включающую скоординированную молекулу воды и Ser205 (Рис. 14). Предполагают, что данная цепочка контактов может продолжаться вплоть до Glu5, находящегося на границе с растворителем [312]. Депротонирование Glu222 создает отрицательный заряд в области хромофора, который электростатически дестабилизирует анионную форму последнего. Таким образом, обсуждаемые участки GFP находятся в антагонистическом режиме, который позволяет поддерживать относительно стабильный статус протонирования *p*-гидроксibenзилидена в широком диапазоне рН [313,314]. Например, при значении рН в 7 единиц нейтральная и анионная формы хромофора находятся в соотношении около 6:1 [315].

Еще ранние работы показали, что хромофор GFP флуоресцирует исключительно в белковом окружении [280,316]. Можно назвать как минимум две причины данного явления: во-первых, погружение хромофора в  $\beta$ -бочонок изолирует его от молекулярного кислорода, который может выступать тушителем эмиссии [275], и, во-вторых, что более важно, жесткое микроокружение фиксирует хромофор и, тем самым, препятствует безызлучательным путям релаксации [317]. Известно, что при возбуждении свободного хромофора и его аналогов падает порядок связей в области этиленового мостика, что делает возможным тепловое выделение энергии за счет вращения по углам  $\tau$  и  $\phi$  [318,319]. Данный процесс не обязательно происходит с нарушением планарности системы  $\pi$ -электронов, в литературе активно рассматривают «hula-twist» механизм (согласованное изменение углов) [317,320]. В соответствии с высказанными соображениями, аналоги *p*-гидроксibenзилиден-имидазолинона могут приобретать флуоресценцию как при заморозке [321], так и при комнатной температуре, но в том случае, если их структура дополнительно фиксируется водородными связями или же связыванием ионов металлов [322,323]. Схожий принцип лежит в основе работы аптамерных систем (например,



**Рисунок 14.** Перенос протона в возбужденном состоянии (ESPT). На верхней части рисунка синим цветом обозначены связи, которые перестраиваются при переходе состояния А в состояние I. Зеленым цветом обозначены связи, которые перестраиваются при переходе состояния I в состояние В. W – скоординированная молекула воды. Числа соответствуют номерам аминокислотных остатков GFP. На диаграмме Яблонского пунктирные стрелки обозначают перестройку конформации белка, которая протекает значительно медленнее, нежели перенос протона и флуоресценция. \* - возбужденное состояние. Пояснения в тексте.

Spinach) для детекции специфических нуклеиновых кислот [324]. Показано, что свобода вращения вокруг экзоциклического мостика коррелирует с квантовым выходом флуоресцентных белков [325].

Интересное свойство GFP заключается в том, что воздействие света на оба пика поглощения приводит к флуоресценции в области 500 нм, хотя в случае правой полосы (соответствует депротонированному хромофору) наблюдается небольшой сдвиг в голубую область [326]. Обработка белка фотонами с длиной волны 395 нм вызывает также слабую эмиссию с максимумом около 450 нм. Объяснение описанного явления может быть получено при внимательном изучении пространственных структур GFP [327], а также при помощи экспериментов по пикосекундной спектроскопии [326]. Их результаты показывают, что после короткой вспышки возбуждающего света (395 нм) эмиссия сдвигается с 450 нм до 508 нм примерно за 10 пс. Этот процесс может быть существенно замедлен охлаждением образца или заменой протия на дейтерий, что свидетельствует о том, что для хромофора характерно явление переноса протона в возбужденном состоянии (ESPT, excited state proton transfer). Суть обсуждаемого феномена заключается в следующем: при поглощении света  $pK_a$  гидроксильной группы *p*-гидроксидебензилидена падает примерно на 9 единиц [326,328], что, в целом, соответствует хорошо охарактеризованному в литературе поведению ароматических спиртов [329]. Таким образом, при возбуждении хромофор конвертируется в более сильную кислоту и теряет свой протон, который по описанной выше цепи водородных связей мигрирует на боковую цепь Glu222 [330] (**Рис. 14**). Далее, депротонированный хромофор излучает свет, после чего его основные свойства вновь возрастают, вынуждая протон совершить обратный путь. Получается, что вне зависимости от того, какая форма белка (протонированная или депротонированная) поглотила свет, источником эмиссии всегда будет выступать фенолят-анион [326,328].

С чем связан тот факт, что при возбуждении протонированной и депротонированной форм хромофора исследователи регистрируют пики флуоресценции с небольшим различием в положении максимумов (508 нм и 503 нм, соответственно)? Данное явление происходит из-за того, что в базовых состояниях обсуждаемые формы хромофора имеют несколько разные микроокружения, энергетически адаптированные под локальное распределение электронной плотности [331]. В частности, наибольшие различия касаются конформаций His148, Thr203 и Glu222 (**Рис. 14**). В случае протонированного хромофора (состояние А) боковая цепь His148 образует водородную связь с кислородом белкового остова в 146ой позиции, боковая цепь Thr203 отвернута от

хромофора, а Glu222 находится в ионизированной форме. При депротонировании *p*-гидроксibenзилидена (состояние В) белок несколько изменяет укладку: боковые цепи His148 и Thr203 начинают стабилизировать алкоголят-анион водородными связями, а Glu222 оказывается в протонированной форме и суп-конформации. Однако, когда состояние А вступает в ESPT, время жизни флуоресценции оказывается существенно меньшим, нежели время, необходимое на перестройку пространственной укладки белка. Таким образом, возникает промежуточное состояние молекулы (его называют I), в котором депротонированный хромофор находится в микроокружении, характерном для протонированной формы [327]. Данное обстоятельство влияет на распределение электронной плотности в сопряженной системе  $\pi$ -орбиталей и приводит к небольшому сдвигу максимума эмиссии.

Именно с ESPT связаны простейшие виды фотоконверсии флуоресцентных белков. Например, продолжительная обработка образца светом с длиной волны 395 нм приводит к тому, что протонированные молекулы дольше пребывают в состоянии I, и у них увеличивается вероятность конформационной конверсии в состояние В (депротонированное) [332]. Иначе говоря, со временем в таком препарате будет расти соотношение пиков возбуждения флуоресценции Ex475/Ex395. Из-за того, что между состояниями А и В имеется относительно большой энергетический барьер, последующая релаксация может занимать часы [326]. Более того, описанная фотоконверсия несет частично необратимый характер, который связан с радикальными реакциями по механизму Кольбе – при возбуждении хромофор становится более хорошим окислителем и может забирать один электрон у боковой цепи Glu222 [333,334]. Образующееся соединение является нестабильным, поэтому оно распадается на углекислый газ и карборадикал, который возвращает отданный ранее электрон и впоследствии протонируется. Описанный процесс приводит к тому, что в микроокружении хромофора исчезает отрицательный заряд, снимается электростатическое напряжение (см. выше), и хромофор переходит в состояние фенолят-аниона.

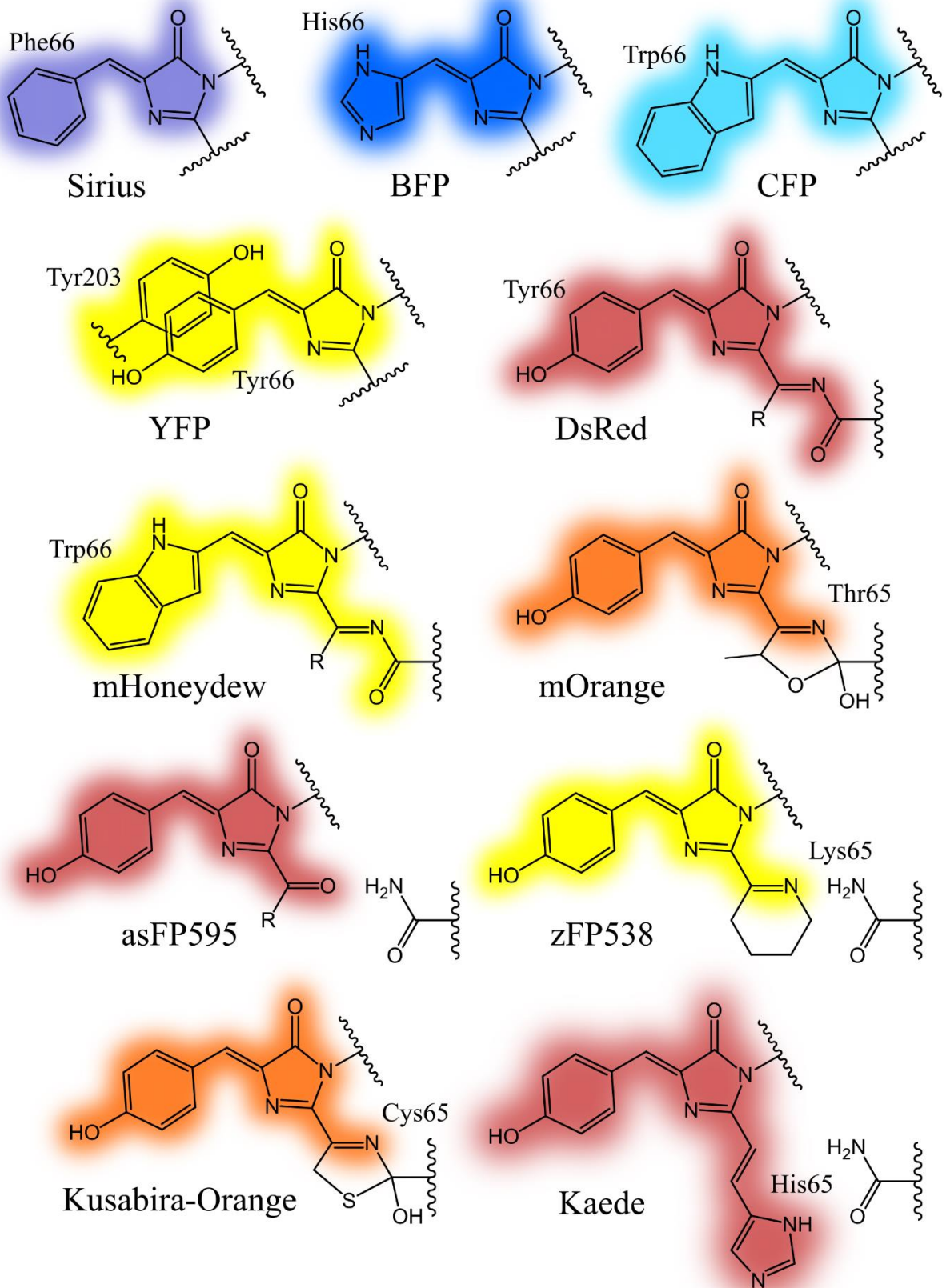
Отметим, что одни из первых работ по направленному изменению спектральных свойств GFP основывались на модификации остатков, участвующих в ESPT. В частности, замена Ser65 на другие алифатические аминокислоты (Thr, Gly, Ala, Cys или Leu) приводит к исчезновению левого пика возбуждения флуоресценции [335–337]. Данное явление связано с тем, что у таких мутантов перестраивается микроокружение хромофора и Glu222 поддерживается в протонированном состоянии [278]. Описанные замены также приводят к небольшому смещению правого пика в красную область, которое оказывается



наиболее выраженным в случае Gly. Подобные версии GFP получили большую популярность, поскольку они демонстрировали повышенную яркость, а упрощенные спектральные свойства значительно облегчали визуализацию флуоресценции в экспрессионных системах. Схожего эффекта можно добиться путем замены Glu222 на глицин, который не обладает ионизируемой группой в боковой цепи [338]. С другой стороны, определенные мутации Thr203 стабилизируют нейтральную форму хромофора, так как в его окружении исчезает гидроксильная группа, участвующая в координации отрицательного заряда [294,338,339]. Таким образом, становится возможным получение флуоресцентного белка с относительно большим Стоксовским сдвигом (оптическое расстояние между пиками возбуждения и испускания флуоресценции). Пара из мутантов GFP, содержащих замены по позициям Ser65 и Thr203, была использована в ранних экспериментах по мультипараметрической визуализации, поскольку, несмотря на общий пик эмиссии, данные белки могут быть возбуждены независимо друг от друга. Важно обратить внимание на тот факт, что структура GFP не обеспечивает достаточную жесткость окружения для протонированной формы хромофора, потому в большинстве случаев она характеризуется низким квантовым выходом [340]. Следовательно, версии белка с большим Стоксовским сдвигом требуют дополнительных мутаций, улучшающих их оптические параметры. В качестве примера можно упомянуть комбинации Ser65Gly/Thr203Val/Glu222Gln [341] и Thr203Val/Ser205Val [342].

### *1.2.3. Разнообразие цветных вариантов флуоресцентных белков.*

Открытие того факта, что GFP образует хромофор автокаталитически без вовлечения дополнительных факторов, кроме молекулярного кислорода, вызвало бурный рост интереса к получению спектрально-модифицированных версий белка для многопараметрической визуализации биологических процессов [343]. Действительно, комбинирование полипептидов «разного цвета» открывает возможность для одновременной регистрации активности нескольких промотеров, детекции белок-белковых взаимодействий, а также измерения биохимических и биофизических параметров при помощи сенсоров на основе Фёрстеровского резонансного переноса энергии (FRET, Förster Resonance Energy Transfer). Первые версии таких инструментов были получены Roger Heim на основе GFP в ходе случайного мутагенеза с последующим скринингом полученных библиотек [294,344]. Эксперименты показали, что в положении



**Рисунок 15.** Различные структуры хромофоров флуоресцентных белков. Нумерация остатков соответствует GFP из *Aequorea victoria*. Пояснения в тексте.

66, на месте тирозина из хромофорной триады, может находиться любой ароматический остаток (Phe, His, Trp), при этом его природа существенным образом влияет на спектральные свойства белка.

Среди ароматических аминокислот фенилаланин обладает самым неполярным заместителем, поэтому его интеграция в хромофор приводит к наибольшему сдвигу в синюю область спектра ( $E_x$  360 нм и  $E_m$  442 нм) [278]. Полученный мутант демонстрировал крайне низкую яркость, однако, в 2009 году был разработан фотостабильный и устойчивый к закислению среды вариант, названный Sirius, который до сих пор остается наиболее «фиолетовым» флуоресцентным белком [345] (**Рис. 15**). Впрочем, интерес к его использованию на практике достаточно низок, поскольку Sirius все еще обладает неудовлетворительной яркостью, а также его возбуждение требует высокоэнергетический свет, токсичный для клеток.

По сравнению с фенилаланином гистидин содержит более короткую систему сопряженных  $\pi$ -орбиталей, однако, расположенные на ней электроны более поляризованы. Таким образом его инкорпорация в хромофор ведет к получению синего флуоресцентного белка (BFP, Blue Fluorescent Protein) [344] (**Рис. 15**). BFP характеризуется пиками возбуждения и эмиссии флуоресценции, максимумы которых находятся при 380 нм и 448 нм. Генно-инженерные работы привели к созданию EBFP (Enhanced BFP) [346], варианта с увеличенной яркостью, который, вместе с EGFP (Enhanced GFP) использовали в первых экспериментах по двойному мечению [347], а также по FRET-микроскопии [348]. Тем не менее, практическое применение EBFP все еще было ограничено относительно низкой яркостью, а также неудовлетворительной фотостабильностью [349]. Последующая оптимизация синих флуоресцентных белков увенчалась успехом, и имеющаяся палитра была расширена за счет таких представителей как Azurite [350] и EBFP2 [351].

Наконец, замена Tyr66 на триптофан, обладающий достаточно протяженной боковой группой, сдвигает спектральные свойства GFP в циановую область [279,294] (**Рис. 15**). Интерес к циановым флуоресцентным белкам был вызван в первую очередь желанием получить FRET-пары, более эффективные, чем комбинация голубого и зеленого белков, поскольку низкие квантовые выходы вариантов с мутацией Tyr66His делают их плохими донорами для резонансного переноса энергии. Циановый флуоресцентный белок (CFP, Cyan Fluorescent Protein) обладает широкими пиками возбуждения и эмиссии флуоресценции, демонстрирующими бимодальный характер, вероятно, связанный с существованием вибрационных подуровней [279,294]. Данный факт осложняет его использование в экспериментах, которые задействуют измерение времени жизни

флуоресценции (FLIM, Fluorescent Lifetime Imaging) в качестве способа считки сигнала. Дальнейшее улучшение CFP, одним из этапов которого стало создание ECFP (Enhanced CFP) [344], привело к разработке Cerulean, характеризующегося увеличенными коэффициентом экстинкции и выходом флуоресценции, а также более простым квантовым поведением [352]. На протяжении многих лет Cerulean оставался одним из наиболее популярных FRET-доноров для использования в парах с желтыми белками, такими как Venus или Citrine [353]. К настоящему моменту генно-инженерные работы дополнили современную палитру флуоресцентных белков такими вариантами как Aquamarine (версия с высокой устойчивостью к низким значениям pH, а также с уникально малым количеством замен относительно CFP) [354], CyPet (оптимизирован для FRET) [355], mCerulean3 (вариант с высоким квантовым выходом) [356] и mTurquoise2 (обладает одним из наибольших квантовых выходов для мономерных флуоресцентных белков – 0.93) [357].

Параллельно с интересом к получению «цветных» вариантов GFP для мультипараметрической визуализации остро росла необходимость сдвигать оптические свойства белков в красную область спектра, поскольку свет, используемый для возбуждения таких инструментов, с одной стороны является менее токсичным для живых клеток, а с другой стороны – легче проникает через толстые образцы тканей. Анализ пространственной структуры флуоресцентных белков предполагал, что замена Thr203, расположенного в тесном контакте с хромофором, на Туг приведет к  $\pi$ -орбитальному стекингу с *p*-гидроксипбензилиденом и стабилизации дипольного момента в возбужденном состоянии [358]. Действительно, внесение обсуждаемой мутации в GFP смещает пики возбуждения и эмиссии флуоресценции полипептида почти на 20 нм в область более низких энергий [275] (**Рис. 15**). Улучшенная версия такого инструмента, EYFP (Enhanced Yellow Fluorescent Protein), в свое время стала одним из самых ярких флуоресцентных белков. К сожалению, она обладала существенными недостатками: сигнал сильно зависел как от показателя pH среды, так и от концентрации анионов галогенов. В дальнейшем, оптимизация желтых флуоресцентных белков развивалась в нескольких направлениях. Во-первых, были разработаны вариант, названный Citrine [359], который демонстрирует устойчивость к pH и сниженную чувствительность к галогенидам, а также его мономерная версия (mCitrine) [360]. В одной из недавних работ данный белок использовали в качестве модельного объекта для проверки роботизированной системы по поиску флостабильных мутантов. Результатом этих экспериментов стало обнаружение mCitrine2 [361]. Во-вторых, независимо от линии Citrine, модификация EYFP привела к получению Venus,

который также отчасти решает обозначенные выше проблемы [362]. Venus был использован в совместных экспериментах с ECFP по направленной эволюции FRET-пар, результатом которой стала разработка системы CyPet-YPet [355]. В другой работе мономерный вариант Venus (mVenus [363]) выступал в качестве одного из модельных белков для апробации метода по изоляции индивидуальных клеток с уникальными фенотипами из культур с высокой гетерогенностью (SPOTlight). Авторам удалось найти версию, mGold, которая обладает наибольшей фотостабильностью среди известных желтых флуоресцентных белков [364]. В-третьих, в результате замены Tyr203Phe, элиминирующей центр симметрии в хромофоре, был разработан вариант SHardonnay, оптимизированный для микроскопии второй гармоники [365].

Несмотря на многочисленные усилия по генетической инженерии GFP из *A. victoria*, YFP и его производные остаются самыми длинноволновыми представителями данной линии. Настоящая революция в обсуждаемой области произошла тогда, когда Сергей Анатольевич Лукьянов нашел флуоресцентные белки в коралловых полипах, которые до этого никто не рассматривал в качестве перспективных объектов для биофотоники, поскольку они не обладают люминесцентными свойствами [366]. Одним из первых обнаруженных красных флуоресцентных белков (RFP, Red Fluorescent Protein) стал DsRed из представителей рода *Discosoma*. Созревание DsRed устроено сложнее, чем в случае GFP, и включает в себя вторую стадию дегидрирования при участии молекулярного кислорода, дополнительно удлиняющую конъюгированную систему электронов [367] (**Рис. 15**). Использование DsRed в качестве оптического инструмента осложнялось несколькими обстоятельствами. Во-первых, для DsRed существует альтернативный путь формирования хромофора, запирающий его в зеленом, “GFP-подобном” состоянии [368]. Данная реакция существенным образом препятствует однозначному отнесению сигналов в ходе мультипараметрических экспериментов. Описанная проблема была частично решена путем создания DsRed2, варианта с уменьшенным временем созревания [369]. Впоследствии, была разработана версия DsRed-Express2, для которой данный параметр оптимизирован еще лучше [370]. Во-вторых, DsRed является облигатным тетрамером [371], и тем самым в случае слитой экспрессии с белками интереса может приводить к нарушению их локализации или же ограничивать доступ к клеточным партнерам. Пионерам биофотоники необычайно повезло, что GFP из *A. victoria* ведет себя как слабый димер, что не ощущается в большинстве экспериментальных условий, кроме ситуаций, когда локальная концентрация белка оказывается крайне высокой [372]. Впрочем, в таких случаях добиться полной

мономеризации GFP можно путем внесения всего лишь одной мутации, элиминирующей небольшую гидрофобную область на его поверхности. Наиболее популярными заменами являются Phe223Arg, Ley221Lys и Ala206Lys [360]. Разрушение обоих интерфейсов олигомеризации DsRed2 приводит к продукту, который теряет флуоресцентные свойства [373]. Tsien и коллегам потребовалось провести несколько раундов случайного мутагенеза, чтобы восстановить способность данного белка к испусканию света. Полученный мутант содержал 33 аминокислотные замены и был назван mRFP1. Несмотря на то, что этот белок представлял собой прорывную разработку, он обладал достаточно низкой яркостью и неудовлетворительной фотостабильностью.

Одной из важнейших разработок в сфере биофотоники стало создание линейки mFruits, полученной путем модификации mRFP1 [374]. Некоторые из ее представителей, такие как mHoneydew, mBanana и mTangerine не нашли широкое применение из-за неоптимальных оптических параметров (**Рис. 15**). Тем не менее, они существенно дополнили наши представления о структуре и механизмах функционирования флуоресцентных белков. Другой вариант, mOrange, является наиболее ярким среди mFruits и обладает свойствами, которые позволяют использовать его вместе с зелеными и циановыми вариантами в мультипараметрических экспериментах (**Рис. 15**). Позже была разработана версия mOrange2 с улучшенной фотостабильностью [375]. Оставшиеся члены группы, mCherry и mStrawberry, демонстрируют яркость около 50% и 75% от аналогичного параметра EGFP, однако, из-за более низкой склонности к выгоранию первый белок является более предпочтительной меткой. Параллельно с mFruits был создан другой интересный инструмент – tdTomato, который обладает высокой стабильностью и в течение долгого времени оставался самым ярким из известных флуоресцентных белков [374]. К его недостаткам можно отнести большой молекулярный вес, связанный с тем фактом, что dTomato демонстрирует высокую склонность к димеризации, и потому его использование в качестве партнера для слитой экспрессии требует получения тандемного димера. Еще одним интересным белком, разработанным на основе серии mFruits, стал mPlum, функционирующей в дальней области красного света [376]. Несмотря на относительно скромный показатель яркости, данный полипептид обладает высокой фотостабильностью, а низкая автофлуоресценция клетки в регионе 630-700 нм позволяет получать изображения с хорошим соотношением сигнала и шума.

Гомологи GFP были найдены не только среди представителей стрекающих, но и у ракообразных [377] и даже хордовых животных [378]. Это обстоятельство подчеркивает острый вопрос о биологических функциях, которые они выполняют в естественных

условиях. Тщательное изучение белков из обсуждаемого супер-семейства позволило открыть хромофоры с интересными и нетипичными структурами. Например, созревание пурпурного хромопротеина asFP595 из *Anemonia sulcata* включает стадию гидролиза C-N связи, которая вносит разрыв в полипептидный остов между 64ым и 65ым аминокислотными остатками, а также модифицирует систему сопряженных орбиталей [379] (Рис. 15). Анализ оптических свойств флуоресцентных белков выявляет определенную брешь в области желтого цвета (стоит отметить, что YFP и родственные варианты характеризуются скорее зелено-желтой эмиссией). По всей видимости, структура GFP-подобных полипептидов имеет внутренние ограничения, затрудняющие испускание квантов света в данном диапазоне. Один из немногих природных желтых флуоресцентных белков, zFP538, демонстрирует необычную модификацию хромофора – в нем образуется третий цикл за счет нуклеофильной атаки азота из боковой цепи Lys65 на  $\alpha$ -углерод того же самого остатка [380] (Рис. 15). Схожая реакция происходит и в случае Kusabira-Orange из *Fungia concinna* за тем исключением, что в качестве нуклеофила выступает атом серы Cys65 [381] (Рис. 15). Принципиально отличный механизм формирования красных хромофоров был обнаружен в флуоресцентных белках линии Kaede, названной так в честь японского клена. Изначально Kaede созревает как зеленый флуоресцентный белок, имеющий типичный GFP-подобный хромофор. Однако, обработка молекул ультрафиолетом приводит к разрыву белкового остова между 64-ой и 65-ой позициями, что создает дополнительную двойную связь, соединяющую систему  $\pi$ -орбиталей *p*-гидроксипбензилиден-имидазолинона с боковой группой гистидина [382] (Рис. 15). Благодаря описанному свойству полипептиды линии Kaede стали очень популярными фотоактивируемыми метками.

В последние годы доступная палитра флуоресцентных белков существенно расширилась как за счет обнаружения новых природных вариантов, так и за счет продуктивных работ по генетической инженерии. Подробное описание успехов, достигнутых научными коллективами из разных точек мира, выходит за рамки настоящего обзора и может быть удостоено целой книги. На текущий момент мы обладаем дальне-красными белками, сравнимыми по оптическим характеристикам с mPlum, но значительно превосходящими его по яркости. Например, в случае mNeptune2 обсуждаемый параметр примерно в 5 раз выше, чем для mPlum, и является сопоставимым с аналогичным значением mCerulean [383]. При этом правую границу эмиссии флуоресцентных белков удалось сдвинуть вплоть до 684 нм (у mPlum – 649 нм) при помощи таких представителей как mNeptune684 [384]. Благодаря усердным работам по

модификации eqFP578 из *Entacmaea quadricolor*, сейчас доступны варианты меток с невероятно высокими значениями фотостабильности – тетрамерный eqFP670 [385] и мономерный mStable [386], подходящий в качестве партнера для слитой экспрессии. Большое количество усилий было направлено на расширение арсенала инструментов, используемых в мультипараметрической микроскопии. В частности, NowGFP обладает очень длительным временем жизни флуоресценции (5.1 нс), что открывает новое окно для считывания сигнала и позволяет достоверно отличить его от EGFP при совместной визуализации [387]. Другой подход направлен на разработку белков с большими Стоксовскими сдвигами. Они могут быть использованы совместно с метками, демонстрирующими схожий спектр испускания света, при этом разделение сигналов происходит за счет разных длин волн возбуждения. Другой перспективной сферой их применения выступает кросс-корреляционная спектроскопия, поскольку в таком случае исчезает необходимость точной фокусировки двух лазеров в одном объеме визуализации. Рекордсменом по обсуждаемому параметру до сих пор остается mKeima [388] – флуоресцентный полипептид, полученный путем рациональной перестройки микроокружения хромофора из хромопротеина *Montipora sp.* Для mKeima положения максимумов возбуждения и эмиссии равняются 440 нм и 620 нм, таким образом Стоксовский сдвиг составляет 180 нм. Поскольку mKeima обладает достаточно сложным спектром возбуждения флуоресценции, были разработаны альтернативные инструменты, которые, с одной стороны, не сильно уступают ему по Стоксовскому сдвигу, а с другой – обеспечивают более однозначную интерпретацию сигналов. Среди них можно перечислить LSSmScarlet [389], LSSmOrange [390], LSS-mKate1 [391], LSS-mKate2 [391], LSSmCherry1 [392] и mBeRFP [393]. Отметим, что приставка LSS расшифровывается как Long Stokes Shift, Большой Стоксовский Сдвиг. Немало работ посвящено созданию меток для слитой экспрессии, которые обладают низкой токсичностью, минимально воздействуют на свойства белков-партнеров, а также демонстрируют четкое мономерное поведение. В качестве примеров стоит упомянуть FusionRed [394], а также более яркие дочерние версии, созданные на его основе – FusionRed-M [395] и FusionRed-MQV [396]. Наконец, значительный прогресс был достигнут в вопросах разработки мономерных флуоресцентных белков с большими показателями яркости. Лидерами по данному параметру до сих пор остаются mClover3 [397] и mNeonGreen [398], которые превосходят mEGFP по яркости примерно в 2.5 раза. Интересно, что при их создании авторы использовали различные стратегии. Первая метка стала результатом обобщения многолетнего опыта по изучению мутаций GFP из *A. victoria*, в то время как второй



полипептид был получен путем модификаций нового флуоресцентного белка, LanYFP, из *Branchiostoma lanceolatum*. Впрочем, флуоресцентные белки явно открыли нам еще не все свои секреты. В 2020-ом году вышла работа, в рамках которой авторы анализировали транскриптом *A. cf. australis* в поисках неизвестных гомологов GFP [399]. Ими был обнаружен и охарактеризован полипептид AausFP1, который экспрессируется в тканях медузы в необычайно малых количествах. При этом он обладает почти идеальным квантовым выходом (0.97) и крайне высоким коэффициентом поглощения ( $170,000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ), что делает его наиболее ярким из известных флуоресцентных белков. По данному показателю AausFP1 превосходит EGFP и mNeonGreen в 5 и 1.8 раза, соответственно. Его другие привлекательные особенности заключаются в необычно узких пиках возбуждения и испускания флуоресценции, а также в высокой фотостабильности. К сожалению, при гетерологичной экспрессии AausFP1 имеет тенденцию к образованию агрегатов. В свете данного факта, мы предполагаем, что в ближайшем будущем нас ожидает еще множество интересных открытий в сфере изучения и практического применения флуоресцентных белков.

### **1.3. Структурные классы генетически кодируемых сенсоров на основе флуоресцентных белков.**

#### *1.3.1. Общая справка.*

Беглое изучение современной литературы показывает, что на текущий момент создано и описано более нескольких сотен генетически кодируемых сенсоров на основе флуоресцентных белков. Данные инструменты позволяют регистрировать совершенно различные клеточные события: изменение концентрации аналитов, сдвиги в физических параметрах (таких, как температура, молекулярная скученность или гидростатическое давление), окислительно-восстановительные (редокс) процессы, активацию ферментов и многие другие. Какой-либо детальный обзор обсуждаемой области не может быть осуществлен в рамках настоящего текста и заслуживает публикации специализированных книг. Потому мы ограничимся лишь описанием общих принципов и идей, которые лежат в основе визуализации клеточных событий при помощи данных инструментов. В некоторых местах мы также обсудим историю их возникновения и совершенствования. Стоит сразу же отметить, что не все генетически кодируемые сенсоры основаны на GFP-подобных флуоресцентных белках. Некоторые из них используют люциферазы или же флуоресцентные полипептиды с внешними хромофорами. Мы не будем затрагивать инструменты такого типа, и в дальнейшем при использовании термина «генетически

кодируемые сенсоры, индикаторы, пробы» будем подразумевать сенсоры, индикаторы, пробы на основе автокаталитических флуоресцентных белков.

Существует множество классификаций генетически кодируемых сенсоров. Чаще всего авторы опираются на природу молекулярного события, которое улавливается инструментом. Таким образом, речь идет о редокс-сенсорах, сенсорах на активность каспаз или киназ, сенсорах на органические метаболиты, ионы металлов и так далее. Подобный подход полезен с той точки зрения, что он позволяет читателю, заинтересованному в изучении конкретной научной проблемы, подобрать инструмент, наиболее оптимизированный под его экспериментальную систему. Однако, как нам кажется, такие классификации плохо отражают общие идеи и принципы, лежащие в основе сенсоров – как *самостоятельной* области научного интереса. Таким образом, в рамках текущего текста мы разделим обсуждаемые инструменты по их архитектуре. Здесь также возможны некоторые разночтения, природой которых являются в первую очередь традиции и «вкусовые» предпочтения. Мы считаем, что наиболее емкая, и в то же самое время краткая, классификация включает следующие группы:

- 1) сенсоры, основанные на естественной чувствительности флуоресцентных белков;
- 2) сенсоры, основанные на модификации поверхности флуоресцентных белков;
- 3) сенсоры, основанные на активности промоторов;
- 4) FRET-сенсоры;
- 5) сенсоры, основанные на Proximity Imaging (PRIM);
- 6) сенсоры с Camgargo-топологией;
- 7) сенсоры на основе круговых пермутантов флуоресцентных белков.

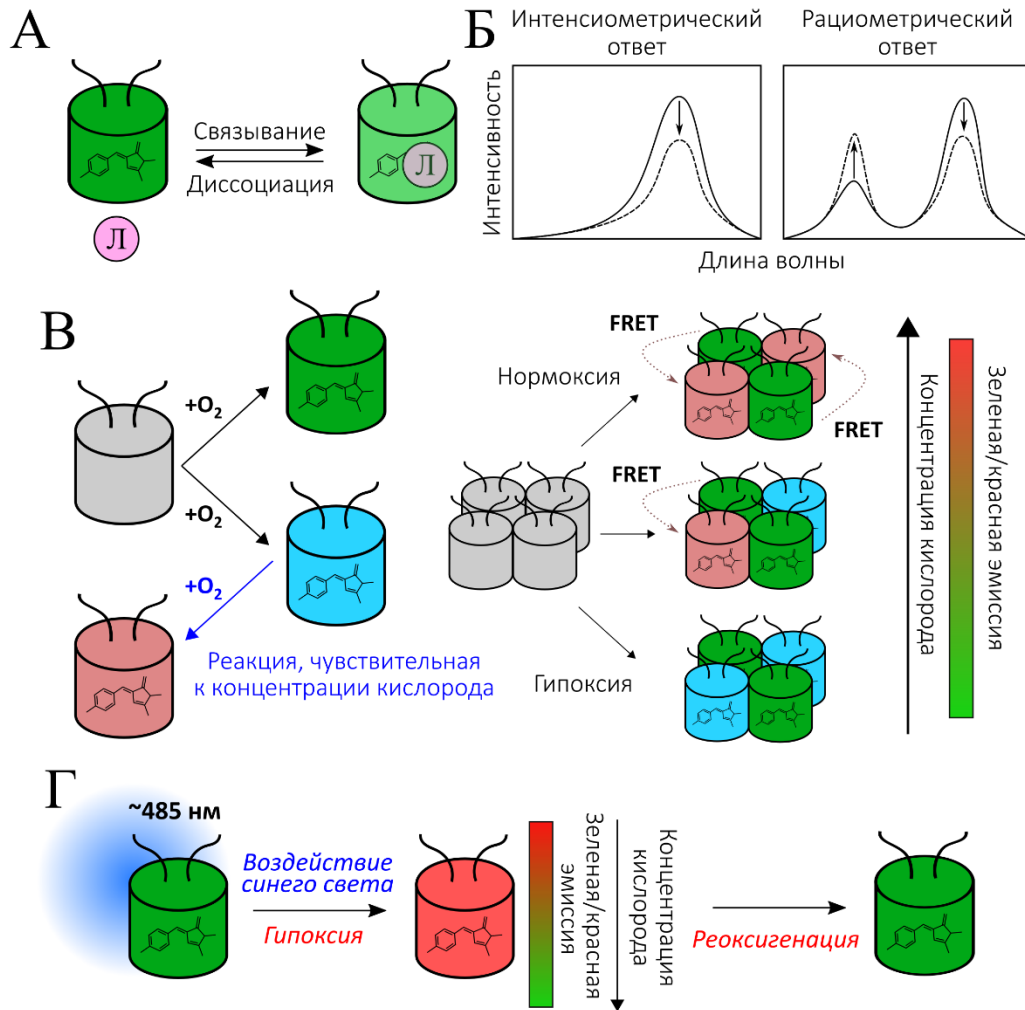
Далее мы кратко рассмотрим все выделенные группы, при этом, по возможности, в качестве примеров мы будем использовать редокс-индикаторы, поскольку эти инструменты напрямую связаны с темой диссертационной работы.

### *1.3.2. Сенсоры, основанные на естественной чувствительности флуоресцентных белков.*

Несмотря на то, что плотная укладка флуоресцентных белков делает их необычайно устойчивыми к агрессивным воздействиям, таким как увеличение концентрации мочевины и детергентов, воздействие протеаз и высоких температур, еще в ранних работах было показано, что спектральные свойства GFP крайне чувствительны к внешним факторам (температура, pH, ионная сила, концентрация белка и другие)

[264,286,328]. Kneen и соавторы были одними из первых, кто осознал, что данные свойства флуоресцентных белков позволяют использовать их как уже готовые сенсоры [400] (**Рис. 16А**). В своей работе они провели рН-титрование четырех мутантов GFP *in vitro* и вычислили соответствующие им значения  $pK_a$ : 6.0 для F64L/S65T, 5.9 для S65T, 6.1 для Y66H и 4.8 для T203I. Авторы также осуществили локализованную экспрессию версии F64L/S65T в цитоплазме, митохондриях, ЭПР и комплексе Гольджи клеток линий CHO и LLC-PK1, после чего воздействовали на внутриклеточный рН при помощи калибровочных буферов с ионофорами. Их эксперименты доказали, что мутантный GFP сохраняет рН-чувствительность в биологическом контексте и достаточно быстро отвечает на изменения кислотности среды. Независимо от Kneen, Miesenböck и коллеги в том же году в ходе работ по направленной эволюции разработали ecliptic pHluorin, который отличается от GFP следующими заменами: Ser147Asp, Asn149Gln, Thr161Ile, Ser202Phe, Gln204Thr и Ala206Thr [401]. Данный белок почти не демонстрирует флуоресценцию при  $pH < 6$ , однако, интенсивно «разгорается» при защелачивании среды. Это обстоятельство сделало его очень популярным инструментом для визуализации процессов слияния везикул. Позже, за счет инкорпорации мутаций Phe64Leu и Ser65Thr из EGFP, была получена улучшенная версия сенсора, superecliptic pHluorin, с повышенной яркостью [402]. Другими примерами флуоресцентных белков, которые были использованы как инсенсиометрические сенсоры на рН, являются mNectarine [403] и pHTomato [404]. Отметим, что последний обладает одним из наибольших значений  $pK_a$  (7.8) среди представителей группы, что позволяет использовать его для детекции митохондриальных событий.

Интенсиометрические сенсоры обладают рядом недостатков, связанных с тем фактом, что они демонстрируют сигнал лишь в одном оптическом канале. Дело в том, что интенсивность флуоресценции зависит не только от состояния измеряемого параметра, но и от других факторов – сила экспрессии индикатора, скорость его деградации, клеточная подвижность и некоторые другие. Таким образом, за редкими исключениями, обсуждаемые сенсоры докладывают лишь об относительных изменениях в системе, и не способны давать абсолютные значения. Одним из возможных решений описанной проблемы является разработка ратиометрических индикаторов, главной чертой которых является способность генерировать сигналы в двух каналах с различающимся поведением в ответ на целевой параметр (**Рис. 16Б**). Ratio-pHluorin был получен в той же серии



**Рисунок 16.** Сенсоры, основанные на естественной чувствительности флуоресцентных белков. (А) Некоторые флуоресцентные белки обладают способностью связывать низкомолекулярные лиганды (протоны, ионы галогенов; Л), которые влияют на их оптические свойства. (Б) Общий вид интенсимоетрических и рациометрических сигналов. (В) Общий принцип функционирования сенсора pIsTimer на концентрацию кислорода. Слева схематично изображены пути созревания хромофора DsRed. Справа показана зависимость эмиссии сенсора от концентрации кислорода в клетках. (Г) Анаэробный реддинг GFP. Пояснения в тексте.

экспериментов, что и ecliptic pHluorin [401]. При закислении среды он демонстрирует разнонаправленное поведение пиков возбуждения флуоресценции – сигнал в области 475 нм падает, в то время как сигнал в области 395 нм растет. Упомянутые выше мутации, использованные для улучшения свойств ecliptic pHluorin, были также задействованы для оптимизации данного сенсора, что позволило создать версию pHluorin2 [405]. Реконструкция ESPT в mKeima привела к разработке красного рациометрического сенсора на pH, названного pHRed [406]. Данный инструмент обладает очень высокой амплитудой ответа и обладает значением  $pK_a$  (7.8), позволяющим проводить

визуализацию в слабощелочных условиях. Кроме того, время жизни флуоресценции pHRed существенно зависит от кислотности среды, что открывает дополнительный тип считывания сигнала (FLIM). Интересным свойством ratio-pHluorin и pHRed является то, что их пики возбуждения флуоресценции демонстрируют инвертированную pH-зависимость – при закислении среды растет концентрация молекул с депротонированным хромофором. В случае pHRed такое необычное поведение связано с тем фактом, что при щелочных условиях Asp157 находится в отрицательно заряженном состоянии и стабилизирует нейтральную форму хромофора [407]. Однако, по мере закисления среды упомянутый остаток переходит в сопряженную кислоту, что позволяет хромофору ионизироваться и вступить во взаимодействие с гидроксильной группой Ser142. Примером pH-сенсора с типичным кислотно-основным поведением может служить Pt-GFP, привлекательной чертой которого выступает стабильность в кислых компартментах [408]. Еще одной любопытной группой рациометрических pH-сенсоров являются инструменты, хромофор которых способен излучать свет в протонированном состоянии. Таким образом, данные белки содержат внутренний контроль не только в каналах возбуждения, но и в каналах эмиссии. К ним относятся E<sup>2</sup>GFP [409] и его дочерняя версия, E<sup>1</sup>GFP [314], менее чувствительная к тушению в присутствии ионов галогенов. Другая стратегия по созданию рациометрических проб заключается в слиянии двух флуоресцентных белков, один из которых является pH-сенсором, а второй, менее чувствительный к кислотности среды, выступает в качестве стандарта сравнения [410–412].

В ходе обсуждения желтых флуоресцентных белков, мы отмечали тот факт, что замена Thr203Tyr приводит к возникновению чувствительности в отношении ионов галогенов, которая является крайне нежелательной в большинстве экспериментальных систем. Множество усилий было направлено на то, чтобы разработать желтые белки с более устойчивыми сигналами. Однако, описанное свойство YFP можно применять на практике, используя данную метку в качестве простейшего сенсора на хлорид-анионы. Структурный анализ показывает, что Tyr203 является критически важным для связывания Cl<sup>-</sup>, которое, впрочем, не сводится исключительно к образованию водородной связи [413]. По всей видимости, объемная боковая цепь обсуждаемого остатка оказывает влияние на пространственную укладку белка и облегчает конформационные перестройки, необходимые для удерживания иона. Хлорид-анион создает отрицательный заряд в области хромофора, что дестабилизирует депротонированную форму и смещает равновесие в сторону нейтрального состояния [414]. Обсуждаемое свойство YFP может

быть подвергнуто оптимизации при помощи методов генетической инженерии. В частности, показано, что замена His148Gln снижает константу диссоциации для Cl<sup>-</sup> с 777 мМ до 155 мМ при рН 7.5 [413]. В других работах авторы предпринимали попытки модифицировать селективность белка, поскольку помимо хлорид-анионов, он также связывает I<sup>-</sup>, NO<sub>3</sub><sup>-</sup> и Br<sup>-</sup> [415]. Известно, что константы диссоциации в случае варианта YFP-H148Q растут в следующем порядке: I<sup>-</sup> < NO<sub>3</sub><sup>-</sup> < Br<sup>-</sup> < Cl<sup>-</sup>. Установленная последовательность предполагает, что карман для связывания ионов характеризуется слабой силой поля, следовательно, предпочтение отдается тем соединениям, которые обладают меньшей энергией дегидратации. Дополнительная замена Ile152Leu увеличивает селективность белка в отношении иодид-анионов, что, по всей видимости, связано с небольшим расширением полости, которая теперь легче принимает более объемные частицы [415]. Другой интересной мутацией является Val163Ser – в ее присутствии константа диссоциации для I<sup>-</sup> становится больше, чем для Cl<sup>-</sup>. Считается, что данный эффект обусловлен увеличением гидрофильного характера связывающей поверхности [415]. Белок, сочетающий в себе все три замены, перечисленные выше, был назван Cl-Sensor [416]. Его основное преимущество заключается в возможности радиометрического считывания сигнала. Cl-Sensor обладает константой диссоциации около 30 мМ по отношению к хлорид-анионам, которая все еще не является оптимальной для *in vivo* измерений. Более того, высокая чувствительность инструмента к рН (рK<sub>a</sub> около 7.5) осложняет однозначную интерпретацию съемок. В 2014 году была опубликована работа, в которой авторы описывают более совершенный инструмент, Cl-YFP [417]. Дополнительные замены позволили им получить фотостабильный белок, сочетающий в себе повышенную чувствительность к Cl<sup>-</sup> (K<sub>d</sub> 14 мМ) и устойчивость к сдвигам в концентрации протонов (рK<sub>a</sub> 5.9).

Некоторые редокс-сенсоры также основаны на природной чувствительности флуоресцентных белков к внешним стимулам. В частности, nlsTimer [418] – сенсор на молекулярный кислород – использует DsRed FT, тетрамерную форму DsRed, не склонную к агрегации, в качестве репортерного домена [419,420]. Для DsRed FT существует два пути созревания, которые приводят к зеленому и красному хромофорам, соответственно. Второй путь пролегает через синий интермедиат и затрачивает дополнительную молекулу O<sub>2</sub>. Авторы работы показали, что именно эта реакция является наиболее чувствительной к концентрации кислорода в среде [418] (**Рис. 16В**). Таким образом, в условиях гипоксии тетрамеры DsRed FT оказываются составленными из синих и зеленых белков, и потому демонстрируют зеленую флуоресценцию. По мере роста парциального давления O<sub>2</sub>, все

большее количество индивидуальных молекул созревают по более длинному пути, и препарат приобретает красную окраску (важно отметить, что в тетрамерах DsRed FT наблюдается очень эффективный FRET от зеленых белков к красным [421]). Данный сенсор был использован для изучения оксигенации индивидуальных клеток *Drosophila melanogaster* в ходе эмбрионального развития [418]. Интересной чертой nlsTimer является тот факт, что по сравнению с более распространенными пробами, основанными на Hypoxia Inducible Factor, он позволяет различать состояния умеренной гипоксии с разной выраженностью.

Другой подход для измерения концентрации кислорода основан на явлении анаэробного реддинга, открытого Elowitz и соавторами [422]. Суть явления заключается в том, что в условиях жесткой гипоксии (концентрация  $O_2$  меньше 1%) вспышка синего света (475-495 нм) вызывает конверсию GFP в красную форму (Рис. 16Г). Данный феномен был зарегистрирован как на очищенных препаратах белков, так в бактериях, которые инкубировали в присутствии систем, вытравливающих кислород, или же без доступа к атмосферному воздуху [422]. Takahashi и коллеги продемонстрировали, что описанное явление применимо для детекции гипоксии в клетках млекопитающих, при этом в качестве метода считывания сигнала можно использовать соотношение красной и зеленой флуоресценции [423]. Анаэробный реддинг GFP позволяет не только визуализировать градиенты кислорода в единичных клетках [424], но и производить съемку более сложных моделей, таких как ишемия печени или сердца трансгенных мышей [425]. К основным недостаткам метода относится тот факт, что фотоконверсия GFP становится выраженной лишь в условиях почти полного отсутствия кислорода. Более того, химическая природа реддинга остается не до конца понятной, что, с одной стороны, осложняет интерпретацию данных, а с другой стороны – не позволяет производить рациональную оптимизацию инструментов.

### 1.3.3. Сенсоры, основанные на модификации поверхности флуоресцентных белков.

Поскольку флуоресцентные белки не эволюционировали в направлении усиления связи между оптическими свойствами и факторами окружающей среды, очевидно, их природная чувствительность не может служить основой для разработки широкого спектра инструментов. Таким образом, перед исследователями встает задача по сопряжению хромофора и его микроокружения с определенными сенсорными интерфейсами, обеспечивающими селективный ответ на параметр интереса. В простейших случаях

обсуждаемые интерфейсы могут быть созданы на поверхности флуоресцентных белков при помощи методов генетической инженерии. Описанный дизайн приводит к разработке индикаторов, состоящих из единственного GFP-подобного домена, который сочетает в себе сенсорную и репортерную функции.

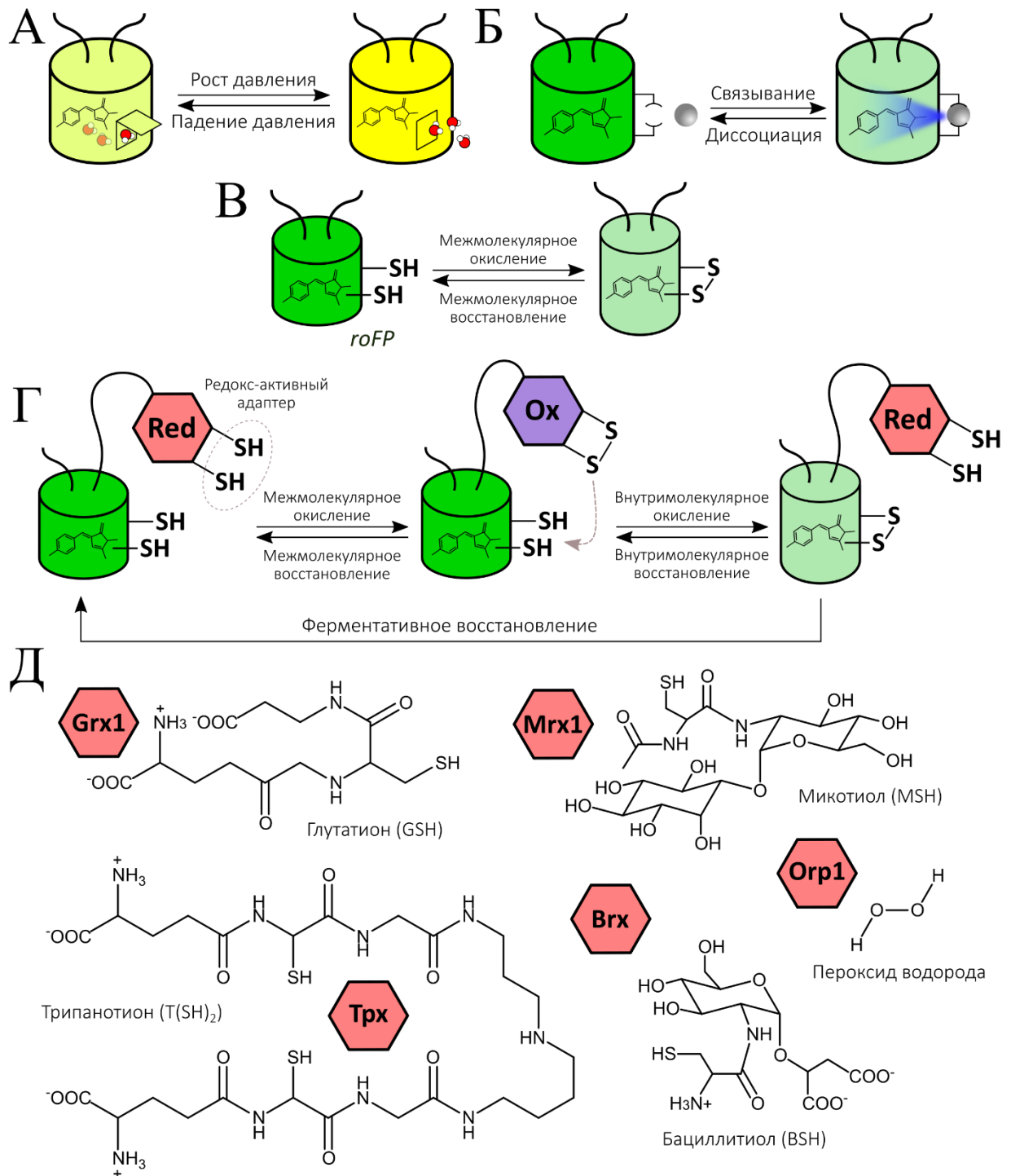
Уже в ранних работах по исследованию влияния пространственных структур флуоресцентных белков на их оптические свойства, были предложены способы превращения данных молекул в пробы на ионы тяжелых металлов. В частности, хромофор BFP демонстрирует порфирин-подобную структуру, что может быть использовано для координации поливалентных катионов. Ключевой мутацией в данном случае выступает замена His148Gly, расположенная на поверхности  $\beta$ -бочонка, в области, где соседние тяжи остова несколько расходятся в пространстве [426]. Таким образом, формируется канал, который соединяет окружение хромофора и внешнюю среду, позволяя ионам металлов проникать внутрь глобулы. Интересно, что Zn(II) и Cu(II) оказывают прямо противоположные эффекты на оптические свойства белка. При связывании, оба иона увеличивают жесткость хромофора и стабилизируют планарное состояние, что приводит к росту квантового выхода; однако, будучи d-элементом, Cu(II) выступает в качестве темного FRET-акцептора, тем самым вызывая выраженное падение эмиссии [426]. Схожие соображения были задействованы в ходе разработки YFP-3G, являющегося сенсором на гидростатическое давление [427] (**Рис. 17А**). Инсерция трех остатков глицина перед Tyr145 изменяет пространственную ориентацию последнего и тем самым формирует канал и полость, доступные для молекул воды, приводящих к статическому тушению флуоресценции. По мере увеличения гидростатического давления глициновая петля «вдавливается» в поверхность белка, что влечет за собой уход  $H_2O$  и восстановление параметров эмиссии [427].

Создание каналов, ведущих к хромофору, является далеко не единственной стратегией по модификации поверхности флуоресцентных белков с целью разработки сенсоров. Еще в 1999 году Richmond и коллеги показали, что внесение остатков гистидина в 147-ую и 204-ую позиции GFP формирует интерфейс, способный удерживать ионы Cu(II), Co(II) и Ni(II) [428] (**Рис. 17Б**). Пятнадцать лет спустя данный дизайн был транслирован на целую палитру флуоресцентных белков, покрывающую почти весь видимый спектр света: EBFP2, mCerulean3, mEmerald, mVenus, mApple и mKate2. Разработанные инструменты получили общее название ion-quenchable Fluorescent Proteins (iq-FPs) [429]. Схожую логику задействовали Tang и соавторы, что позволило им создать CatchER – генетически кодируемый сенсор, пригодный для визуализации  $Ca^{2+}$  в условиях



его высокой концентрации, например, в люмене гладкого ЭПР [430]. CatchER представляет собой EGFP, подвергнутый серии замен по положениям 147, 202, 204, 223 и 225, результатом которых стало формирование поверхностного сайта, обогащенного карбоксильными группами остатков глутамата и способного координировать целевой аналит. Не так давно тот же самый коллектив доложил о разработке G-CatchER<sup>+</sup> с оптимизированным фолдингом при физиологической температуре [431], а также ультрабыстрого красного варианта R-CatchER [432]. Несмотря на визуальную схожесть архитектуры iq-FPs и CatchER функционируют по совершенно различным механизмам. В то время как остатки гистидина iq-FPs удерживают ионы тяжелых металлов, выступающие темными акцепторами энергии, в непосредственной близости к хромофору [429], связывание Ca<sup>2+</sup> боковыми цепями глутамата в CatchER индуцирует конформационные перестройки β-бочонка. Конечный результат структурных сдвигов заключается в реорганизация ESPT, которая изменяет pK<sub>a</sub> хромофора и увеличивает время жизни флуоресценции [433].

Среди всех сенсоров, основанных на модификации поверхности GFP-подобных полипептидов, самыми популярными являются редокс-активные флуоресцентные белки. Более того, данные индикаторы оказываются одними из самых популярных сенсоров в принципе – количество опубликованных работ, в которых были использованы обсуждаемые инструменты, превышает несколько сотен. В 2001 году Østergaard и соавторы создали мутантную версию YFP (gxYFP), на поверхности которой расположены два остатка цистеина (Asn149Cys/Ser202Cys), способные обратимо окисляться с образованием дисульфидной связи [434]. Идея, лежащая в основе такого дизайна, предполагала, что локальное изменение конформации белка будет влиять на пространственную позицию Tyr203, который находится в стэкинге с хромофором, и тем самым оказывать воздействие на оптические свойства молекулы. Несмотря на то, что gxYFP стал убедительным доказательством принципиальной возможности создания подобных инструментов и был использован в некоторых работах для получения ответов на биологические вопросы, он обладает множеством недостатков. Среди самых выраженных стоит отметить интенсиметрический характер ответа (E<sub>x</sub> 513 нм, E<sub>m</sub> 527 нм), а также выраженную чувствительность сигнала к pH и концентрации анионов галогенов, которую он унаследовал от YFP. Данные проблемы были преодолены путем разработки roGFP1 и roGFP2 (E<sub>x</sub> 400 нм, E<sub>x</sub> 475/490 нм, E<sub>m</sub> 510 нм) [435], среди которых



**Рисунок 17.** Сенсоры, основанные на модификации поверхности флуоресцентных белков. **(А)** Сенсор на гидростатическое давление. **(Б)** Сенсоры, обладающие поверхностными интерфейсами, способными связывать низкомолекулярные лиганды (ионы металлов). **(В)** Редокс-активные флуоресцентные белки (roFP), содержащие остатки цистеина на своей поверхности. **(Г)** Редокс-активные флуоресцентные белки с адаптерами, улучшающими их селективность и кинетические параметры. Red – восстановленный. Ox – окисленный. **(Д)** Разнообразие аналитов, которые можно измерять при помощи редокс-активных флуоресцентных белков, а также соответствующие адаптеры. Пояснения в тексте.

второй вариант демонстрирует несколько больший динамический диапазон, а его оптические свойства лучше оптимизированы под стандартные наборы лазеров и флуоресцентных фильтров [436] (**Рис. 17В**). Согласно результатам рентгеноструктурного анализа ответ roGFP2 на окисление возникает из-за смещения остатков His148 и Ser205 в окружении хромофора, что способствует росту  $pK_a$  *p*-гидроксибензилидена [435].

Многочисленные экспериментальные работы свидетельствуют о том, что в клеточном контексте редокс-активные остатки цистеина gxYFP и roGFP вступают в равновесие с пулом глутатиона (2GSH/GSSG) при помощи белков глутаредоксинов (Grx) [437,438]. Однако, в эукариотических системах данный процесс протекает крайне медленно, что не позволяет визуализировать быстрые события с удовлетворительным разрешением [439]. Первые попытки улучшить кинетические параметры обсуждаемых сенсоров были основаны на внесении положительно-заряженных остатков в область ключевых цистеинов с целью снизить их  $pK_a$  (версии roGFP1-R12 [439] и gxYFP<sup>3R</sup> [440]). Несмотря на то, что ожидаемый эффект был достигнут, он не обладал достаточной выраженностью, чтобы проявляться *in vivo*. Элегантное решение проблемы было найдено путем соединения редокс-активных флуоресцентных белков с адаптерными модулями при помощи гибкого линкера. В химерных конструкциях локальная концентрация адаптера оказывается крайне высокой, что обеспечивает эффективное уравнивание редокс пулов. Описанный подход был впервые использован для создания gxYFP-Grx1p с целью изучения функционирования глутаредоксинов [441]. Авторы показали, что в связанном с Grx1p виде константа скорости реакции между gxYFP и GSSG возрастает более, чем на три порядка, а катализ происходит по монотиюльному механизму. В дальнейшем описанный дизайн привел к получению Grx1-roGFP2 [442], который, на текущий момент, является одним из самых популярных сенсоров в мире (**Рис. 17Г**). Важно отметить, что разнообразие адаптерных белков не сводится к глутаредоксинам. Так, современная палитра редокс-индикаторов располагает инструментами для визуализации редокс-состояния пулов микотиола [443] и бациллитиола [444]. Не так давно был опубликован сенсор, вступающий в равновесие с пулом трипанотиона [445]. Более того, адаптер в принципе не обязан взаимодействовать с тиоловыми соединениями – слияние roGFP2 с пероксидазой Ogr1 позволяет получить индикатор на пероксид водорода [446] (**Рис. 17Д**). Наконец, в последние годы достаточно много усилий было направлено на исследование химерных конструкций, основанных на дрожжевых пероксиредоксинах, которые позволяют регистрировать наномолярные концентрации H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> [447].

Арсенал доступных редокс-активных флуоресцентных белков постоянно пополняется. В частности, разработка голубых (Oba-Q [448]) и красных (Grx1-roCherry [449]) версий позволила покрыть почти всю область видимого света. Другое важное направление заключается в попытках создать инструменты с более высоким редокс-потенциалом. Дело в том, что для roGFP2 и rxYFP данный параметр принимает значения около -280 [450] и -260 мВ [434], соответственно. Таким образом, оба белка оказываются полностью окисленными в таких компартментах как ЭПР [435,437,451], где редокс-потенциал глутатиона составляет примерно -208 мВ [452]. Варианты roGFP1-iL, roGFP1-iE и roGFP2-iL были получены путем инсерции лейцина, либо глутамата сразу после Cys147 [453,454]. В данных белках дисульфидная связь, возникающая при окислении, испытывает стерическое напряжение, что смещает значения редокс-потенциала обсуждаемых сенсоров до -229, -236 и -238 мВ. К сожалению, данные величины все еще не являются оптимальными для визуализации процессов в полости ЭПР.

В завершении раздела стоит сделать два важных замечания, касающиеся использования редокс-активных флуоресцентных белков в живых клетках, а также интерпретации результатов, полученных с их помощью. Во-первых, независимые работы показывают, что в бактериальных системах экспрессии обсуждаемые сенсоры демонстрируют быстрые ответы даже в свободном состоянии [455–457]. Аналогичные свидетельства были получены и в отношении дрожжевых моделей [458]. Таким образом, встает вопрос – с какой редокс системой происходит уравнивание сигналов данных инструментов и какие ферменты обеспечивают необходимые реакции? Более того, получается, что при экспрессии roGFP с адаптерами, ключевые цистеины будут эффективно взаимодействовать не только с ними, но и с клеточными белками, что приведет к смещению сигналов. Во-вторых, определенные проблемы касаются селективности инструментов в отношении активных окислителей. Долгие годы в литературе шла «битва», в рамках которой одни авторы пытались позиционировать редокс-активные флуоресцентные белки как сенсоры на общий окислительно-восстановительный статус клетки, а другие настаивали на высокой специфичности данных проб в отношении целевых аналитов [459]. Независимые работы, опубликованные за последние пять лет, по всей видимости, поставили точку в этом горячем вопросе – оказалось, что roGFP2 и родственные ему инструменты обладают высокой чувствительностью к гипогалогенным кислотам, полисульфидам и пероксинитриту [444,449,460]. Таким образом новые свидетельства требуют системного пересмотра подходов по интерпретации результатов, получаемых с помощью этих сенсоров.

#### 1.3.4. Сенсоры, основанные на активности промоторов.

Очевидно, что в большинстве случаев селективное распознавание аналитов требует вовлечения достаточно сложных молекулярных интерфейсов, которые не могут быть созданы на поверхности флуоресцентных белков. В таких случаях исследователи прибегают к использованию природных полипептидов, свойства которых были отточены в ходе эволюции. Зачастую функциональная роль данных белков заключается в регуляции экспрессии генов или в обеспечении работы сигнальных сетей, иначе говоря – они выступают естественными сенсорами в живых клетках. Следует заметить, что химическое сопряжение оптических свойств хромофора и чувствующего домена требует приложения большого количества генно-инженерных усилий, и когда научный коллектив начинает подобный проект, он не может быть уверен в его успехе. Таким образом далеко не во всех случаях разработка сложных инструментов оправдывает возможные затраты. Определенные задачи по визуализации биохимических процессов вполне могут быть решены при помощи некоторого простого и универсального дизайна. Одним из возможных вариантов подобной стратегии является использование флуоресцентного белка в качестве химически-инертного репортера активации промотора. В других случаях сигнал транскрипционных сенсоров детектируют при помощи системы, состоящей из люциферазы и люциферина. Оба варианта имеют свои преимущества и недостатки, сравнительный анализ которых выходит за пределы настоящего текста. Отметим, что некоторые работы, которые мы цитируем ниже, использовали именно люциферазу в качестве репортера; однако, выводы, которые могут быть сделаны на их основе, релевантны и в отношении инструментов, основанных на флуоресцентных белках.

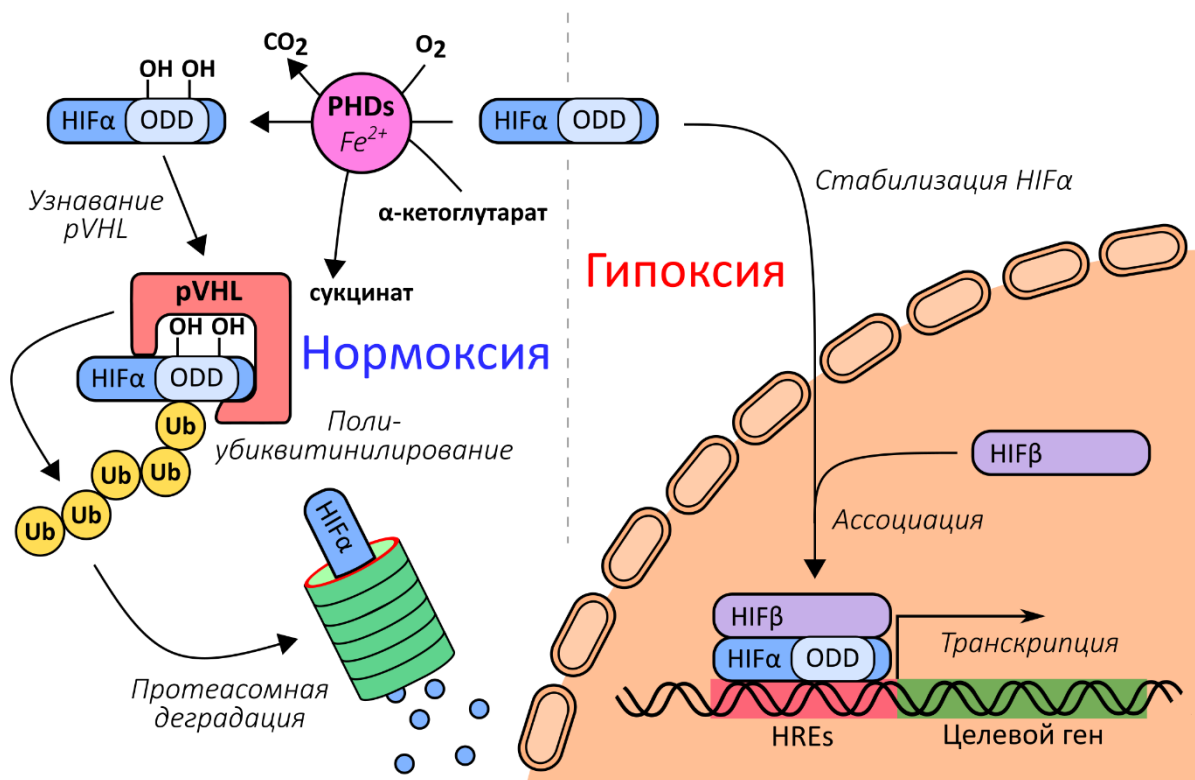
Интересно, что специфическая визуализация активности промотора, а именно – последовательности из гена *tec-7*, ответственного за синтез тубулина в рецепторных нейронах *Caenorhabditis elegans*, стала первым успешным примером гетерологичной экспрессии GFP [272]. Данная работа настолько сильно повлияла на современные аналитические технологии, что в 2008 году Chalfie был удостоен Нобелевской премии по физиологии и медицине. В своем исследовании Chalfie использовал тканеспецифичный промотор, однако, если его заменить на регуляторный элемент, активность которого зависит от факторов окружающей среды, можно получить простейшую сенсорную систему с интенсификационным сигналом. На текущий момент в литературе описано достаточно большое количество транскрипционных индикаторов, чувствительных к аминокислотам [461–463], вторичным метаболитам [464], ключевым участником биосинтетических путей [465–467], а также ко многим другим группам соединений. В

сфере редокс-биологии в качестве сенсорных модулей наиболее часто используют бактериальные транскрипционные факторы Rex [468], SoxR [469,470] и OxyR [471], чувствительные к NAD(H), супероксид-аниону и пероксиду водорода, соответственно. Несмотря на то, что данные системы основаны на функциональных элементах прокариотического происхождения, они могут быть использованы и в эукариотических моделях. Для этого в изучаемые клетки вносят ген флуоресцентного белка под контролем гибридного минимального промотера, а также конститутивно экспрессирующийся сенсорный модуль, слитый с трансаактивирующим доменом [465,468]. Общим свойством транскрипционных сенсоров, неизбежно следующим из их принципиальной организации, является низкая разрешающая способность как в пространстве, так и во времени. Действительно, активация гена не может указать на то, в каком регионе клетки произошло изменение концентрации аналита, а кинетические параметры процессов созревания и разрушения флуоресцентных белков затрудняют регистрацию быстрых событий. Таким образом, основной сферой применения обсуждаемых инструментов служат высокопроизводительные скрининги в рамках задач синтетической биологии, а также биотехнологических проектов. Транскрипционные сенсоры помогают в отборе мутантных ферментов с оптимизированными свойствами [470], в создании микроорганизмов-продуцентов [462,463], а также в поиске белков, вовлеченных в метаболические процессы интереса [464,465]. Некоторые из них были также адаптированы для бесклеточных систем, позволяющих детектировать низкомолекулярные вещества. В частности, RegoxiHUB представляет собой инструмент, основанный на активации OxyR под действием H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> [472]. Его привлекательным свойством является возможность перенастраивать субстратную специфичность за счет подбора фермента, вовлекающего аналит в реакцию, одним из продуктов которой является перекись водорода.

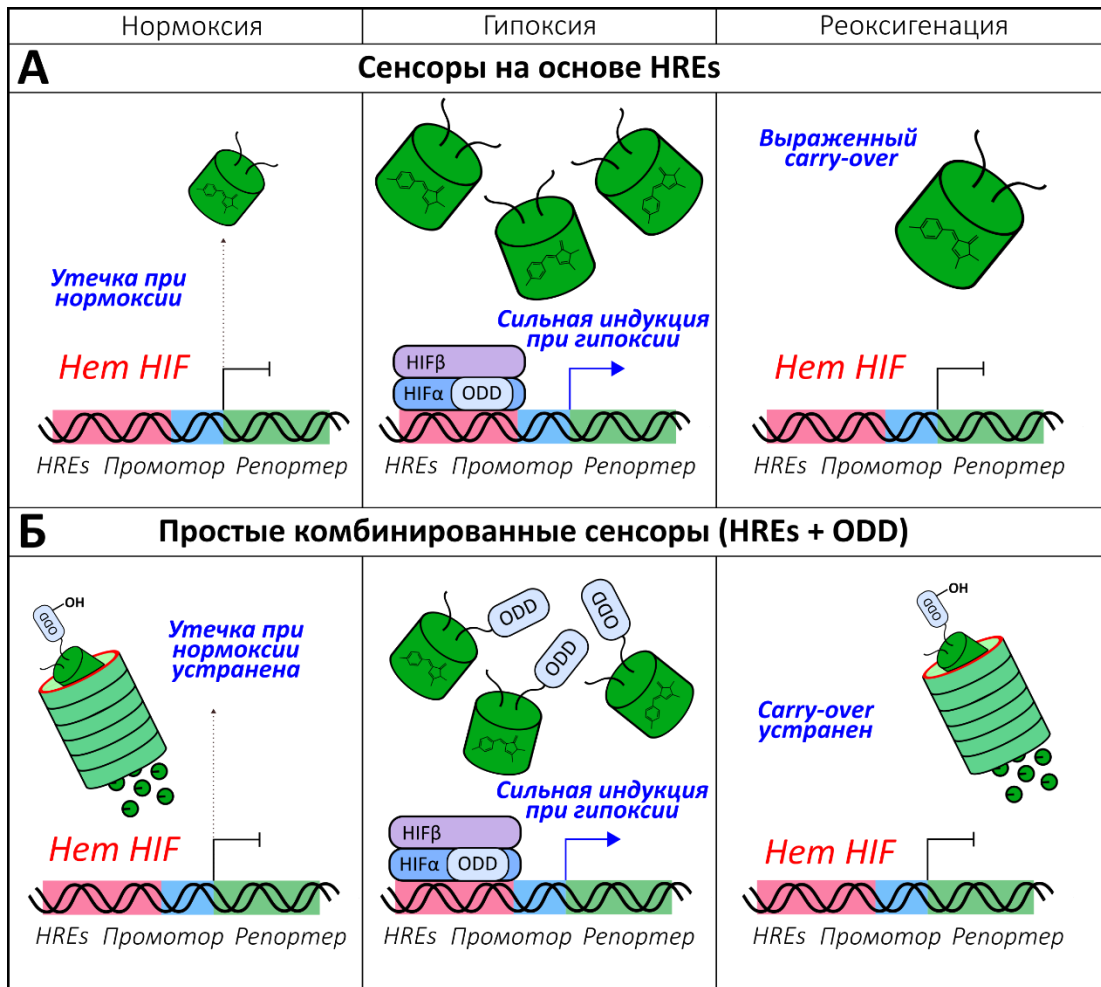
Впрочем, существуют и исключения, которые не в полной мере подчиняются общим трендам, описанным выше. Состояния гипоксии, которые могут быть обнаружены в некоторых органах и тканях во время эмбриогенеза, а также в растущих опухолях, развиваются достаточно медленно, после чего могут длиться в течение многих часов и даже дней. Данное обстоятельство в значительной мере снижает требования, предъявляемые к генетически кодируемым сенсорам на O<sub>2</sub>, в отношении способности к временному разрешению. Именно поэтому транскрипционные индикаторы на основе Hypoxia Inducible Factor (HIF) активно используются в экспериментах по визуализации гипоксии *in vivo*. Далее мы кратко рассмотрим главные принципы их разработки, которые в общем случае применимы и к другим сенсорам из обсуждаемой группы.

HIF представляет собой транскрипционный фактор, состоящий из  $\alpha$ - и  $\beta$ -субъединиц [473]. В условиях гипоксии HIF $\alpha$  проникает в ядро, где он объединяется с партнером, после чего образовавшийся комплекс связывается с Hypoxia Response Elements (HREs) и тем самым активирует гены, расположенные рядом с данными элементами. В тех случаях, когда концентрация O<sub>2</sub> оказывается относительно высокой, пролилгидроксилазы вводят атомы кислорода в ключевые остатки пролина, входящие в состав Oxygen-Dependent Degradation Domains (ODDs) HIF $\alpha$  [473]. В результате описанной реакции HIF $\alpha$  становится мишенью белкового продукта гена-супрессора опухолей фон Гиппеля-Линдау (pVHL), что отправляет его на убиквитин-зависимую деградацию [473] (Рис. 18). Простейшие транскрипционные сенсоры на кислород могут быть получены путем помещения последовательностей, кодирующих флуоресцентные белки, под контроль HREs (Рис. 19А).

Индикаторы на основе HREs обладают невероятной гибкостью дизайна, потому за многие годы был накоплен достаточно большой опыт, систематизирующий связи между



**Рисунок 18.** Упрощенная схема сигналинга с участием Hypoxia Inducible Factor (HIF). ODD – Oxygen-Dependent Degradation Domains. PHD – пролилгидроксилазы. pVHL – продукт гена-супрессора опухолей фон Гиппеля-Линдау. Ub – убиквитин. HREs – Hypoxia Response Elements. Пояснения в тексте.



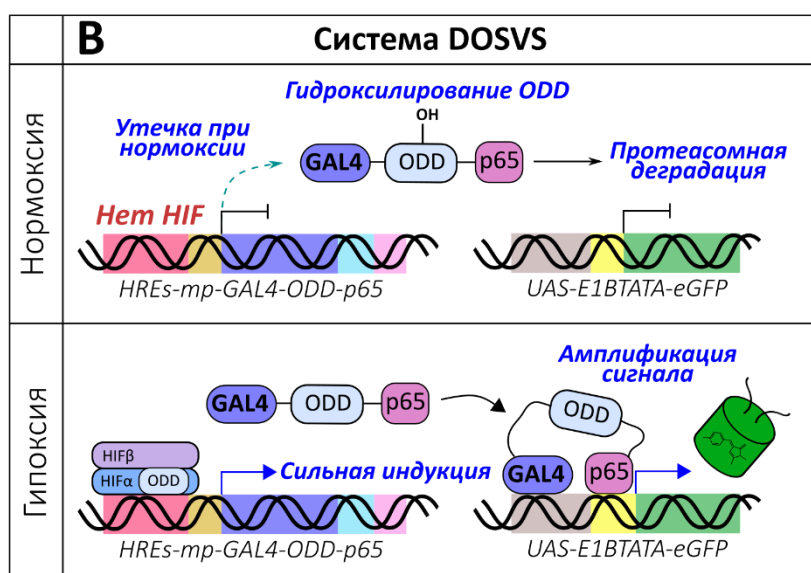
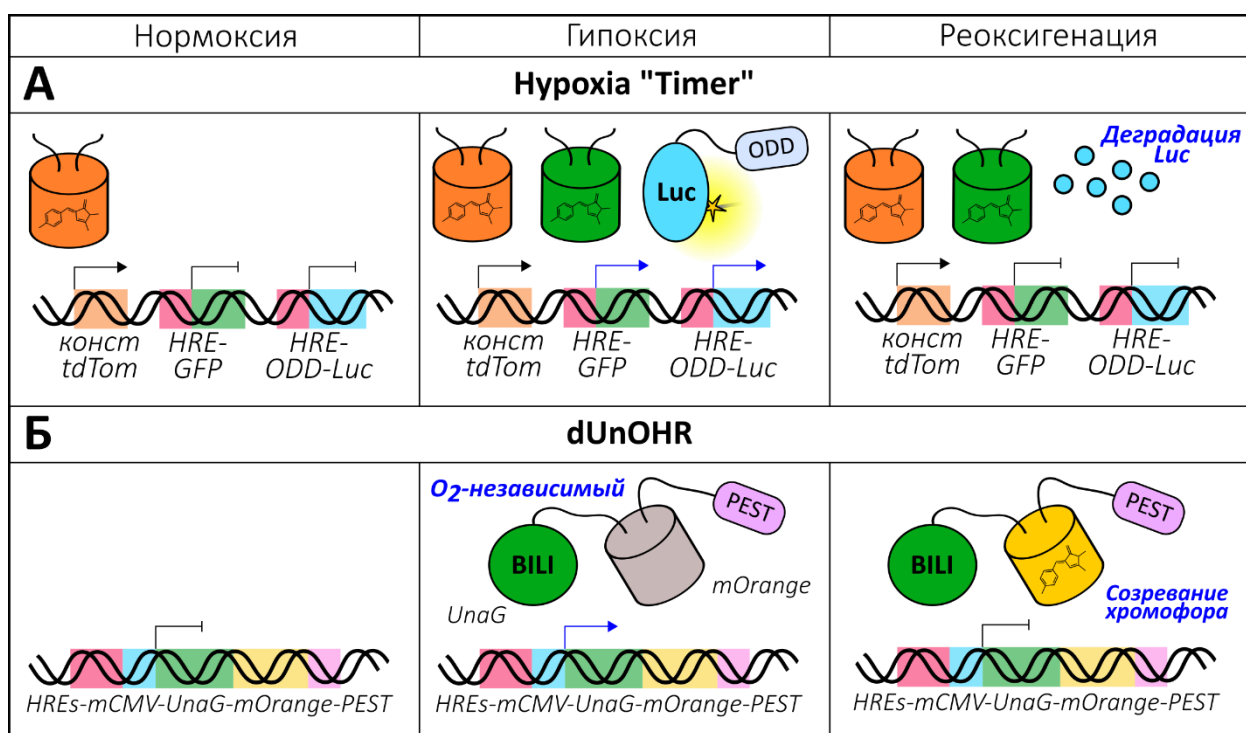
**Рисунок 19.** Транскрипционные репортеры на основе HREs (А) и комбинации HREs/ODD (Б). HIF – Hypoxia Inducible Factor. ODD – Oxygen-Dependent Degradation Domains. HREs – Hypoxia Response Elements. Пояснения в тексте.

их строением и функциональными характеристиками. В целом, для транскрипционных сенсоров важно различать активность (сила экспрессии в неактивном и активированном состояниях) и индукцию (соотношение этих сигналов). Независимые работы показывают, что увеличение количества копий HREs приводит к усилению активности системы в условиях гипоксии, поскольку множественные участки связывания HIF способствуют более сильной экспрессии [474–477]. Несмотря на то, что данное свойство на первый взгляд кажется привлекательным, реальная ситуация оказывается сложнее. Дело в том, что по мере добавления новых HREs, становится все более заметной протечка промотора в условиях нормоксии, что выражается в слабой индукции. Схожие наблюдения касаются и силы промотора: экспериментальные работы свидетельствуют, что очень мощные варианты, такие как CMV или EF-1α, не способны увеличивать свою активность в ответ на развитие гипоксии [475,478]. Не меньшую роль играет и природа HRE-элементов, которые могут быть получены из регуляторных участков генов, кодирующих такие белки



как енолаза, лактатдегидрогеназа, васкулярный эндотелиальный фактор роста, эритропоэтин, фосфоглицераткиназа и другие [474,479,480]. Наблюдаемая разница, по всей видимости, хотя бы отчасти связана с тем фактом, что данные последовательности содержат не только участки связывания HIF, но и другие функциональные регионы. Неизвестно, в какой мере это обстоятельство влияет на работоспособность обсуждаемых сенсоров в разных тканях, которые могут не совпадать по профилям экспрессии транскрипционных регуляторов. Чтобы преодолеть обозначенную проблему некоторые авторы предлагают использовать искусственные минимальные HIF-связывающие элементы [481]. Наконец, надо помнить, что сенсоры на основе HREs демонстрируют интенсификационные сигналы, что может приводить к артефактам, связанным с клеточной подвижностью или гетерогенностью экспрессии. Более того, состояние гипоксии само по себе вызывает арест трансляции и модулирует транскрипционные профили, потенциально сдвигая сигналы индикаторов в «неправильном» направлении. С целью преодоления данной проблемы многие коллективы предлагают использовать второй флуоресцентный белок, ген которого поставлен под контроль стабильного промотора, в качестве стандарта сравнения [482–485]. Впрочем, опубликованы работы, которые показывают, что в разных типах клеток «стабильные» промоторы также отвечают на гипоксию, причем в разной степени [486].

Пожалуй, наиболее выраженной проблемой транскрипционных сенсоров на основе HREs является задержка ответа при переходе от гипоксии к нормоксии (carry-over), связанная с уникальной стабильностью флуоресцентных белков. Так, известно, что время полураспада GFP в клетках составляет примерно 24 часа в зависимости от условий экспрессии [487,488]. Общая стратегия по улучшению временного разрешения обсуждаемых инструментов сводится к дестабилизации репортерного домена. В некоторых случаях авторы используют базовые дегроны, например, богатую остатками пролина, глутамата, серина и треонина последовательность PEST из орнитиндекарбоксилазы [489]. Однако, самым распространенным выбором является ODD из HIF $\alpha$ , который вызывает интенсивное разрушение флуоресцентного белка исключительно в условиях нормальной концентрации кислорода [490,491]. Важно отметить, что добавление ODD в сенсорную систему не только улучшает временное разрешение инструмента, но и значительно увеличивает силу индукции за счет эффективного устранения протечки промотора во время нормоксии [490] (**Рис. 19Б**). Некоторые работы предлагают дополнительно использовать элементы, вызывающие кислород-зависимую дестабилизацию мРНК репортера [474,475].



**Рисунок 20.** Некоторые сложные репортеры на основе HREs: (А) Hypoxia “Timer”, (Б) dUnOHR, (В) DOSVS. HIF – Hypoxia Inducible Factor. ODD – Oxygen-Dependent Degradation Domains. HREs – Hypoxia Response Elements. tdTom – tdTomato. Luc – люцифераза. mCMV – промотор из цитомегаловируса. PEST – дегрон, ускоряющий разрушение белка. BILI – билирубин. mp – слабый промотор. GAL4 – транскрипционный фактор. UAS – последовательность связывания GAL4. p65 – трансактиваторный домен. E1BTATA – промотор из аденовируса. Пояснения в тексте.

В завершении раздела стоит упомянуть тот факт, что HIF-зависимые сенсоры послужили платформой для разработки нескольких интересных инструментов. Среди них – Hypoxia Timer [492] и dUnOHR [493], которые позволяют различать три состояния (нормоксия, гипоксия и реоксигенация) на основании комбинации репортеров,

присутствующих в клетках. Hypoxia Timer состоит из конститутивно экспрессирующегося tdTomato, а также GFP и люциферазы под контролем HREs [492]. Однако, среди последних лишь люцифераза дестабилизирована при помощи ODD. Таким образом, в нормоксичных клетках присутствует только tdTomato, в гипоксичных – все три репортера, а в клетках, проходящих реоксигенацию, – tdTomato и GFP (**Рис. 20А**). Второй сенсор (dUnOHR) полагается на другой принцип [493]. Он представляет собой химерный полипептид, который находится под контролем HREs и состоит из mOrange, а также небольшого белка UnaG, приобретающего флуоресценцию при связывании билирубина. Соответственно, в условиях нормоксии клетки оказываются бесцветными, в условиях гипоксии – зелеными (эмиссия UnaG не зависит от кислорода, mOrange не может сформировать хромофор), а в условиях реоксигенации – зелено-оранжевыми (**Рис. 20Б**). Другим примечательным индикатором является система под названием DOSVS (Dual oxygen-sensing hypoxia responsive sensor/effector viral expression system) [476] (**Рис. 20В**). Ее особенность заключается в том, что ген флуоресцентного белка помещен под контроль UAS-элемента, активируемого GAL4/p65, который, в свою очередь, слит с ODD и находится под контролем HREs и слабого промотера. Таким образом, в условиях нормоксии слабый промотор дает минимальную протечку, которая эффективно устраняется за счет активности пролилгидроксилаз. При этом, когда клетки оказываются в условиях гипоксии, система обеспечивает крайне эффективную амплификацию сигнала.

### 1.3.5. FRET-сенсоры.

Фёрстеровский резонансный перенос энергии (FRET) представляет собой физическое явление, в рамках которого возбужденная молекула донора передает энергию молекуле акцептора безызлучательным путем [494]. В общем виде эффективность FRET описывается следующим уравнением [495]:

$$E = 1 / (1 + r^6 / r_0^6),$$

где  $r$  – расстояние между взаимодействующими диполями, а  $r_0$  – расстояние, при котором  $E = 50\%$ . Величина  $r_0$  зависит от многих факторов, перечисление которых выходит за рамки текущего обзора. Мы ограничимся упоминанием того, что выраженный перенос энергии может быть обнаружен лишь на расстояниях меньших, нежели 10 нм, а эффективный FRET требует соблюдения ряда условий: 1) значительное перекрытие спектров флуоресценции донора и поглощения акцептора (> 30%); 2) высокий квантовый

выход донора; 3) высокий коэффициент поглощения акцептора; 4) корректная ориентация магнитных моментов в пространстве.

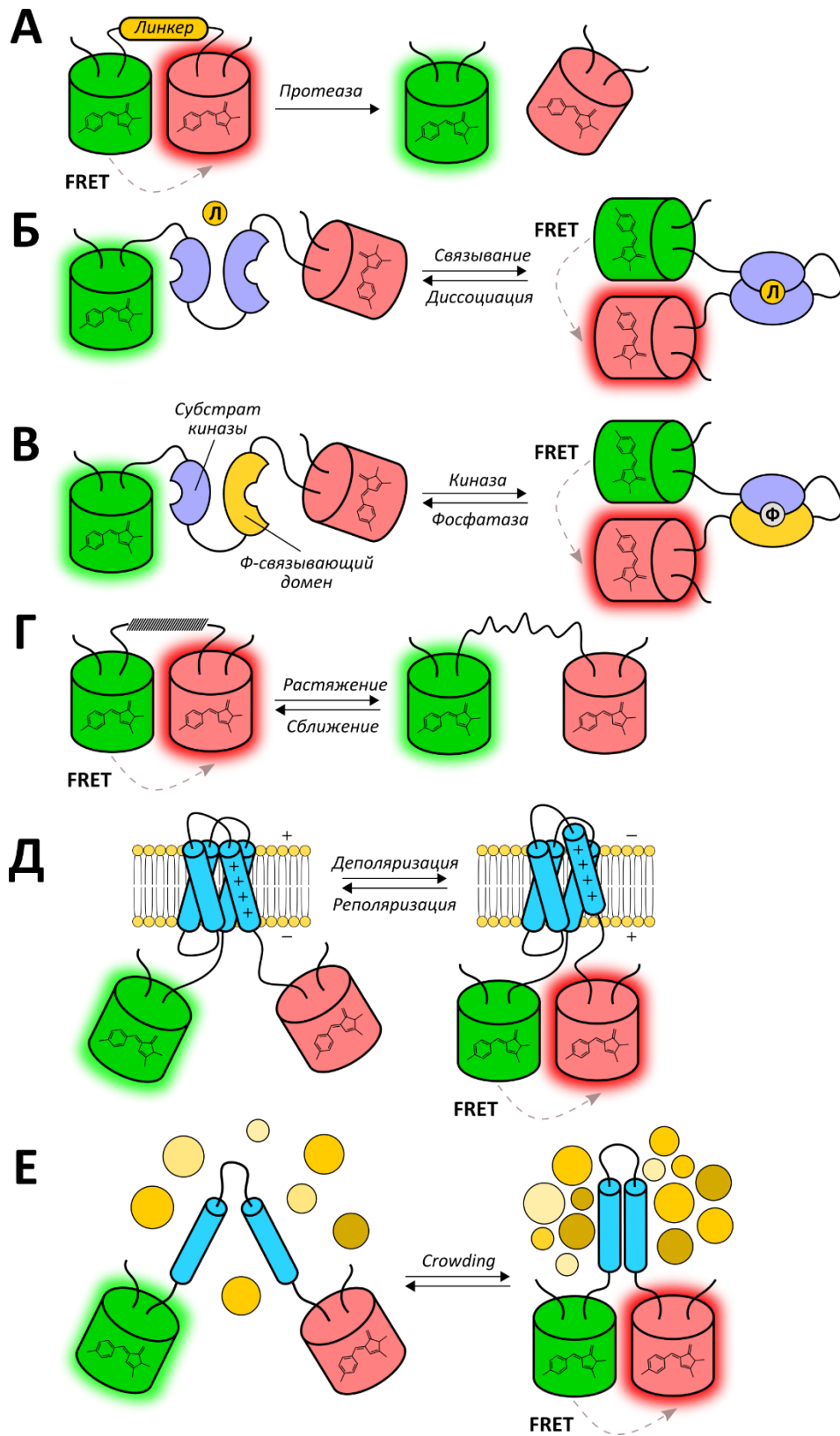
Первые работы, демонстрирующие FRET между флуоресцентными белками, были опубликованы еще в 1996 году двумя независимыми коллективами [344,496]. Авторы создали конструкции, в которых BFP и GFP с анионным хромофором были соединены линкерами, включающими в свой состав сайты узнавания различных протеаз – трипсина, энтеропептидазы и Фактора X<sub>a</sub>. Добавление соответствующих ферментов *in vitro* приводило к значительному падению эффективности переноса энергии, связанному с расхождением доменов в пространстве.

Уже через год Romoser [497] и Miyawaki [498] с коллегами предложили первые дизайны генетически кодируемых сенсоров для регистрации концентрации ионов кальция. В первом случае BFP и GFP были расположены по краям кальмодулин (CaM)-связывающего домена из киназы легких цепей миозина птиц. Когда очищенный препарат белка подвергали воздействию комбинации CaM/Ca<sup>2+</sup> *in vitro*, эффективность FRET значительно снижалась, что, по всей видимости, было вызвано распрямлением линкера. К сожалению, данный сенсор не был экспрессирован в эукариотической системе, а введение наработанного в бактериях белка при помощи инъекции в клетки линии HEK-293 показало, что максимальная амплитуда ответа инструмента существенным образом зависит от доступной концентрации кальмодулина [497]. Дизайн, предложенный Miyawaki и соавторами, оказался сложнее, что, впрочем, окупалось за счет увеличенной селективности. В рамках данной работы CFP и YFP были сшиты при помощи химерной последовательности, состоящей из CaM и M13 – CaM-связывающего пептида из киназы легких цепей миозина. Таким образом, оптические свойства обсуждаемого сенсора зависели только от концентрации кальция, поскольку он был обеспечен «собственной» молекулой кальмодулина. Интересно, что в данном случае связывание Ca<sup>2+</sup> приводило к более прочному взаимодействию между CaM и M13, что выражалось в увеличении эффективности FRET [498]. В дальнейшем полученный индикатор был назван Cameleon, что с одной стороны свидетельствует о его субстратной специфичности, а с другой стороны намекает на его способность менять цвет в зависимости от условий среды, как это делают животные хамелеоны. Cameleon стал настоящей революцией в области аналитической биохимии, поскольку он наконец преодолел основные недостатки искусственных флуоресцентных красителей для визуализации ионов кальция.

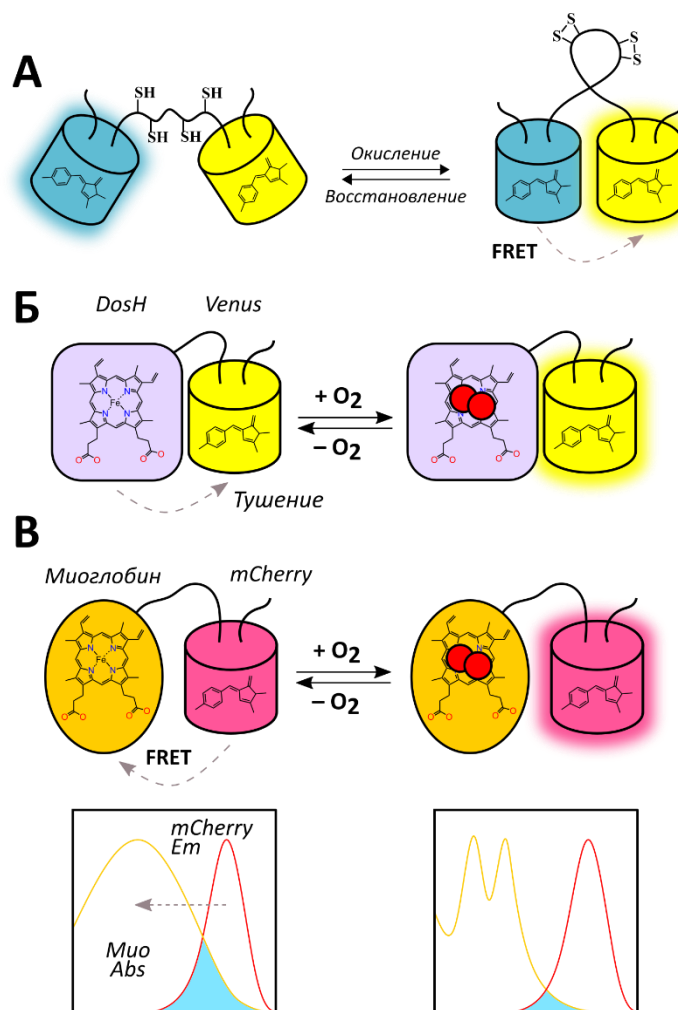
Среди всех групп генетически кодируемых сенсоров инструменты, основанные на FRET, обладают самым гибким дизайном, позволяющим регистрировать почти любое

молекулярное событие интереса. Данное обстоятельство сделало их, пожалуй, наиболее популярными индикаторами – количество опубликованных статей, описывающих разработку подобных белков, превышает несколько сотен. Таким образом, даже поименное перечисление аналитов, которые позволяют измерять FRET-пробы, не представляется разумным в рамках настоящего текста. Отметим лишь то, что список молекулярных переключателей, способных влиять на эффективность переноса энергии, впечатляет своим разнообразием. Как уже было сказано выше, существуют FRET-сенсоры на активность протеаз (**Рис. 21А**) и на связывание низкомолекулярных лигандов (**Рис. 21Б**) [499]. Другие классы инструментов задействуют реакции фосфорилирования/дефосфорилирования внутренних доменов, что позволяет визуализировать работу киназ и фосфатаз [500] (**Рис. 21В**). Интересная группа белков представляет собой FRET-модули, которые могут быть интегрированы в структурные белки с целью изучения внутримолекулярных сил, воздействующих на цитоскелет в ходе механической деформации клетки или ее частей [501,502] (**Рис. 21Г**). Множество лабораторий по всему миру занимается разработкой FRET-сенсоров мембранного потенциала, улавливающих конформационные изменения в вольтаж-чувствительных доменах [503] (**Рис. 21Д**). Наконец, единичные работы описывают создание таких интересных инструментов, как пробы на молекулярную скученность (macromolecular crowding) [504] (**Рис. 21Е**).

Впрочем, существует некоторый парадокс: несмотря на невероятную популярность индикаторов на основе FRET, в сфере редокс-биологии они применяются не особо активно. По всей видимости, это связано с тем, что специфичные окислительно-восстановительные процессы редко приводят к очень выраженным конформационным перестройкам белков, которые могут существенно повлиять на эффективность переноса энергии. В рамках одного из возможных подходов авторы соединили ECFP и EYFP при помощи искусственного линкера (RL7), обогащенного остатками цистеинов [505] (**Рис. 22А**). Это позволило получить сенсор на общий редокс-статус клетки с достаточно высоким окислительно-восстановительным потенциалом (-143 мВ), который может быть использован в окисляющих компартментах. К сожалению, его детальный профиль селективности не был охарактеризован в достаточной мере. В других работах FRET-пары помещали по краям доменов, происходящих из белков Orp1 и Yap1, которые являются природной сенсорной системой на пероксид водорода в дрожжевых клетках. Так были получены индикаторы OxyFRET, PerFRET [506] и Redoxfluor [507]. Несмотря на то, что



**Рисунок 21.** Некоторые структурные классы FRET-сенсоров. (А) Сенсоры на активность протеаз. (Б) Сенсоры, измеряющие концентрацию лигандов. (В) Сенсоры на активность киназ/фосфатаз. (Г) Сенсорные модули, регистрирующие внутримолекулярные силы. (Д) Сенсоры мембранного потенциала. (Е) Сенсоры на молекулярную скученность (crowding). Л – лиганд. Ф – остаток фосфата. Пояснения в тексте.



**Рисунок 22.** Некоторые примеры FRET-индикаторов из области редокс-биологии. (А) Эффективность переноса энергии модулируется путем образования дисульфидных связей в линкере, соединяющим флуоресцентные белки. (Б) Сенсор на концентрацию кислорода ANA-Y, основанный на гем-содержащем белке DosH и флуоресцентном белке Venus. (В) Сенсор на концентрацию кислорода Myo-mCherry, основанный на миоглобине и флуоресцентном белке mCherry. Em – спектр эмиссии. Abs – спектр поглощения. Пояснения в тексте.

дизайн данных проб подразумевает специфичность в отношении  $\text{H}_2\text{O}_2$ , ни одна из них не была детально охарактеризована *in vitro* в отношении панели редокс-активных соединений. Схожий принцип функционирования лежит в основе инструмента под названием CROST, который представляет собой mTurquoise и sr-mVenus, расположенные по краям тиоредоксин-чувствительного белка CP12 из хлоропластов [508]. Некоторые редокс-индикаторы, основанные на FRET, улавливают конформационные перестройки, которые происходят в сенсорном домене при связывании низкомолекулярного лиганда. В частности, это обеспечивает работу NADP<sub>ox</sub>, сенсора на концентрацию  $\text{NADP}^+$  в клетке [509]. Наконец, не все FRET-индикаторы полагаются на изменение расстояния или угла

между дипольными моментами хромофоров, входящих в состав репортерных модулей. ANA-Y представляет собой химеру, в состав которой входят флуоресцентный белок Venus и гем-содержащий регуляторный домен DosH, полученный из бактериальной фосфодиэстеразы DosP [510]. В интактном состоянии DosH эффективно тушит эмиссию Venus, однако, связывание молекулярного кислорода изменяет его оптические свойства, что усиливает флуоресценцию репортера (**Рис. 22Б**). Аналогичный механизм обеспечивает работу сенсора Myo-mCherry – в отсутствие O<sub>2</sub> миоглобин служит темным акцептором энергии [511] (**Рис. 22В**).

Основным способом считывания сигналов индикаторов, основанных на переносе энергии, служит радиометрический FRET. В рамках данного подхода исследователи возбуждают флуоресценцию донора, после чего регистрируют соотношение квантов света, высвеченных донором и акцептором. Важно понимать, что эта техника требует предварительной работы по калибровке системы, поскольку обсуждаемый показатель зависит от эффективности FRET нелинейно. Более того, камеры и фильтры, используемые в флуоресцентных микроскопах, принципиально отличаются от спектральных сканеров, поскольку они демонстрируют неодинаковые профили чувствительности к различным регионам спектра. В течение долгого времени, цианово-желтые пары оставались наиболее популярными комбинациями для визуализации переноса энергии. Во многом, их практическая привлекательность базировалась на высоких квантовых выходах производных CFP. Основные белки, которые задействуют в разработке таких инструментов, представлены Aquamarine [354], mCerulean3 [356], mTurquoise2 [357] и mTFP1 [512] в качестве доноров, а также YPet [355], mCitrine [360], sEYFP [362] и mVenus [363] в качестве акцепторов. Однако, цианово-желтые FRET-пары обладают рядом существенных недостатков, к которым относятся спектральный кросс-ток, фототоксичность возбуждающего света, низкая фотостабильность желтых вариантов, а также их возможные фотоконверсии [513]. Более того, известно, что зависимость эффективности переноса энергии от  $r$  имеет сигмоидный характер, и максимальные количественные изменения будут наблюдаться в том случае, если инструмент функционирует вокруг  $r_0$ . К сожалению, цианово-желтые пары демонстрируют достаточно низкие значения данного параметра, в то время как хромофоры не могут быть сближены на достаточное расстояние из-за белкового окружения. Таким образом, сенсоры на основе CFP-YFP работают в диапазонах расстояний, достаточно далеких от  $r_0$  [513]. Возможным решением описанных проблем является переход на зелено-красные варианты, которые обеспечивают лучшее разделение спектров, а также нуждаются в возбуждающем свете,



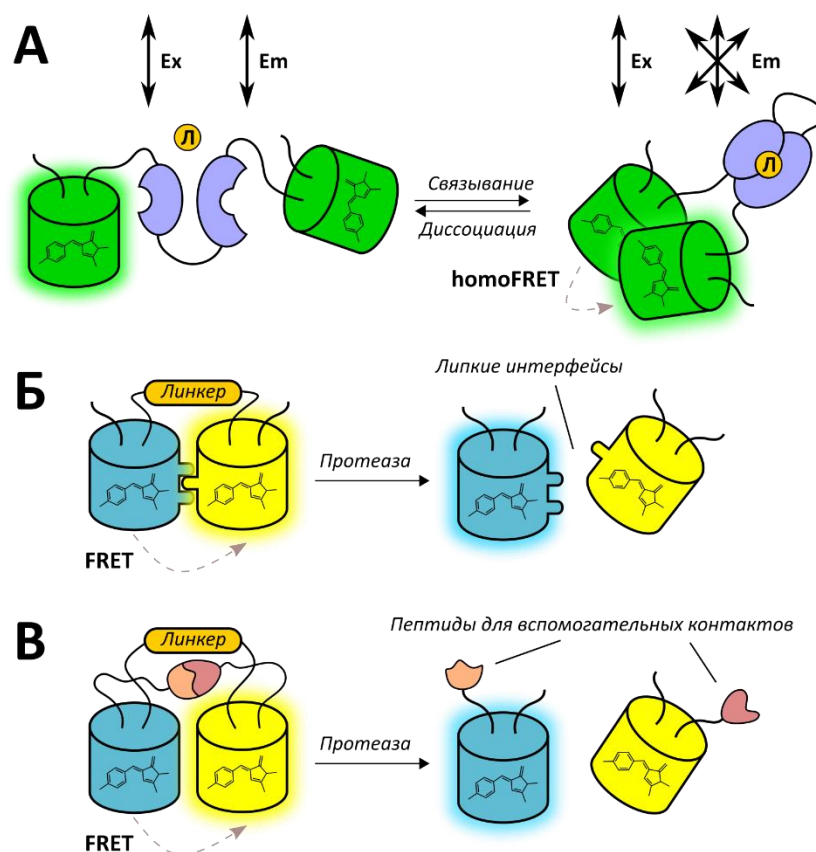
менее токсичном для клеток и вызывающем меньшие уровни автофлуоресценции. До недавнего времени предложенная стратегия осложнялась низкой яркостью красных флуоресцентных белков, однако разработка таких вариантов как mRuby2 [513] и mRuby3 [397] позволила преодолеть это ограничение. В качестве популярных партнеров для упомянутых модулей выступают mClover3 [397] и mNeonGreen [398]. Важно также отметить, что пары mClover3-mRuby3 и mNeonGreen-mRuby3 демонстрируют одни из наибольших значений  $r_0$ , составляющие около 6.5 нм [397].

Одной из существенных технических сложностей, возникающих при использовании FRET-сенсоров, является тот факт, что они занимают достаточно широкие оптические окна, что существенно осложняет мультипараметрические эксперименты из-за возникающего кросс-тока между пробами. Возможные комбинации флуоресцентных белков, которые позволяют преодолеть это ограничение, представлены mOrange2-mCherry/CFP-YFP [514], а также mTagBFP-sfGFP/mVenus-mKOok [515]. Впрочем, надо понимать, что необходимость переключения оптических настроек для регистрации сигналов, существенно снижает скорость детекции и, тем самым, ограничивает возможность визуализации быстрых событий. В качестве решения данной проблемы независимые авторы предлагают использовать LSS-FPs, что уменьшает количество возбуждающих источников света. В качестве примеров стоит упомянуть следующие комбинации, которые были проверены на практике: mAmetrine-tdTomato/mTFP1-mCitrine [516], T-Sapphire-dimer2/ECFP-EYFP [517] и LSSmOrange-mKate2/CFP-YFP [390].

Сложности при мультипараметрической визуализации также могут быть преодолены путем задействования альтернативных способов считывания сигнала. Известно, что резонансный перенос энергии создает дополнительный способ релаксации возбужденного состояния, что приводит к снижению времени жизни флуоресценции. FLIM-FRET обладает рядом практических преимуществ, среди которых наиболее важными являются отсутствие зависимости сигнала от концентрации, а также устранение проблем, связанных с протеканием возбуждающего света в канал поглощения акцептора [518]. Обсуждаемая технология также менее чувствительна к интенсивности сигнала, что облегчает визуализацию флуоресценции в глубоких слоях тканей [519,520]. Более того, перечисленные качества могут быть дополнительно усилены использованием темных FRET-акцепторов, таких как REACh [521] и его улучшенная версия sREACh [522], а также ShadowG [523]. В одной из работ FLIM задействовали в мультипараметрических экспериментах для одновременной визуализации сенсоров на основе TagRFP-mPlum и ECFP-Venus [524]. К сожалению, регистрация времени жизни флуоресценции требует

сложного оборудования, доступного далеко не во всех лабораториях, а также подразумевает достаточно большое время накопления сигнала. Другой метод заключается в сравнении интенсивности эмиссии донора до и после фотообесцвечивания акцептора. Важно отметить, что эта техника требует не просто элиминацию флуоресценции молекулы, но и устранение поглощения. Однако, некоторые акцепторы, как мы писали выше, могут претерпевать фотоконверсию [525,526], что будет выражаться в потере эмиссии с сохранением FRET и, соответственно, в недооценке эффективности переноса энергии. Обычно считается, что фотообесцвечивание является «одноразовым» методом, который не может быть задействован для многократных измерений. Данная проблема может быть преодолена за счет использования белков с обратимой фотоконверсией, сдвигающей их спектры поглощения. В качестве примеров можно упомянуть rsTagRFP [527] и Phanta [528]. Преимуществом последнего является отсутствие флуоресценции, что облегчает его использование в мультипараметрических сериях.

Интересная группа сенсоров, задействующих перенос энергии, представлена так называемыми homoFRET-пробами (Рис. 23А). Примером редокс-индикатора, работающего согласно данному принципу, является Apollo-NADP<sup>+</sup>, сконструированный на основе каталитически неактивной глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы [529]. Известно, что связывание специфического анализа вызывает димеризацию этого белка, что приводит к пространственному сближению флуоресцентных доменов. Обработка GFP-подобных полипептидов поляризованным светом возбуждает небольшую порцию молекул, хромофоры которых ориентированы строго определенным образом [530]. Поскольку характерное время вращения данных соединений значительно превышает времена жизни их флуоресценции [531], испускаемый свет оказывается также поляризованным (фотоселекция) [532]. Однако, в том случае, если между двумя одинаковыми доменами происходит homoFRET, анизотропия флуоресценции заметно возрастает, что может быть обнаружено при помощи специализированного оборудования [533]. Помимо Apollo-NADP<sup>+</sup> данный принцип лежит в основе функционирования сенсоров, регистрирующих агрегацию липидов [534], олигомеризацию мембранных белков [535] или же компонентов цитоскелета [536]. Более того, известные heteroFRET-индикаторы могут быть конвертированы в homoFRET-формы с целью сужения оптических окон, занимаемых данными белками [537,538]. Подобная стратегия значительно облегчает мультипараметрические исследования. Кроме того, привлекательной чертой поляризационной микроскопии является то, что она не очень чувствительна к интенсивности эмиссии [539,540].



**Рисунок 23.** Некоторые специальные технологии в сфере FRET-индикаторов. **(А)** Общий принцип функционирования homoFRET-сенсоров. Двойные стрелки отображают поляризацию возбуждающего света ( $E_x$ ) и испускаемого света ( $E_m$ ). Л – лиганд. **(Б)** Липкие интерфейсы, усиливающие FRET, на примере сенсора, визуализирующего активность протеаз. **(В)** Использование пептидов, обеспечивающих вспомогательные контакты, для усиления FRET. Пояснения в тексте.

Одним из самых существенных недостатков большинства, но не всех, FRET-сенсоров является достаточно низкая амплитуда ответа. Отчасти, данная проблема связана с тем, что хромофоры флуоресцентных белков спрятаны в глубине  $\beta$ -баррелей, что значительно ограничивает их сближение в пространстве. На практике эффективность переноса энергии между GFP-подобными полипептидами обычно не превышает 50% [513,541]. Возможное решение проблемы заключается во внесении «липких» интерфейсов на поверхность репортерных доменов, которые обеспечивают дополнительные контакты донора и акцептора в сближенном состоянии (**Рис. 23Б**). Впервые такие мутации были обнаружены при разработке CyPet-YPet – замены Ser208Phe и Val224Leu создают гидрофобные поверхности, эффективно взаимодействующие друг с другом [542]. На практике «липкие» интерфейсы позволили оптимизировать сенсоры для детекции ионов цинка [543] и желчных кислот [544]. Позже аналогичные мутации были задействованы

для усовершенствования FRET-пары на основе красных (mOrange и mCherry) флуоресцентных белков [545]. Существует схожая стратегия, которая заключается в модификации донора и акцептора за счет присоединения небольших пептидов, обеспечивающих вспомогательные контакты [546] (**Рис. 23В**). Другая проблема FRET-сенсоров происходит из их «громоздкости», что в значительной мере усложняет генетические манипуляции по доставке инструментов в клетки, а также по их селективной экспрессии в субклеточных компартментах. Более того, большое количество доменов создает стерические ограничения, препятствующие доступу биохимических партнеров. В частности, показано, что некоторые сенсоры на активность киназ демонстрируют существенную задержку на стадии дефосфорилирования [518]. Наконец, стоит помнить, что донор и акцептор должны удовлетворять не только стандартам в отношении оптических параметров. Различная температурная или pH-чувствительность используемых белков могут вносить выраженные артефакты в измерения [547]. Впрочем, не возникает сомнения, что в ближайшие годы FRET-сенсоры останутся наиболее популярными представителями генетически кодируемых проб, и с их помощью будет совершено множество интересных открытий.

### *1.3.6. Сенсоры, основанные на Proximity Imaging (PRIM).*

Как было сказано выше, сенсоры на основе FRET обладают не только множеством привлекательных свойств, но и рядом недостатков, среди которых наиболее значимыми с практической точки зрения являются большой молекулярный вес и использование относительно широкого оптического окна. Первый фактор осложняет создание трансгенных организмов и направленную экспрессию инструментов в различных органеллах клетки, в то время как второй фактор ограничивает их использование в мультипараметрических экспериментах. Оптимальный класс сенсоров должен демонстрировать универсальность дизайна, характерную для FRET-проб, но при этом – быть лишенным их «громоздкости». В идеале, это должен быть единственный флуоресцентный белок, оптические свойства которого изменяются под действием событий, протекающих в чувствительном домене, как это происходит в случае roGFP с адаптерами. Однако, дизайн редокс-активных флуоресцентных белков является слишком частным и не может быть промасштабирован на такое количество молекулярных событий, как это позволяют сделать FRET-индикаторы.

Интересной, но, к сожалению, все еще недостаточно универсальной технологией на данном пути стал Proximity Imaging (PRIM). Сравнение спектров возбуждения

флуоресценции свободного GFP и его химеры с глутатион-S-трансферазой выявляет достоверную разницу в соотношении Ex395/Ex475 нм, которое оказывается выше в случае слитого полипептида [548]. Данный эффект исчезает после обработки препаратов 2.2 М гуанидин хлоридом, что позволяет предположить связь наблюдаемого феномена с пространственным сближением флуоресцентных белков, вызванным димеризацией за счет тага. Два возможных механизма могут лежать в основе такого поведения. Первый заключается в том, что физический контакт  $\beta$ -баррелей вызывает конформационные перестройки в третичной структуре, а второй предполагает изменение оптических свойств за счет электродинамических взаимодействий между близко расположенными хромофорами. Дальнейшие эксперименты подтвердили первую гипотезу, поскольку в том случае, когда в качестве партнера для димеризации выступает мутант GFP, не способный к автокаталитическому созреванию, спектральный сдвиг сохраняется [548].

Интересными примерами индикаторов, основанных на PRIM, являются термочувствительные GFP (tsGFPs, temperature sensitive GFPs) [549]. В качестве сенсорного домена данные инструменты используют TrpA, белок из *Salmonella sp.*, который контролирует экспрессию генов в зависимости от температуры окружающей среды [550]. Индивидуальные молекулы TrpA способны димеризоваться за счет спираль-спиральных взаимодействий, при этом в диапазоне температур от 35°C до 40°C связывающиеся участки претерпевают обратимую денатурацию, что влияет на соотношение белковых форм. Охлаждение среды приводит к тому, что химерные конструкции, состоящие из GFP и TrpA, вступают в контакт, сближая флуоресцентные домены в пространстве и, тем самым, влияя на соотношение Ex400/Ex480 нм [549]. Локализованные версии tsGFPs были использованы для субклеточной визуализации термогенеза в митохондриях адипоцитов из бурой жировой ткани, а также в эндоплазматической сети скелетных мышц [549]. Еще одним примером сенсора, основанного на PRIM, выступает GFP, слитый с гликозилфосфатидилинозитолом, который позволяет регистрировать плотность упаковки белковых молекул в липидных рафтах [551].

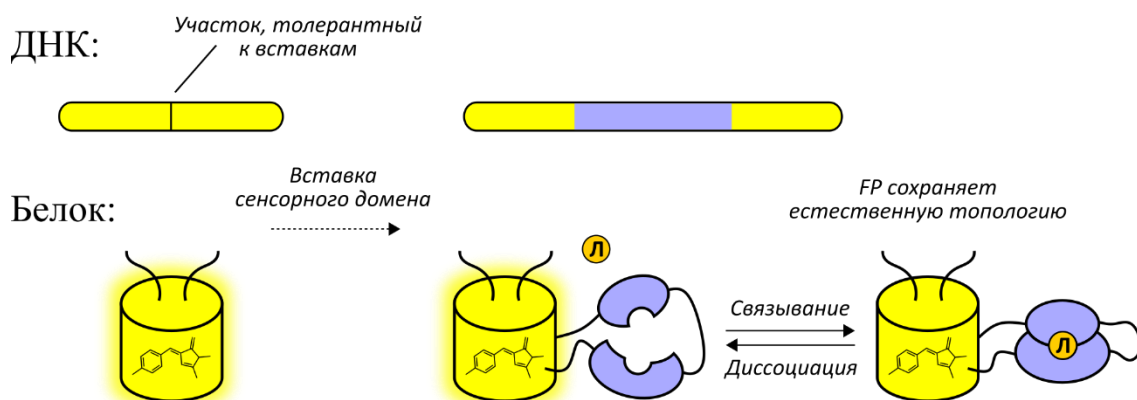
К сожалению, PRIM-индикаторы не нашли широкое практическое применение, поскольку они обладают критическими недостатками. Самыми очевидными из них являются крайне низкие амплитуды ответа, а также строгое использование димеризации в качестве молекулярного переключателя. В принципе, обсуждаемая технология может быть адаптирована и для других биохимических событий – например, интеграция тандемного димера флуоресцентных белков (он был назван PriSSM) между двумя

моторными доменами миозина II позволила разработать инструмент, регистрирующий функциональное состояние цитоскелета [552]. В данном случае изменение степени ассоциации репортерных доменов происходит за счет конформационных перестроек в сенсорной части. Наверное, аналогичные модули могут быть использованы и в других случаях. Однако, такой подход не обладает перспективой, поскольку он «утяжеляет» индикатор на один домен, тем самым стирая существенные преимущества технологии по сравнению с FRET-пробами. Впрочем, как и homoFRET, PRIM все еще представляет собой интересный способ визуализации объединения идентичных белков. Это особенно важно в свете того факта, что арсенал имаджинговых технологий, которые могут быть задействованы для решения данной задачи, не так уж велик.

### 1.3.7. Сенсоры с Camgargo-топологией.

Зависимость оптических свойств хромофора от его микроокружения открывает широкие возможности по сопряжению сигналов GFP-подобных белков с конформационными изменениями, происходящими в сенсорных полипептидах. Однако, как мы писали ранее, флуоресцентные белки, по всей видимости, эволюционировали по пути усиления защиты хромофора от окружающей среды, что привело к их уникальной стабильности в отношении повреждающих факторов [280–282]. Таким образом, те свойства, которые обеспечивают возможность экспрессии данных молекул почти в любых живых системах и, тем самым, сделали их настолько популярными аналитическими инструментами, препятствуют разработке генетически кодируемых сенсоров с высокими амплитудами ответа. Ситуация осложняется тем фактом, что природные N- и C-концы данных полимеров находятся достаточно далеко от хромофорного окружения [275,276], поэтому интеграция флуоресцентных белков в подвижные регионы даже очень гибких сенсоров почти всегда приводит к индикаторам с неудовлетворительными свойствами. В качестве примера можно привести вольтажные пробы FlaSh [553] и SPARC [554], которые были сконструированы согласно описанному принципу. И хотя данные сенсоры в свое время стали настоящими научными прорывами, они демонстрируют скромные ответы величиной около 5% и 0.5% на 100 мВ, соответственно.

Первые попытки интегрировать чужеродные пептиды в структуру GFP были предприняты Abedi и коллегами еще в 1998 году [555]. На тот момент фаговый дисплей и дрожжевая дигибридная система стали популярными методами изучения белок-белковых взаимодействий, однако, первый подход не мог быть использован *in vivo*, в то время как



**Рисунок 24.** Общие принципы строения и функционирования сенсоров с Samgargo-топологией. Л – лиганд. FP – флуоресцентный белок. Пояснения в тексте.

второй был ограничен лишь достаточно большими интерфейсами. Авторы предполагали, что жесткая укладка GFP, чем-то напоминающая структуру иммуноглобулинов [556], позволит удерживать вставленные фрагменты в их естественной конформации [555]. Более того, флуоресцентные свойства носителя могли быть потенциально использованы для упрощения некоторых манипуляций с получаемой библиотекой. В общей сложности коллектив проверил десять позиций, три из которых оказались устойчивыми к вставкам небольших пептидов, что заключалось в отсутствии выраженной потери флуоресцентных свойств [555].

Выше мы уже обсуждали, что первые FRET-сенсоры, Cameleons, были опубликованы в 1997 году [498]. Важно понимать, что пара из кальмодулина и M13 представляет собой очень подвижный линкер, способный за счет своих конформационных сдвигов существенным образом менять эффективность переноса энергии от донора к акцептору. Однако, известно, что многие сенсорные молекулы не демонстрируют настолько выраженные структурные перестройки в ходе своего функционирования и потому плохо подходят для разработки проб на основе FRET. Doi и Yanagawa были первыми, кто предположил, что интеграция конформационно-подвижного полипептида в область GFP, контактирующую с хромофором, может привести к сопряжению оптических свойств конструкции и параметров окружающей среды [557]. Дополнительным источником вдохновения послужил следующий факт: в конце XX века было показано, что ферменты, несущие чужеродную вставку, изменяют свою каталитическую активность под воздействием антител к данному эпитопу [558,559]. Для проверки описанной гипотезы, авторы интегрировали TEM1  $\beta$ -лактамазу (Bla-1), которая способна взаимодействовать с ингибиторным белком (BLIP) и изменять свою пространственную укладку, между 172-им и 173-им остатками GFP (данная позиция была найдена Abedi [555]) [557]. После двух

раундов случайного мутагенеза коллектив получил функциональную пробу под названием GFP::Bla-1 [557]. И хотя созданный индикатор не представлял большого практического интереса, он послужил первым доказательством того, что даже небольшие конформационные перестройки могут быть эффективно сопряжены с оптическими параметрами флуоресцентных белков.

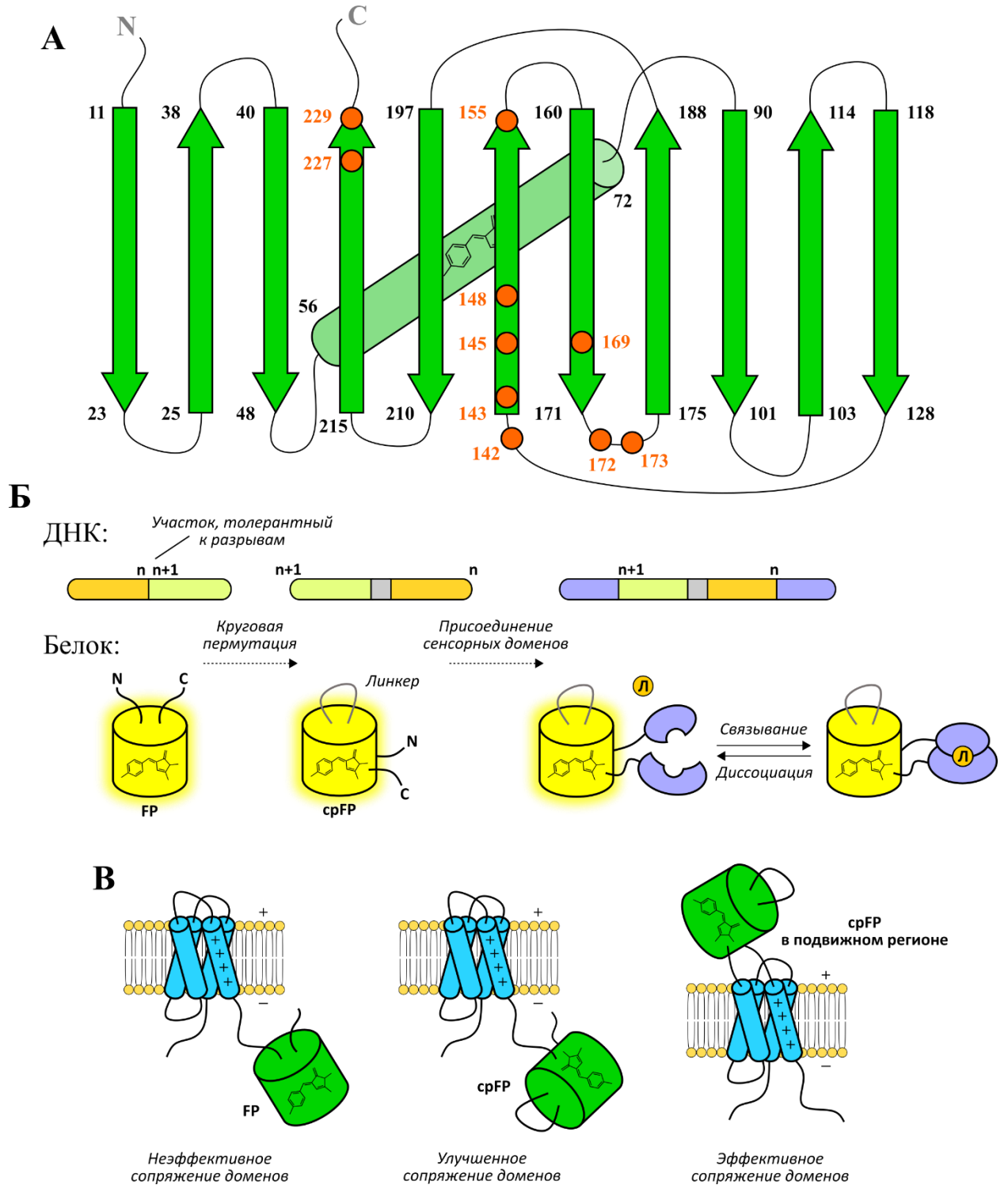
В том же самом году Baird и соавторы продемонстрировали, что интеграция кальмодулина после Tyr145 способна конвертировать ECFP, EGFP и EYFP в генетически кодируемые сенсоры на концентрацию  $\text{Ca}^{2+}$  [560]. Среди полученных химер желтый вариант характеризовался наибольшей амплитудой ответа (около 7 раз), которая была значительно выше аналогичного параметра для всех кальциевых сенсоров, опубликованных на тот момент [560]. В дальнейшем этот белок стал известен под названием Camgargoо, представляющим собой игру слов вокруг его архитектурной организации – кальмодулин выступает в роли своеобразной «сумки» на поверхности EYFP. Camgargoо послужил модельным индикатором для разработки целого семейства инструментов с аналогичной топологией (**Рис. 24**). В качестве примеров можно упомянуть: Camgargoо-2 для детекции  $\text{Ca}^{2+}$  [359], Green cGull для детекции cGMP [561], Flamindo [562], Flamindo2 [563] и Pink Flamindo [564] для детекции cAMP; GINKO-1 для детекции  $\text{K}^+$  [565], а также зеленый и красный индикаторы (iGluSnFRs) [566] для визуализации глутамата.

Несмотря на то, что Camgargoо-подобные сенсоры обеспечили настоящую революцию в разработке генетически кодируемых индикаторов, они обладают существенным недостатком. Дело в том, что интегрируемый чувствительный белок обязан демонстрировать два свойства – во-первых, его N- и C-концы должны быть сближены в пространстве, и, во-вторых, связывание аналита интереса должно влиять не просто на конформацию каких-либо регионов внутри молекулы, а на относительное расположение терминальных групп. И хотя многие природные белки соответствуют данным требованиям, это далеко не универсальное правило.

### *1.3.8. Сенсоры на основе круговых пермутантов флуоресцентных белков.*

Родственной группой Camgargoо-подобным индикаторам являются сенсоры на основе круговых пермутантов флуоресцентных белков (cpFPs, circularly permuted Fluorescent Proteins) [567]. Данные инструменты не только возникли в одно и то же время,





**Рисунок 25.** Общие принципы строения и функционирования сенсоров на основе круговых пермутантов флуоресцентных белков (срFP). **(А)** Упрощенная топология GFP. Числа соответствуют номерам аминокислотных остатков. Красными кругами обозначены позиции, доступные для круговой пермутации, которые обнаружили Baird и коллеги. **(Б)** Общая логика создания сенсоров на основе срFP. FP – флуоресцентный белок с естественной топологией. Л – лиганд. **(В)** Демонстрация того, как технология срFP помогла усовершенствовать генетически кодируемые индикаторы мембранного потенциала. Пояснения в тексте.

но и функционируют на основе одинакового принципа – конформационные изменения в чувствительной части воздействуют на микроокружение хромофора. Круговая пермутация представляет собой химическую модификацию первичной структуры белка, в рамках которой исходные концы молекулы соединяют линкером достаточной длины, а новые терминальные группы выносят в произвольное положение [568]. Схожий процесс в случае нуклеиновых кислот называется ник-трансляцией [569]. В ранних исследованиях круговую пермутацию осуществляли на уровне полипептида через серию посттрансляционных модификаций. Таким образом был получен пермутант бычьего панкреатического ингибитора трипсина [570]. Однако, в более поздних работах все требуемые процедуры стали осуществлять на уровне генов. Следует отметить, что первые исследования в обсуждаемой области были исключительно структурными. Они позволили доказать, что в большинстве случаев корректное сворачивание белка не зависит от положения его концов и преимущественно управляется относительной последовательностью соединения аминокислотных остатков в цепи. В частности, различным коллективам удалось получить функциональные пермутанты таких полипептидов как фосфорибозил-антранилатизомераза [571], аспарат-транскарбомоилаза [572], SH3 домен  $\alpha$ -спектрина [573], ингибитор химотрипсина 2 [574], а также тиол-дисульфид-оксидоредуктаза DsbA [575]. Несмотря на то, что природные N- и C-концы флуоресцентных белков расположены недалеко друг от друга, что является важным условием для круговой пермутации, может показаться, что их жесткие  $\beta$ -складчатые структуры не могут быть подвергнуты такой «радикальной» процедуре. Однако, две работы, опубликованные в один год, экспериментально продемонстрировали, что сrFPs способны сохранять свои оптические свойства [560,576]. Ожидаемо, большая часть эффективных сайтов пермутации располагается в петлях, соединяющих  $\beta$ -листы, впрочем, некоторые удачные точки разрыва могут быть найдены и в последних – в том числе, в непосредственной близости к хромофору [560] (**Рис. 25А**).

Почему сrFPs так интересны и важны для создания генетически кодируемых сенсоров? Как мы писали выше, Camgagoo-подобные индикаторы налагают определенные пространственные ограничения на чувствительные модули, используемые на стадии разработки. В то же самое время, сrFPs представляют собой «дестабилизированные» репортерные домены, которые могут быть напрямую интегрированы в конформационно подвижные регионы белков интереса (**Рис. 25Б**). Данная идея настолько очевидно «витаала в воздухе», что всего спустя два года после публикации работ, упомянутых выше, два независимых коллектива представили миру сrFP-зависимые индикаторы концентрации

Ca<sup>2+</sup>, основанные на фрагменте киназы легких цепей миозина (M13) и кальмодулине. G-CaMP [577] и Pericams [578] обладали настолько выдающимися свойствами, что за последние десятилетия обсуждаемый дизайн стал своеобразным «золотым стандартом» при создании многих аналитических инструментов на основе флуоресцентных белков.

Пожалуй, история разработки генетически кодируемых сенсоров мембранного потенциала в наилучшей мере иллюстрирует преимущества топологии на основе сrFPs (**Рис. 25B**). Одним из первых индикаторов, принадлежащих обсуждаемой группе, был VSFP1, полученный путем присоединения FRET-пары, состоящей из CFP и YFP, к С-концу вольтаж-чувствительного домена из потенциал-зависимого калиевого канала [579]. К сожалению, данная конструкция демонстрировала неудовлетворительную мембранную локализацию при гетерологичной экспрессии в нейронах. Решением проблемы стало использование фрагмента вольтаж-зависимой фосфатазы из *Ciona intestinalis* (Ci-VSD) в качестве сенсорного модуля. В дальнейшем VSFP2.1 [580] был улучшен, в частности, в одной из версий (VSFP3.1) [581] FRET-пару заменили на единственный флуоресцентный белок, что сузило оптическое окно, занимаемое индикатором, и, тем самым, благоприятствовало его использованию в мультипараметрических экспериментах. Однако, VSFP3.1 обладал крайне низкой амплитудой ответа и неудовлетворительной разрешающей способностью во времени.

Многочисленные успехи, достигнутые при разработке сrFP-зависимых кальциевых сенсоров, стимулировали попытки задействовать обсуждаемую технологию при создании вольтажных индикаторов, поскольку существовала надежда, что это позволит улучшить их динамический диапазон или же кинетические свойства. VSFP-сrmKate стал первым примером, который продемонстрировал принципиальную возможность такого дизайна [582]. Данный индикатор был получен путем присоединения кругового пермутанта mKate, несущего разрыв в одной из гибких петель, к С-концу Ci-VSD. Авторы также предприняли попытки использовать сrGFP, а также пермутант mKate с концами, вынесенными на поверхность β-листа, в качестве репортерных доменов, однако такие конструкции обладали слишком низкой яркостью [582]. К сожалению, VSFP-сrmKate демонстрировал слишком низкую амплитуду ответа, а также крайне медленную кинетику, что препятствовало его практическому использованию. Несмотря на это, спустя пару лет аналогичный дизайн был задействован другим коллективом при разработке ElectricPк [583] (**Рис. 25B**). В качестве репортерного модуля авторы выбрали сrEGFP, при этом в отличие от VSFP-сrmKate область разрыва его полипептидной цепи находилась на поверхности бочонка. ElectricPк оказался лучшей версией из библиотеки,

включавшей 90 вариантов, которые различались строением линкеров между доменами. И хотя он все еще обладал низкой амплитудой ответа, его кинетические свойства стали настоящей революцией среди всех вольтажных индикаторов того времени. В опубликованном тексте работы, авторы предполагали, что при изменении мембранного потенциала Ci-VSP демонстрирует конформационные переходы с разными временными параметрами, и ElectricPk оказывается способным уловить наиболее быстрые из них [583].

Наконец, первой вольтажной пробой, сочетающей высокую амплитуду ответа и быструю кинетику, стал ASAP1 [584]. Его создатели руководствовались кристаллической структурой Ci-VSD, которая позволила установить, что наиболее подвижным участком белка является петля, соединяющая третий (S3) и четвертый (S4) трансмембранные сегменты [585]. Однако, вместо того чтобы использовать Ci-VSD, авторы остановились на гомологичном домене из *Gallus gallus*, поскольку они предположили, что более короткий S3-S4 регион данного белка является более жестким и тем самым сможет обеспечить лучшее сопряжение доменов [584]. Таким образом, в отличие от ElectricPk, в обсуждаемом случае интеграцию флуоресцентного модуля проводили в самую подвижную область сенсорного белка (**Рис. 25B**). Стоит отметить, что кинетические параметры ASAP1 превзошли аналогичные значения для популярного в те годы сенсора ArcLight в 23 раза [584]. В дальнейшем, данный индикатор многократно оптимизировали, что привело к появлению целой серии инструментов: ASAP-Y [586], ASAP2f [587], ASAP2s [588], ASAP3 [589] и, наконец, ASAP4.4-Kv [590].

За последние двадцать лет было создано огромное количество генетически кодируемых сенсоров на основе сrFP, которые позволяют визуализировать молекулярные события совершенно различной природы [567]. Даже краткое перечисление их разнообразия выходит за рамки настоящего текста. Упомянем лишь те индикаторы, которые имеют отношение к редокс-биологии. В общем случае данные инструменты задействуют один из двух типов молекулярных переключателей: 1) окисление селективных остатков цистеина или 2) связывание низкомолекулярного лиганда. К первой группе относятся сенсоры на H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> семейства HyPer [591–593], среди которых отдельно стоит выделить ультрачувствительную версию HyPer7 [594], красный вариант HyPerRed [595], а также TriPer [596], который позволяет визуализировать аналит в средах с относительно высоким окисляющим потенциалом. Другие представители этого класса способны измерять концентрации органических гидропероксидов [597] и сульфоксида метионина [598], регистрировать общий редокс-статус клетки [599]. Вторая группа белков включает в себя достаточно широкую палитру сенсоров на NAD(H) [600–604], несколько

индикаторов для регистрации NADP(H) [605], а также единичные инструменты, чувствительные в отношении хинонов [606] и CO [607].

Сенсоры на основе *срFP* обладают множеством привлекательных черт. Среди них – уникально высокие амплитуды ответа, низкий молекулярный вес и достаточно узкие оптические окна, способствующие мультипараметрическим экспериментам. Все это делает их одним из наиболее перспективных классов генетически кодируемых индикаторов. Однако, не стоит забывать, что они подвержены некоторым недостаткам. В частности, многие белки данной группы демонстрируют выраженную рН-чувствительность, которая является потенциальным источником артефактов во время съемок *in vivo* [560]. Более того, по сравнению с нативными флуоресцентными белками *срFPs* обладают дестабилизированной структурой, что замедляет их созревание, особенно, при высоких температурах [560,608]. Наконец, самым неприятным их качеством выступает значительная сложность разработки. Известно, что в химерных конструкциях оптические свойства *срFPs* в значительной мере зависят от структуры партнера. То же самое касается и способности изменять их в ответ на конформационные перестройки последнего. Таким образом, создание сенсоров с обсуждаемой архитектурой зачастую требует проведения рутинной работы по подбору линкеров [595], оптимизации N- и C-концов флуоресцентного белка [609,610] и, в некоторых случаях, осуществления случайного мутагенеза [589,602,610]. То же самое касается и конформационно-подвижного региона сенсорного модуля – для более эффективного сопряжения доменов может потребоваться внесение делеций [601,611,612] или даже создание химерных конструкций путем совмещения частей из разных гомологов [613]. Кроме того, многие сенсоры на основе *срFP* демонстрируют интенсификационный характер ответа. Несколько подходов позволяют устранить данную проблему. В простейшем случае к N- или C-концу сенсорного модуля пришивают дополнительный флуоресцентный белок, служащий стандартом сравнения [604,614]. Однако, не все полипептиды сохраняют свои биохимические функции при подобной модификации. Возможным решением является использование специализированной кассеты под названием «Матрешка», представляющей собой круговой пермутант флуоресцентного белка одного цвета, в котором, в качестве линкера, соединяющего природные концы, служит флуоресцентный белок второго цвета с естественной топологией [615].

#### 1.4. Исследования гипогалогенного стресса при помощи генетически кодируемых биосенсоров.

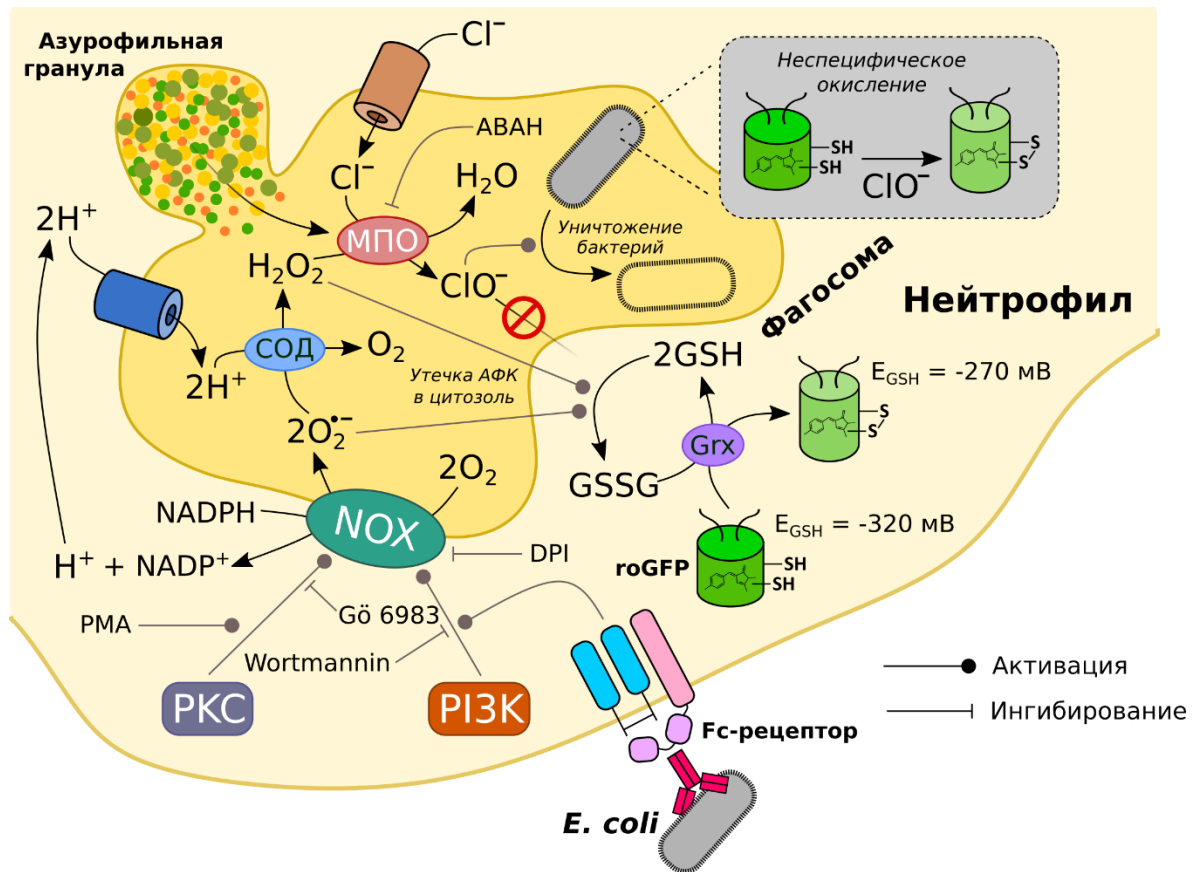
Несмотря на то, что генетически кодируемые сенсоры, которые бы селективно взаимодействовали с (псевдо)гипогалогенными кислотами, не опубликованы в литературе, ряд коллективов уже предпринимал попытки исследовать динамику данных соединений при помощи инструментов на основе флуоресцентных белков. В 2016 году Loi и соавторы сконструировали первый индикатор на редокс-статус пула бациллитиола (BSH), Bxh-roGFP2 [444]. Разработанный инструмент был использован для исследования окислительного стресса различного генеза в клетках *Staphylococcus aureus*. Обсуждаемая работа продемонстрировала, что по сравнению с H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> экзогенные добавки NaOCl вызывают выраженный ответ пробы в куда меньших концентрациях, при этом восстановление сигнала либо вовсе невозможно, либо происходит со значительной временной задержкой. Так, при аликвотах NaOCl величиной до 20 мкМ возвращение сигнала к исходной линии занимает не менее двух часов, в то время как 10 мМ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> требуют всего лишь час для восстановления. При помощи Вестерн блоттинга авторы также продемонстрировали, что NaOCl вызывает масштабное S-бациллитиолирование белков бактерии. В другом эксперименте клетки *S. aureus*, экспрессирующие сенсор, визуализировали при помощи конфокальной микроскопии до и после наступления гипогалогенного стресса. Важно отметить, что, как и в предыдущих работах [460], контрольные *in vitro* тесты показали способность Bxh-roGFP2 отвечать на NaOCl [444]. Таким образом, зарегистрированная динамика отражает комплексные процессы, являющиеся суммой NaOCl- и BSSB-опосредованного окисления белка. Позже схожие данные были получены Linzner и соавторами в аналогичной модели [616].

В 2019 году Tung и коллеги провели исследования редокс-метаболизма *Corynebacterium glutamicum*, микроорганизма, который является важным промышленным источником L-глутамата и L-лизина [617]. Кроме того, данная бактерия служит модельным объектом для изучения биологии родственных патогенов – *Corynebacterium diphtheriae* и *Corynebacterium jeikeium* [618]. Большая часть работы посвящена вкладу различных антиоксидантных систем в поддержание редокс-статуса микотиола (MSH) как во время роста культуры, так и в условиях окислительного стресса [619]. В частности, авторы показали, что динамика ответа на высокие концентрации H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> зависит преимущественно от доступности активных каталаз, но не MSH-зависимых пероксидаз. Полученный вывод согласуется с концепцией, что в условиях окислительного стресса уровень NAD(P)H является недостаточным для поддержания пероксидаз в

функциональном состоянии [456]. В одном из экспериментов с использованием Mrx1-roGFP2 коллектив продемонстрировал, что даже низкие концентрации NaOCl (0.5 мМ) приводят к необратимому окислению сенсора. В то же самое время сигнал индикатора возвращался в исходное состояние через час после обработки 40 мМ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> [619]. В целом, данный тренд поддерживает данные Loi [444] и общепринятые представления о том, что гипогалогенные кислоты представляют собой очень мощные окисляющие агенты. Интересно, что в *in vitro* экспериментах Mrx1-roGFP2 проявлял даже большую чувствительность к NaOCl, нежели roGFP2 [619]. Таким образом, редокс-активные остатки цистеина, находящиеся в адаптере, лишь ухудшают кросс-селективность в отношении обсуждаемого агента, что еще раз подчеркивает сложность интерпретации зарегистрированной динамики.

Несколько коллективов предпринимали попытки исследовать редокс-метаболизм нейтрофилов, основной ролью которых является уничтожение бактериальных и грибковых патогенов с участием МПО. Degrossoli и соавторы экспрессировали свободный roGFP2, а также его версии, соединенные с адаптерами (Grx1-roGFP2 и roGFP2-Orp1), в цитоплазме *E. coli*, после чего подвергали их фагоцитозу нейтрофил-подобными клетками линии PLB-985 [620]. Все три сенсора продемонстрировали очень схожую динамику, которая заключалась в резком окислении в течение первых секунд после интернализации. Данный факт вынудил авторов предположить, что они наблюдают неспецифическое окисление, вызванное прямым взаимодействием проб с HOCl (**Рис. 26**). В соответствии с выдвинутой гипотезой ингибирование МПО действительно значительно снизило интенсивность ответа. Интересный результат, полученный в рамках данной статьи, заключается в том, что в тех случаях, когда фагоцитоз был предотвращен воздействием цитохалазина D, редокс-статус индикаторов не изменялся. На основании этого наблюдения авторы заключили, что в исследуемой модели PLB-985 не секретируют активные окислители, в том числе HOCl и ее производные, в окружающую среду [620]. Однако, стоит отметить, что roGFP2 не является селективным сенсором в отношении активных форм хлора, таким образом, его кинетические свойства могут быть недостаточно удовлетворительными для регистрации низких доз аналита.

В 2019 году тот же самый коллектив провел масштабное исследование окислительно-восстановительного метаболизма PLB-985, экспрессирующих roGFP2 в цитоплазме [621] (**Рис. 26**). В первую очередь, авторы показали, что в покое нейтрофил-подобная линия демонстрирует достаточно низкий редокс-статус пула глутатиона



**Рисунок 26.** Информация о метаболизме NOCl в нейтрофилах, которая была получена при помощи сенсоров на основе roGFP. АФК – активные формы кислорода. МПО – миелопероксидаза. СОД – супероксиддисмутаза. АВАН – 4-аминобензогидразид. DPI – хлорид дифенилениодония. GSH – восстановленный глутатион. GSSG – окисленный глутатион. Grx – глутаредоксин.  $E_{GSH}$  – окислительно-восстановительный потенциал глутатиона. PI3K – фосфатидил-инозитол-3-киназа. PKC – протеинкиназа С. PMA – форбол-12-миристат-13-ацетат. NOX – NADPH-оксидазный комплекс. Пояснения в тексте.

(-320 мВ), не сильно отличающийся от большинства других клеток. Воздействие активирующего агента форбол-12-миристат-13-ацетата (PMA) вызывало рост данного показателя, который происходил в течение 10 минут, после чего следовала небольшая фаза падения, завершавшаяся выходом на новое стационарное состояние величиной около -270 мВ. Когда в среду добавляли живые бактерии, финальный сигнал сенсора достигал схожего значения, однако, наблюдаемая динамика продолжалась более часа. Дальнейшие эксперименты по микроскопии индивидуальных клеток показали, что данный феномен связан с несинхронным характером фагоцитоза – цитоплазма приобретала окислительный статус в течение небольшого времени после интернализации. Поскольку NOX2 нейтрофилов может быть активирована различными сигнальными путями, авторы использовали Wortmannin и Gö 6983, являющиеся ингибиторами PI3K и PKC,



соответственно [621]. Оказалось, что Wortmannin устранял ответ, вызванный *E. coli*, в то время как Gö 6983 – вызванный РМА. Таким образом, коллективу удалось продемонстрировать, что различные сигнальные каскады по-разному влияют на редокс-статус нейтрофил-подобных клеток, и результаты, полученные в разных моделях, не могут быть транслированы на общий случай. Описанные данные особенно интересны в свете того, что РМА часто используют как более простой способ активации нейтрофилов и схожих клеток. Наконец, авторы решили установить, связано ли изменение редокс-статуса PLB-985 с активными формами хлора. В то время как ингибирование NOX2 при помощи DPI полностью устраняло ответ сенсора, воздействие АВАН (ингибитор МПО) не оказывало никакого эффекта. На основании данного факта коллектив предположил, что, несмотря на тот факт, что производные HOCl могут проникать через клеточные мембраны [622], нейтрофилы обладают достаточно эффективной антиоксидантной системой, способной элиминировать данные соединения [621]. Впрочем, на наш взгляд этот вывод требует пересмотра. Как мы уже писали выше, гоGFP2 не является индикатором, селективным в отношении HOCl или же его производных. Таким образом его чувствительности может не хватать для детекции низких концентраций аналитов, особенно, если учитывать высокие концентрации клеточных мишеней, с которыми он вынужден конкурировать. Более того, в цитоплазме динамика гоGFP2 соответствует сумме как минимум трех процессов: NaOCl-опосредованное окисление, GSSG-опосредованное окисление и GSH-опосредованное восстановление. Учитывая тот факт, что клетки позвоночных содержат очень высокие концентрации глутатиона [623], вполне возможно, что в условиях слабого гипогалогенного стресса сенсор преимущественно уравнивается с его пулом. Иначе говоря, NaOCl-опосредованное окисление теряется за GSH-опосредованным восстановлением.

## 2. Материалы и методы.

### 2.1. Создание генно-инженерных конструкций.

Для всех процедур амплификации ДНК использовали Tersus Plus PCR Kit (Евроген). Сборку различных версий NemR-срYFP осуществляли при помощи перекрывающейся полимеразной цепной реакции (ПЦР, «overlap extension polymerase chain reaction»). Каждая реакционная смесь содержала N- и C-терминальные фрагменты NemR<sup>C106</sup>, а также фрагмент срYFP в эквимольных количествах. Концентрацию ДНК оценивали визуально при помощи горизонтального электрофореза в агарозном геле. Для амплификации фрагмента срYFP использовали вектор pQE30-HyPer-2 [592] в качестве матрицы. Мы создали две версии данного полинуклеотида (с парами линкеров SAG/G и SAG/GT) при помощи комбинаций праймеров №1/№19 и №2/№20 (Табл. 1), соответственно. Для амплификации N- и C-концевых частей NemR<sup>C106</sup> использовали вектор pET-21b(+)-NemR<sup>C106</sup> [624] в качестве матрицы. Все N-концевые фрагменты были наработаны при помощи праймера №3 и одного из праймеров №22-33 (Табл. 1). Все C-концевые фрагменты были наработаны при помощи праймера №21 и одного из праймеров №4-15 (Табл. 1). После завершения перекрывающейся ПЦР, целевую ДНК изолировали от побочных продуктов в ходе горизонтального электрофореза в агарозном геле с последующей очисткой при помощи Cleanup Standard Kit (Евроген). Для того, чтобы интегрировать NemR-срYFP в вектор pQE30, очищенные конструкторы и интактную плазмиду инкубировали с эндонуклеазами рестрикции BamHI и HindIII (FastDigest™, Thermo Scientific) в соответствующем буфере при 37 °С в течение 20 минут. На следующем этапе рестрицированные полинуклеотиды изолировали из реакционных смесей при помощи Cleanup Standard Kit (Евроген) и лигировали под действием T4 ДНК лигазы (Евроген) согласно протоколу производителя (14 °С, 24 часа инкубации). Молярное соотношение вектора и вставки составляло около 1:3 во всех случаях. Концентрацию ДНК оценивали визуально при помощи горизонтального электрофореза в агарозном геле. После завершения инкубации, образцы трансформировали в клетки *E. coli* штамма XL1-Blue, которые растили на твердой среде (1.5% агар на LB (Lysogenic Broth; 1% триптон, 0.5% дрожжевой экстракт, 0.1% NaCl, 0.01 мМ Tris-HCl pH 8.0), 100 мкг/мл ампициллин) в течение 14 часов при 37 °С. Для идентификации колоний, содержащих искомую плазмиду, использовали ScreenMix Kit (Евроген) согласно протоколу производителя. Затем бактерии переносили в жидкую питательную среду (LB, 100 мкг/мл ампициллин) и растили в инкубаторе в течение 14 часов при 37 °С, 200 об/мин (New

Brunswick™ Excella® E25). Наконец, вектора, несущие гены для экспрессии NemR-сpYFP, очищали при помощи Plasmid Miniprep Kit (Евроген) согласно протоколу производителя. Концентрацию ДНК в пробах измеряли на спектрофотометре NanoDrop 2000 (Thermo Scientific). Для того, чтобы убедиться в отсутствии нежелательных мутаций в финальных генно-инженерных конструкциях, мы секвенировали их последовательности (Евроген).

**Таблица 1.** Праймеры, которые были использованы в данной работе с целью создания различных версий NemR-сpYFP. Вст – обозначает позицию вставки сpYFP в NemR.

Название	№	Прямой праймер	№	Обратный праймер
<b>SAG-сpYFP-G</b>	1	tctgcaggctacaacagcgacaacgtctata tcatggcc	19	accgtgtactccagcttgtgccccca
<b>SAG-сpYFP-GT</b>	2	tccgccggctacaacagcgacaacgtctat atcatggcc	20	ggtgccgtgtactccagcttgtgccccca
<b>Края NemR (pQE)</b>	3	atatatggatccatgaacaacacaccgaac atgatactgc	21	atatataagcttctaaacggcaggcgctcgcaa taatgtttttac
<b>Вст. 97-98/G</b>	4	ggcacaagctggagtacaacggtagccaa catggaaccatcagtggttg	22	gtgtcgtgtgttagcctgcagaaaactggtt cagtgtttctggttaataagcca
<b>Вст. 98-99/GT</b>	5	acaagctggagtacaacggcaccacaat ggaaccatcagtggttgctt	23	gctgtttagcggcgaggctaaactggttca gtgttctggttaataagc
<b>Вст. 99-100/G</b>	6	ggcacaagctggagtacaacggatcatgga accatcagtggttgcttgcac	24	gtgtcgtgtgttagcctgcagattggctaaa ctggttcagtggttctggttaataag
<b>Вст. 100-101/GT</b>	7	acaagctggagtacaacggcaccggaacc atcagtggttgcttgcacag	25	gctgtttagcggcggaatgttggctaaact ggttcagtggttctg
<b>Вст. 101-102/G</b>	8	ggcacaagctggagtacaacggtagcatca gtggttgctgacagtaaaactc	26	gtgtcgtgtgttagcctgcagatccatgtg gctaaactggttcagtggtt
<b>Вст. 102-103/GT</b>	9	acaagctggagtacaacggcaccatcagtg gttgcctgacagtaaaactctctg	27	gctgtttagcggcgagggttccatgttggc taaactggttcagtg
<b>Вст. 103-104/G</b>	10	ggcacaagctggagtacaacggtagtggtt gcctgacagtaaaactctctgc	28	gtgtcgtgtgttagcctgcagagatggttcc atgttggctaaactggttcagtg
<b>Вст. 104-105/GT</b>	11	acaagctggagtacaacggcaccggttgcc tgacagtaaaactctctgcc	29	gctgtttagcggcggaactgatggttccat gttggctaaactggtt
<b>Вст. 103-105/G</b>	12	ggcacaagctggagtacaacggtaggttgcc tgacagtaaaactctctgcc	30	gtgtcgtgtgttagcctgcagagatggttcc atgttggctaaactggttcagtg
<b>Вст. 103-105/GT</b>	13	acaagctggagtacaacggcaccggttgcc tgacagtaaaactctctgcc	31	gctgtttagcggcgagatggttccatgtt ggctaaactggttcagtg
<b>Вст. 102-105/G</b>	14	ggcacaagctggagtacaacggtaggttgcc tgacagtaaaactctctgcc	32	gtgtcgtgtgttagcctgcagaggttccatg ttggctaaactggttcagtg
<b>Вст. 102-105/GT</b>	15	acaagctggagtacaacggcaccggttgcc tgacagtaaaactctctgcc	33	gctgtttagcggcgagggttccatgttggc taaactggttcagtg
<b>C355S</b>	16	ggcaccggtagcctgacagta	34	tactgtcaggctaccggtgcc
<b>K424A</b>	17	ctgcaggccgcaatttcgcg	35	cgcgaaattgcggcctgcag
<b>Края NemR (PCS2)</b>	18	atatatctgatgccaccatgaacaacacaca ccgaacatgatactgcg	36	atatatcttagactaaacggcaggcgctcgcaa taatgtttttac

Генно-инженерные конструкции для экспрессии HucratesCS и HucratesKA также получали при помощи перекрывающейся ПЦР. В обоих случаях, реакционная смесь содержала N- и C-концевые фрагменты Hucrates с желаемыми заменами в эквимольных соотношениях. Концентрацию ДНК оценивали визуально при помощи горизонтального электрофореза в агарозном геле. Для амплификации всех полинуклеотидов использовали вектор pQE30-Hucrates в качестве матрицы. N- и C-концевые фрагменты создавали при помощи комбинаций праймеров №3/№34 и №16/№21 (Табл. 1) для HucratesCS, и №3/№35 и №17/№21 (Табл. 1) для HucratesKA. Дальнейшие шаги выполняли так же, как было описано выше.

Для переноса генов, кодирующих варианты NemR-сpYFP, из вектора pQE30 в вектор pCS2+ необходимую ДНК амплифицировали с участием пары праймеров №18/№36 (Табл. 1), после чего очищали при помощи Cleanup Standard Kit (Евроген). Нарботанные полинуклеотиды, а также интактный вектор инкубировали с эндонуклеазами рестрикции ClaI и XbaI (FastDigest™, Thermo Scientific) в соответствующем буфере при 37 °С в течение 20 минут. Рестрицированную ДНК подвергали тем же процедурам, которые уже были описаны выше.

## 2.2. Проверка работоспособности вариантов NemR-сpYFP в клетках *E. coli*.

Для того, чтобы получить бактериальные клетки, экспрессирующие варианты NemR-сpYFP, вектор pQE30, несущий необходимый ген, трансформировали в *E. coli* штамма XL1-Blue, после чего колонии растили на LB-агаре с 100 мкг/мл ампициллином в течение 14 часов при 37 °С. Во всех случаях мы контролировали плотность бактерий таким образом, чтобы индивидуальные колонии располагались друг от друга на расстоянии около 1-2 мм, поскольку этот параметр существенным образом влияет на созревание и редокс-состояние сенсоров. Оптимальная концентрация ДНК составляла 5-10 нг на чашку при компетентности клеток около 10<sup>6</sup> КОЕ/мкг вектора. Интенсивность флуоресценции клеток оценивали при помощи флуоресцентного микроскопа SZX12. На первый день все версии NemR-сpYFP характеризовались низкой яркостью, что, по всей видимости, связано с тем, что круговые пермутанты флуоресцентных белков обладают дестабилизированной структурой и требуют достаточно много времени для эффективного созревания. Таким образом, мы приняли решение инкубировать бактериальные чашки дополнительные 24 часа при 17–20 °С с целью ограничить рост колоний.

Для проверки работоспособности версий NemR-сpYFP бактериальную массу переносили в 1 мл буфера (Phosphate Buffer Saline, PBS; 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM

Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1.8 мМ КН<sub>2</sub>РО<sub>4</sub>, рН 7.4), после чего ресуспендировали ее при помощи автоматической пипетки. Спектры эмиссии флуоресценции ( $\lambda_{\text{ex}}$  425 nm or 500 nm) и возбуждения флуоресценции ( $\lambda_{\text{em}}$  525 nm) регистрировали на Varian Cary Eclipse Fluorescence Spectrophotometer. Суспензии обрабатывали аликвотами NaOCl в финальной концентрации 80 мкМ, после чего повторяли оптические измерения. Во всех случаях образцы перемешивали при помощи пипетирования до тех пор, пока не наблюдали стабилизацию спектров. Полученные данные анализировали при помощи OriginPro 9.0 (OriginLab).

### **2.3. Экспрессия и очистка NemR<sup>C106</sup>, вариантов NemR-сpYFP, EYFP, интактного сpYFP, HyPer2 и SupHer3s.**

Экспрессию и очистку NemR<sup>C106</sup> проводили следующим образом. Вектор рЕТ-21b(+)-NemR<sup>C106</sup> [624] трансформировали в клетки *E. coli* штамма BL21 (DE3). Бактерии растили в LB с 50 мкг/мл канамицином при 37 °С и 200 об/мин до тех пор, пока поглощение при 600 нм не достигало 0.8 единицы. Изопропил- $\beta$ -d-1-тиогалактопиранозид (IPTG; 0.5 мМ) использовали для индукции экспрессии, после чего культуру инкубировали 3 часа при 37 °С и 200 об/мин. Полученные клетки осаждали при 4 °С, 5000 об/мин в течение 15 минут (ротор JLA-8.1000, Avanti® J-26xp, Beckman Coulter®) и ресуспендировали в лизис-буфере (50 мМ Tris-HCl рН 8, 0.2 М NaCl, 1 мМ DTT, 0.1 мг/мл 4-(2-аминоэтил)-бензолсульфонилфторид-гидрохлорид (AEBSF), 1 мкг/мл лейпептин, 50 мкг/мл ДНКаза I, 20 мМ MgCl<sub>2</sub>). Бактерии разрушали при помощи соникатора Sonic VibraCell в течение 10 минут при амплитуде 61% и цикле 30 секунд звука/30 секунд ожидания. Нерастворимую фракцию удаляли в ходе центрифугирования в течение 45 минут при 4 °С, 18000 об/мин (ротор JA-20, Avanti® J-26xp, Beckman Coulter®). Далее, супернатант инкубировали с Ni<sup>2+</sup>-сефарозой в течение 1 часа, 4 °С (Fast Flow beads, Cytiva), уравновешенной за счет 50 мМ Tris-HCl рН 8, 0.2 М NaCl и 1 мМ DTT. Частицы носителя со связанным белком переносили в колонку, после чего проводили аффинную хроматографию на системе АКТА™ Pure (GE Healthcare, Life Sciences). NemR<sup>C106</sup> элюировали линейным градиентом буфера с составом 50 мМ Tris-HCl рН 8, 0.2 М NaCl, 1 мМ DTT и 0-700 мМ имидазол. Чистоту белка оценивали при помощи невосстанавливающего электрофореза в полиакриламидном геле в присутствие додецилсульфата натрия, после чего фракции интереса подвергали диализу в течение 12 часов при 4 °С (~20 мл образца/2 л буфера). В качестве буфера для диализа использовали 50 мМ Tris-HCl рН 8, 0.2 М NaCl и 1 мМ DTT. Полученные образцы хранили при -20 °С.

В рамках настоящей работы мы использовали два протокола для экспрессии и очистки Nurocrates. Оба метода приводили к получению функционального сенсора. Таким образом, их стоит рассматривать как равнозначные.

Протокол 1. Клетки штамма XL1-Blue трансформировали при помощи вектора pQE30-Nurocrates, после чего их высевали на чашки с питательной средой (LB-агар, 100 мкг/мл ампициллин) и инкубировали в течение 14 часов при 37 °С. Плотность колоний контролировали так же, как было описано выше. Для достижения более эффективного созревания белков, чашки дополнительно инкубировали в течение 24 часов при 17–20 °С. На следующем этапе клетки смывали с поверхности агара ледяным PBS, и финальный объем суспензии доводили до 24 мл при помощи данного буфера. Как правило для единичной процедуры выделения использовали 20 чашек. Клетки разрушали на ледяной бане при помощи соникатора Sonic VibraCell в течение 9 минут при амплитуде 32% и цикле 5 секунд звука/10 секунд ожидания. Полученные лизаты центрифугировали в течение 20 минут при 21000×g и 4 °С (5424 R, Eppendorf) с целью осадить нерастворимую фракцию. Супернатант собирали, после чего наносили на колонку, заполненную 5 мл аффинной смолы TALON Metal Affinity resin (Takara), предварительно уравновешенную ледяным PBS. Носитель промывали 50 мл аналогичного буфера для удаления нецелевых белков. Элюцию осуществляли путем внесения 10 мл ледяного PBS, содержащего 250 мМ имидазол, и фракцию сенсора собирали на основе ее ярко желтого цвета. Образцы очищали от имидазола на колонках, наполненных 10 мл Sephadex G-25 (GE Healthcare Life Sciences), который предварительно уравновешивали ледяным PBS. Очищенный препарат белка хранили при 4 °С не более 3 дней. Внесение любых восстанавливающих агентов (таких как β-меркаптоэтанол) не влияло на свойства белка. Сенсор мог быть получен в полностью восстановленной форме даже в их отсутствии. Другие версии NemR-сpYFP (в том числе NurocratesCS), EYFP, сpYFP, SypHer3s и HyPer2 были очищены согласно аналогичной методике. Однако, в последнем случае все растворы, кроме буфера для гель-фильтрации, содержали 5 мМ β-меркаптоэтанол с целью избежать окисления сенсора атмосферным воздухом. Концентрацию белков измеряли при помощи Bicinchoninic Acid Kit (Sigma-Aldrich) согласно протоколу производителя. Для считывания сигнала использовали планшетный анализатор Tecan Infinite 200 PRO.

Протокол 2. Клетки штаммов Shuffle® T7 или XL1-Blue трансформировали при помощи вектора pQE30-Nurocrates, после чего их высевали на чашки с питательной средой (LB-агар, 100 мкг/мл ампициллин) и инкубировали в течение 14 часов при 37 °С (для XL1-Blue) или при 30 °С (для Shuffle® T7). Далее культуры переносили в другой

инкубатор, где их выдерживали при 25 °С до появления ярко желтой окраски. На следующем этапе несколько колоний смывали в 3 л LB с 100 мкг/мл ампициллином и инкубировали в течение 36 часов при 25 °С, 180 об/мин. Клетки осаждали и осадок ресуспендировали в лизис-буфере (40 мМ Tris-HCl pH 7.5, 150 мМ KCl, 10 мМ MgSO<sub>4</sub>, 5 мМ DTT, 0.1 мг/мл AEBSF, 1 мкг/мл лейпептин, 50 мкг/мл ДНКазы I, 20 мМ MgCl<sub>2</sub>). Клетки лизировали и фракционировали так же, как было описано выше для NemR<sup>C106</sup>. На следующем этапе супернатант инкубировали с Ni<sup>2+</sup>-сефарозой в течение 1 часа, 4 °С (Fast Flow beads, Cytiva), уравновешенной за счет связывающего буфера (40 мМ Tris-HCl pH 7.5, 150 мМ KCl, 10 мМ MgSO<sub>4</sub> и 1 мМ DTT). Носитель переносили в колонку, после чего аффинную хроматографию проводили на системе АКТА™ Pure (GE Healthcare, Life Sciences). Для элюции целевого белка использовали связывающий буфер с добавлением 400 мМ имидазола. Очистку препаратов от имидазола проводили на колонке Superdex75 16/600 (GE Healthcare), уравновешенной связывающим буфером. Чистоту белка оценивали при помощи не-восстанавливающего электрофореза в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия. Наиболее качественные фракции объединяли и хранили при -20 °С. Данный протокол преимущественно использовали для получения образцов Нурocrates, которые были задействованы в экспериментах по предстационарной кинетике, а также для получения образцов НурocratesCS, которые были задействованы в рентгеноструктурном анализе.

#### **2.4. Синтез N-хлоротаурина, NaOBr, HO SCN и NaONOO.**

Необходимые процедуры были проведены нашими коллегами из группы Михаила Баранова (ИБХ РАН, Москва), а также из лаборатории профессора Joris Messens (Брюссель, Бельгия).

Синтез N-хлоротаурина (NCT) осуществляли согласно Патенту DE4041703A1 (<https://patents.google.com/patent/DE4041703A1/en>). Тригидрат хлорамина-Т (6.0 г, 21.3 ммоль) растворяли в безводном метаноле (50 мл), после чего добавляли измельченный таурин (2.5 г, 20 ммоль). Смесь перемешивали в течение 20 часов при комнатной температуре. Растворитель удаляли при помощи роторного испарителя, а остаток промывали изопропиловым спиртом (3 раза по 10 мл) и диэтиловым эфиром (три раза по 35 мл). Полученное вещество сушили под вакуумом (5 мм рт. ст., 1 час). Итоговый продукт хранили при -20 °С.

Синтез раствора NaOBr осуществляли согласно Liu и соавторам [625]. NaOH (11.7 г, 0.30 моля) растворяли в воде (100 мл), после чего раствор охлаждали на ледяной бане до

-5 °С. Жидкий бром (3.86 мл) вносили по каплям при постоянном перемешивании и контроле температуры (не превышала 0 °С). Наконец, полученную смесь перемешивали в течение 1 часа при аналогичной температуре. Раствор NaOBr хранили в темном и холодном месте (4 °С). Концентрацию анионов BrO<sup>-</sup> измеряли перед каждым экспериментом при помощи спектрофотометрии (Varian Cary 5000 Spectrophotometer). Для этого раствор разводили за счет 0.1 М NaOH и использовали молярный коэффициент поглощения 332 М<sup>-1</sup> см<sup>-1</sup> при 329 нм.

Синтез раствора HO SCN осуществляли согласно Lane и соавторам [626]. Лактопероксидазу (40 мкМ) смешивали с NaSCN (150 мМ) в 100 мМ натрий-фосфатном буфере, pH 7.4. Полученный образец инкубировали на льду в течение 15 минут, после чего с интервалами в 1 минуту вносили 5 добавок H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (75 мМ) объемом 10 мкл каждая. Для устранения избытка H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> использовали каталазную реакцию (1 мг/мл, 5 минут). На следующем этапе ферменты удаляли из смеси при помощи ультрафильтрационных колонок (Vivaspin 500, Merck; 10 кДа). Концентрацию HO SCN измеряли в ходе реакции с 2-нитро-5-тиобензойной кислотой (TNB). Раствор TNB получали путем растворения 2 мг реагента в 200 мкл 50 мМ NaOH. После вортексирования и 5-минутной инкубации при комнатной температуре, раствор разводили в 40 раз при помощи 100 мМ натрий-фосфатного буфера, pH 7.4. HO SCN добавляли к подготовленному раствору TNB в соотношении 1:200, после чего измеряли поглощение образца (412 нм, 14150 М<sup>-1</sup> см<sup>-1</sup>) на планшетном анализаторе SpectraMax iD5 (Molecular Devices).

Синтез раствора NaONOO осуществляли согласно Urru [627]. NaOH (4.0 г, 0.10 моля) растворяли в воде (35 мл). Смесь остужали на ледяной бане до 0-5 °С, после чего вносили 35% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (11 мл, ~0.11 моля) и ЭДТА (сухой, 75 мг). Далее, к образцу добавляли жидкий изоамилнитрит (13.5 мл, 0.10 моля), после чего полученную смесь интенсивно перемешивали на комнатной температуре в течение 5 часов. На следующем этапе препарат разводили дихлорметаном (100 мл) и отбирали водную фазу, которую дополнительно промывали тем же самым веществом (5 раз по 100 мл каждый). Избыток непрореагировавшего H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> удаляли путем пропускания водной фазы через диоксид марганца (10-15 г, 5 мм слой). Полученный раствор очищали от следов MnO<sub>2</sub> в ходе фильтрации, после чего остатки дихлорметана устраняли под вакуумом (5 мм рт. ст., 1 час). Итоговый реагент хранили при -20 °С. Концентрацию ионов ONOO<sup>-</sup> измеряли перед каждым экспериментом при помощи спектрофотометрии (Varian Cary 5000 Spectrophotometer). Для этого раствор разводили 0.1 М NaOH и использовали молярный коэффициент поглощения 1670 М<sup>-1</sup> см<sup>-1</sup> при 302 нм.



## 2.5. Измерение оптических параметров очищенных препаратов NemR-сpYFP.

Для измерения яркости первичных версий NemR-сpYFP очищенные белки разводили в PBS до эквимольных концентраций (согласно Bicinchoninic Acid Kit). Очищенный EYFP выступал в качестве контроля сравнения. Спектры поглощения и возбуждения флуоресценции ( $\lambda_{em}$  513 нм для вариантов NemR-сpYFP и 533 нм для EYFP) регистрировали при помощи Varian Cary 5000 Spectrophotometer и Varian Cary Eclipse Fluorescence Spectrophotometer. Молярные коэффициенты поглощения ( $\epsilon$ ) рассчитывали согласно следующему уравнению:

$$\epsilon = A/(C \cdot L),$$

где  $A$  – оптическая плотность в области максимума поглощения,  $C$  – концентрация белка в молях/литр, и  $L$  – длина оптического пути в см. Квантовые выходы флуоресценции (QY) рассчитывали согласно следующему уравнению:

$$QY_{NemR-сpYFP} = QY_{EYFP} \cdot (A_{EYFP} \cdot \epsilon_{NemR-сpYFP} / (A_{NemR-сpYFP} \cdot \epsilon_{EYFP})),$$

где  $A$  – оптическая плотность в области максимума поглощения, и  $\epsilon$  – интенсивность эмиссии в области максимума возбуждения флуоресценции ( $\lambda_{ex}$  425 нм или 500 нм для вариантов NemR-сpYFP, и 519 нм для EYFP). Согласно данным литературы,  $QY_{EYFP}$  принимает значение величиной 0.67 (Fpbase ID: 8DNLG). Полученные результаты анализировали при помощи OriginPro 9.0 (OriginLab).

Следует помнить, что очищенные образцы сенсора могут содержать не полностью свернутые молекулы, а также молекулы с незрелыми хромофорами. Данное обстоятельство существенным образом снижает точность оценки оптических параметров. Таким образом, мы приняли решение исследовать молярные коэффициенты поглощения и квантовые выходы Нурocrates более детально. Для оценки концентрации полностью созревших хромофоров образцы сенсора и EYFP в PBS смешивали с 1 М NaOH в объемном соотношении 1:1, после чего инкубировали в течение 5 минут. В подобных условиях желтые флуоресцентные белки претерпевают денатурацию и созревшие хромофоры конвертируются в форму, поглощающую при 445 нм с  $\epsilon$  44000 М<sup>-1</sup> см<sup>-1</sup> [310]. Для оценки того, как восстанавливающие и окисляющие агенты влияют на оптические параметры индикатора, некоторые образцы Нурocrates предварительно инкубировали в

присутствие 0.5 мМ NCT или же 5 мМ DTT в течение 30 минут. Все дальнейшие процедуры проводили так, как было описано выше.

## **2.6. Регистрация эффектов окислителей на оптические свойства белков, а также оценка обратимости наблюдаемых ответов.**

На первом этапе очищенные препараты Нурocrates (0.5 мкМ) обрабатывали насыщающими аликвотами окислителей (5-10 мкМ), при этом мы регистрировали их спектры возбуждения флуоресценции ( $\lambda_{em}$  520 нм) до и после воздействия. Далее, с целью оценить, приводят ли высокие добавки агентов к повреждению белков, мы увеличивали их концентрации вплоть до 105-110 мкМ и проводили аналогичные измерения. Во всех случаях мы перемешивали образцы при помощи автоматических пипеток до тех пор, пока не наблюдали стабилизацию сигнала. NaOCl и NCT тестировали в PBS, в то время как NaONOO и NaOBr – в 100 мМ натрий-фосфатном буфере (pH 7.4) с целью избежать возможной продукции HOCl в системе. В двух последних случаях аликвоты белков предварительно очищали от хлорид-анионов при помощи ультрафильтрации (Amicon Ultra-0.5 Centrifugal Filter Units, Millipore) или же при помощи гель-фильтрации на колонках, наполненных 10 мл Sephadex G-25 (GE Healthcare Life Sciences), который предварительно уравнивали 100 мМ натрий-фосфатным буфером (pH 7.4). Чувствительность srYFP, HyPer2 и SynHer3s к NaOCl согласно аналогичному протоколу. Все измерения проводили на спектрофлуориметре Varian Cary Eclipse. Полученные данные анализировали при помощи OriginPro 9.0 (OriginLab).

С целью проверки того, является ли ответ Нурocrates обратимым, мы обрабатывали препараты белка (0.5-2 мкМ) насыщающими концентрациями окислителей (5-50 мкМ), после чего инкубировали их в течение 5 минут с последующей регистрацией спектров возбуждения флуоресценции. Далее мы добавляли 1-5 мМ DTT и давали ему провзаимодействовать с сенсором на протяжении 40-60 минут. В качестве контролей мы использовали препараты, которые инкубировали в течение аналогичных промежутков времени либо без добавления аналитов, либо без добавления DTT. Это позволяло учесть эффекты, связанные с воздействием кислорода воздуха. NaOCl и NCT тестировали в PBS, в то время как NaOBr и HO SCN – в 100 мМ натрий-фосфатном буфере (pH 7.4) с целью избежать возможной продукции HOCl в системе. В двух последних случаях аликвоты белков предварительно очищали от хлорид-анионов при помощи ультрафильтрации (Amicon Ultra-0.5 Centrifugal Filter Units, Millipore) или же при помощи гель-фильтрации на колонках Hi-Trap® (GE Healthcare) с использованием хроматографической системы

АКТА™ Pure (GE Healthcare, Life Sciences). Обратимость NaOCl-опосредованных эффектов в отношении сигнала cpYFP исследовали согласно аналогичному протоколу. Измерения проводили на спектрофлуориметре Varian Cary Eclipse или при помощи LS55 luminescence spectrophotometer. Полученные данные анализировали в программе OriginPro 9.0 (OriginLab).

## **2.7. Титрование очищенных препаратов Hupocrates (псевдо)гипогалогенными кислотами и их производными.**

Для оценки чувствительности Hupocrates аликвоты очищенного сенсора (0.5 мкМ) инкубировали с рядами возрастающих концентраций окислителей (NaOCl, NaOBr, HO SCN и NCT) в течение 5 минут в 100 мМ натрий-фосфатном буфере (pH 7.4). Спектры возбуждения флуоресценции ( $\lambda_{em}$  520 нм или 555 нм) регистрировали на спектрофлуориметре Varian Cary Eclipse или на планшетном анализаторе SpectraMax iD5 (Molecular Devices). Полученные данные анализировали при помощи GraphPad Prism8 и OriginPro 9.0 (OriginLab). Мы строили зависимость соотношения Ex500/Ex420 от концентрации аналитов, после чего описывали начальные участки кривых в рамках модели линейной регрессии.

Чувствительность Hupocrates при различных показателях кислотности среды оценивали путем титрования очищенного белка аликвотами NCT в 100 мМ натрий-фосфатных буферах (pH 6.70, 7.00, 7.30, 7.60, 7.90 и 8.20). Белок (0.5 мкМ) обрабатывали последовательными добавками окислителя величиной 0.3-5 мкМ вплоть до финальной концентрации 15 мкМ. На каждом этапе образец перемешивали пипетированием до полной стабилизации оптических свойств, после чего регистрировали спектр возбуждения флуоресценции ( $\lambda_{em}$  525 nm) на приборе Varian Cary Eclipse Fluorescence Spectrophotometer. Наконец, мы строили зависимость соотношения Ex500/Ex417 от возрастающей концентрации аналита при помощи программы OriginPro 9.0 (OriginLab).

## **2.8. Предстационарная кинетика.**

Необходимые эксперименты были проведены нашими коллегами из лаборатории профессора Joris Messens (Брюссель, Бельгия). Далее, мы кратко опишем их основную суть.

Измерение предстационарной кинетики осуществляли методом остановленной струи на приборе Applied Photophysics SV20. На первом этапе для каждого из белков определяли диапазон концентраций окислителя, необходимый для индукции оптических

сдвигов. В случае NemR<sup>C106</sup> в качестве сигнала регистрировали флуоресценцию остатков триптофана при помощи одностороннего фильтра (>320 нм,  $\lambda_{ex}$  295 нм). В случае Hucrocrates в качестве сигнала регистрировали флуоресценцию хромофора srYFP при помощи одностороннего фильтра (>515 нм,  $\lambda_{ex}$  485 нм). Непосредственно перед экспериментом образцы восстанавливали 30 мМ DTT в течение 30 минут на комнатной температуре. Далее, белки переводили в 100 мМ натрий-фосфатный буфер (pH 7.4) путем гель-фильтрации на колонках Hi-Trap® (GE Healthcare) с участием хроматографической системы АКТА™ Pure (GE Healthcare, Life Sciences). Через буфер предварительно пропускали аргон с целью устранения молекулярного кислорода. Для того, чтобы установить кинетические параметры реакций, Hucrocrates (0.5 мкМ) или NemR<sup>C106</sup> (1 мкМ) смешивали с возрастающими концентрациями окислителей (NaOCl, NaOBr или NCT) при 25 °C. Полученные кривые описывали при помощи двойной экспоненциальной модели и величины  $k_{fast}$  использовали для вычисления констант второго порядка. Экспериментальные данные анализировали в программах GraphPad Prism8 и OriginPro 9.0.

## 2.9. Построение профилей селективности.

Перед проведением экспериментов очищенный Hucrocrates восстанавливали при помощи DTT, после чего переводили в 100 мМ натрий-фосфатный буфер (pH 7.4) с использованием гель-фильтрационных колонок Hi-Trap® (GE Healthcare) и хроматографической системы АКТА™ Pure (GE Healthcare, Life Sciences). Аликвоты сенсора (2 мкМ) инкубировали с широкой панелью редокс-агентов: NaOCl (50 мкМ), NaOBr (50 мкМ), HOscn (50 мкМ), NCT (50 мкМ), H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (50 мкМ), глутатион (GSH; 500 мкМ), дисульфид глутатиона (GSSG; 500 мкМ), МАНМА NONOate (генератор NO•; 50 мкМ), Na<sub>2</sub>S (50 мкМ), NaONOO (50 мкМ), глиоксаль (50 мкМ), метилглиоксаль (50 мкМ), формальдегид (50 мкМ), а также с системой ксантин (X)/ксантинооксидаза (XOX) (генератор O<sub>2</sub>•<sup>-</sup>; 50 мкМ X + 0.05 Ед/мл XOX). В случаях NaONOO и X/XOX мы также добавляли каталазу (0.1 мкМ), которая устраняла возможные следовые количества H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Работоспособность системы X/XOX предварительно проверяли при помощи спектрофотометрии (Varian Cary 5000 Spectrophotometer) путем оценки способности изменять спектр поглощения цитохрома с. МАНМА NONOate растворяли в 10 мМ NaOH с целью снизить скорость деградации агента. Большую часть образцов инкубировали в течение 5 минут, после чего регистрировали изменение спектров возбуждения флуоресценции ( $\lambda_{em}$  515-520 нм) на приборах LS55 luminescence spectrophotometer (PerkinElmer) или Varian Cary Eclipse. Пробы, содержащие МАНМА NONOate и систему

X/XOX, инкубировали в течение 30 минут. Профили селективности HurocratesCS и SypHer3s анализировали аналогичным образом. Селективность NemR<sup>C106</sup> в отношении NaOCl, NaOBr, NCT и HO SCN анализировали согласно данному протоколу за исключением того факта, что в качестве метода считки сигнала использовали флуоресценцию триптофана ( $\lambda_{ex}$  295 нм). Данные обрабатывали при помощи OriginPro 9.0 (OriginLab).

### **2.10. Определение $pK_a$ восстановленных и окисленных вариантов NemR-spYFP.**

Для оценки  $pK_a$  Hurocrates очищенный препарат белка восстанавливали при помощи DTT, после чего переводили в 100 мМ натрий-фосфатный буфер (pH 7.4) с использованием гель-фильтрационных колонок Hi-Trap® (GE Healthcare) и хроматографической системы АКТА™ Pure (GE Healthcare, Life Sciences). В некоторых случаях полученный образец окисляли целевыми аналитами (NaOCl, NaOBr, NCT, 12.5 мкМ). Далее белок растворяли в буферах с возрастающими значениями pH (шаг 0.5 единицы) и регистрировали спектры возбуждения флуоресценции ( $\lambda_{em}$  555 нм) на планшетном анализаторе SpectraMax iD5 (Molecular Devices). Используемые буферы состояли из смеси ацетата натрия (10 мМ), фосфата натрия (10 мМ), бората натрия (10 мМ) и цитрата натрия (10 мМ). Полученные данные анализировали при помощи GraphPad Prism8 и OriginPro 9.0 (OriginLab) путем построения зависимости соотношения Ex500/Ex417 от pH раствора. Значение  $pK_a$  для HurocratesCS определяли согласно аналогичному протоколу.

### **2.11. Расшифровка пространственной структуры HurocratesCS при помощи метода рентгеноструктурного анализа.**

Необходимые эксперименты были проведены нашими коллегами из лаборатории профессора Joris Messens (Брюссель, Бельгия). Далее, мы кратко опишем их основную суть.

HurocratesCS кристаллизовали методом диффузии в парах при концентрации 7 мг/мл и температуре 10 °C или 20 °C. Висячие капли формировали путем смешивания 1 мкл раствора белка и 1 мкл буфера, состоящего из Tris (0.1 М, pH 8), CaCl<sub>2</sub> (0.1 М), MgCl<sub>2</sub> (0.1 М) и PE15/4 (15%). С целью получения более крупных кристаллов с лучшими показателями дифракции небольшие иглы использовали в качестве затравок (microseeding). Во время сбора данных рентгеновской дифракции использовали раствор-

криопротектор, состав которого был аналогичен вышеупомянутому буферу за тем исключением, что концентрация PE15/4 была увеличена до 30%. Эксперимент проводили при 100 К и длине волны 0.980113 Å на установке, расположенной в Soleil synchrotron facility (Франция). Полученные данные процессировали при помощи XDS 0.6.5.5 [628]. Расшифровку пространственной структуры HypocratesCS проводили методом молекулярного замещения (Phenix suite [629,630]), при этом NemR (PDB: 4YZE) и

**Таблица 2.** Сбор дифракционных данных, а также статистические показатели уточнения структуры. \* Значения в скобках соответствуют оболочке с наибольшим разрешением.

<b>HypocratesCS</b>	
<b>Сбор дифракционных данных</b>	
<b>Пространственная группа</b>	C222 <sub>1</sub>
<b>Параметры ячейки</b>	
<i>a, b, c</i> (Å)	90.23, 95.44, 106.25
$\alpha, \beta, \gamma$ (°)	90.000, 90.000, 90.000
<b>Область разрешения (Å)</b>	47.72-2.20 (2.27-2.20)*
<b><i>R</i><sub>merge</sub> (%)</b>	8.2 (49.5)
<b><i>I</i> / <math>\sigma I</math></b>	15.8 (2.8)
<b>Полнота набора (%)</b>	95.0 (87.9)
<b>Избыточность набора</b>	9.1 (6.2)
<b>Уточнение структуры</b>	
<b>Область разрешения (Å)</b>	47.72-2.20
<b>Кол-во отражений</b>	22261 (2029)
<b><i>R</i><sub>work</sub> / <i>R</i><sub>free</sub></b>	19.85/27.30
<b>Кол-во атомов</b>	
Белок	3299
Лиганд	нет
Вода	185
<b><i>B</i>-факторы</b>	
Белок	42.53
Лиганд	нет
Вода	43.92
<b>Среднеквадратичные отклонения</b>	
Длин связей (Å)	0.01
Углов связей (°)	1.01

генетически кодируемый сенсор Case16 на основе *srYFP* (PDB: 3O77) служили в качестве моделей сравнения. Для коррекции и уточнения структуры использовали Coot 0.8.9.2 EL [631] и Phenix.Refine 1.11.1\_2575 [632]. Анализ карты Рамачандрана показывает, что 97.82% остатков расположены в благоприятных зонах, 1.70% – в маловероятных зонах и 0.49% – в запрещенных зонах. Полученная информация суммирована в **Таблице 2**.

### **2.12. Определение олигомерного состояния Нурocrates при помощи гель-фильтрации.**

Необходимые эксперименты проводили совместно с сотрудниками Лаборатории химии метаболических путей ИБХ РАН. Гель-фильтрацию осуществляли с использованием колонки Superdex® 200 Increase 10/300 GL (Cytiva), уравновешенной 100 мМ натрий-фосфатным буфером (рН 7.4), при температуре 24 °С и скорости потока 0.75 мл/мин. Колонку соединяли с хроматографической системой Agilent 1260 Bio-Inert LC, включавшей в свой состав диодный детектор Agilent 1260, после чего ее калибровали при помощи цитохрома с (12.4 кДа), карбоангидразы (29 кДа), бычьего сывороточного альбумина (66 кДа), алкогольдегидрогеназы (150 кДа),  $\beta$ -амилазы (200 кДа) и ферритина (450 кДа). Образцы Нурocrates предварительно инкубировали в присутствии 5 мМ DTT или же в присутствии NCT в молярном соотношении 1:20 (белок/окислитель) в течение 5 минут. Объем инъекции составлял 50 мкл. Для того, чтобы детектировать лишь молекулы с созревшим хромофором, в качестве метода регистрации сигнала использовали поглощение при длине волны 415 нм. Полученные данные анализировали в программе OriginPro 9.0 (OriginLab).

### **2.13. Измерение активности миелопероксидазы *in vitro* при помощи Нурocrates.**

Для того, чтобы проверить, способен ли Нурocrates регистрировать активность миелопероксидазы (МПО) *in vitro*, мы инкубировали очищенный препарат сенсора с 0.1 Ед/мл МПО и 100 мкМ  $H_2O_2$  в течение 10 минут в PBS. Далее, мы регистрировали спектр возбуждения флуоресценции образца ( $\lambda_{em}$  525 нм) при помощи прибора Varian Cary Eclipse Fluorescence Spectrophotometer. Для того, чтобы исключить возникновение артефактов, связанных с длительной инкубацией белка в условиях атмосферного воздуха, мы также смешивали пробы, которые содержали только МПО или  $H_2O_2$ , и тестировали их аналогичным образом. Полученные данные анализировали в программе OriginPro 9.0 (OriginLab).

Регистрацию динамики продукции  $\text{HOCl}$  под действием МПО *in vitro* осуществляли путем инкубации препарата *Hypocrates* в присутствии 0.1 Ед/мл МПО. При этом интенсивность флуоресценции ( $\lambda_{\text{em}} 525 \text{ нм}$ ), возбужденной при длинах волн 425 нм и 500 нм, снимали каждые 2.4 секунды с использованием спектрофлуориметра *Varian Cary Eclipse*. Реакцию начинали путем добавления 100 мкМ  $\text{H}_2\text{O}_2$  к образцу. Пробу, которая не содержала фермент, анализировали аналогичным образом с целью выявления возможного  $\text{H}_2\text{O}_2$ -опосредованного окисления. Мы также исследовали образец без добавления МПО и  $\text{H}_2\text{O}_2$  в качестве контроля на артефакты, связанные с длительной инкубацией белка в условиях атмосферного воздуха. Полученные данные обрабатывали при помощи *OriginPro 9.0* (*OriginLab*). Для трех перечисленных случаев мы определяли зависимость соотношения  $\text{Ex}500/\text{Ex}425$  от времени, после чего нормировали первые две кривые относительно третьей.

#### **2.14. Визуализация экзогенной добавки $\text{NaOCl}$ в клетках линии HeLa Kyoto при помощи *Hypocrates*, *HypocratesCS* и *SypHer3s*.**

Клетки линии HeLa Kyoto растили в DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*, ПанЭко) с добавлением 10% фетальной бычьей сыворотки (*Biosera*), 2 мМ L-глутамин (ПанЭко), 50 Ед/мл пенициллина (ПанЭко) и 50 мкг/мл стрептомицина (ПанЭко) при 37 °С в атмосфере, содержащей 5%  $\text{CO}_2$ . Культуру рассаживали каждые 2-3 дня. Перед трансфекцией клетки сажали на 35 миллиметровые чашки со стеклянным дном (*SPL Lifesciences*). После 24 часов инкубации, культуру трансфецировали необходимой плазмидой при помощи реагента *FuGene HD* (*Promega*) согласно протоколу производителя. Флуоресцентную микроскопию проводили на следующий день с использованием микроскопа *Leica DMI 6000*, снабженного объективом *HCX PL Apo CS 40.0 × 1.25 Oil UV*, а также комбинациями фильтров CFP (фильтр возбуждения 436/20, дихроматическое зеркало 455, барьерный фильтр 480/40) и GFP (фильтр возбуждения 470/40, дихроматическое зеркало 500, барьерный фильтр 525/50). Перед каждым экспериментом мы готовили свежий сток 10 мМ  $\text{NaOCl}$  на MQ. Съемку начинали с того, что культуральную среду в чашке заменяли на 900 мкл PBS, после чего регистрировали сигнал сенсоров в течение нескольких минут. Мы использовали PBS, поскольку известно, что, будучи сильным окислителем,  $\text{NaOCl}$  способен разрушаться в ходе взаимодействия с нуклеофильными компонентами среды. Необходимую аликвоту окислителя растворяли в 100 мкл PBS непосредственно перед добавкой так, чтобы финальная концентрация агента в образце находилась в диапазоне 10-40 мкМ ( $\sim 4.2\text{-}17 \text{ нмоль}/10^5$  клеток). Ранее мы



показали, что максимальная амплитуда ответа *Hypocrites* падает при нагревании среды, поэтому все измерения проводили при комнатной температуре. Сигналы сенсоров регистрировали как соотношения флуоресценции, возбужденной при 500 нм и 425 нм, и нормировали на интенсивность первого изображения в серии. Для анализа полученных результатов использовали программы Fiji (<https://fiji.sc>), Excel 2016 (Microsoft) и OriginPro 9.0 (OriginLab).

### **2.15. Получение первичной культуры полиморфноядерных лейкоцитов человека.**

Полиморфноядерные лейкоциты, включая нейтрофилы, выделяли из целой крови здоровых добровольцев. Все доноры были уведомлены о конечной цели использования их биологических материалов и подписали информированное согласие. Соответствующие эксперименты были одобрены местным этическим комитетом Российского Национального Исследовательского Медицинского Университета и не противоречили Хельсинкской декларации. Кровь собирали в пробирки с антикоагулянтом (ЭДТА), после чего разделяли на градиенте коммерческого реагента Polymorphprep™ (Alere Technologies AS) согласно протоколу производителя. Полученные фракции сыворотки и лейкоцитов переносили в индивидуальные емкости. В дальнейшем сыворотку использовали в экспериментах по визуализации фагоцитоза с целью опсонизации бактериальных клеток. Для удаления остаточных эритроцитов лейкоцитарную фракцию разводили в 10 раз при помощи реагента Red Blood Cell Lysis Solution (Miltenyi Biotec) и инкубировали в течение 10 минут на комнатной температуре. Далее, клетки собирали путем центрифугирования при 400 g, 10 минут. Описанную процедуру повторяли дважды. На следующем этапе полученные лейкоциты отмывали при помощи PBS два раза при аналогичных параметрах центрифугирования. Наконец, полученные образцы ресуспендировали в питательной среде RPMI-1640 (ПанЭко) с добавлением 2 mM L-глутамина (ПанЭко) и 0.5% фетальной бычьей сыворотки (Biosera). Концентрацию лейкоцитов оценивали в камере Горяева и доводили до  $1.5 \times 10^6$  клеток/мл. Активацию нейтрофилов осуществляли путем инкубации препаратов с рекомбинантным человеческим интерфероном  $\gamma$  (IFN- $\gamma$ , Gibco™) на протяжении 90 минут (37 °C, 5% CO<sub>2</sub>). После завершения обработки клетки отмывали от раствора путем центрифугирования (400 g, 10 минут) и помещали в вышеупомянутую среду. Культуру хранили в инкубаторе (37 °C, 5% CO<sub>2</sub>) до использования в экспериментах по микроскопии.

## **2.16. Визуализация (псевдо)гипогалогенного стресса в живых бактериях, фагоцитируемых первичными нейтрофилами человека.**

Для того, чтобы получить бактериальные клетки, экспрессирующие Нурocrates или НурocratesCS, компетентные *E. coli* штамма XL1-Blue трансформировали векторами pQE30, несущими гены соответствующих сенсоров. Колонии растили на твердой среде (LB-агар с добавлением 150 мкг/мл ампициллина) в течение 14 часов при 37 °С. Для достижения лучшего созревания белков чашки дополнительно инкубировали при комнатной температуре на протяжении двух суток. Опсонизацию бактерий проводили в 1 мл раствора, состоящего из PBS и человеческой сыворотки в объемном соотношении 1:1. Образцы инкубировали при 37 °С, 300–400 об/мин в течение 30 минут. Далее, клетки промывали три раза при помощи PBS путем центрифугирования (1200 g, 2 минуты), после чего полученную биомассу ресуспендировали в том же самом буфере до достижения оптической плотности 0.5 при 600 нм.

Перед микроскопией культуральную среду, в которой находились полиморфноядерные лейкоциты, заменяли на RPMI-1640 без фенолового красного и бикарбоната натрия (Sigma-Aldrich), содержащую 2 мМ L-глутамин (Sigma-Aldrich), 0.5% фетальной бычьей сыворотки (Biosera) и 20 мМ HEPES. Данную процедуру осуществляли путем центрифугирования при 400 g в течение 10 минут. На следующем этапе 800 мкл суспензии лейкоцитов ( $1.8 \times 10^6$  клеток/мл) переносили в 35 миллиметровую конфокальную чашку (SPL Lifesciences). Фагоцитоз инициировали путем внесения аликвоты опсонизированных *E. coli* в PBS объемом 75 мкл. Съемку проводили на микроскопе ECLIPSE Ti2 (Nikon Instruments Inc.), снабженном масляным объективом Plan Apo VC 100X NA 1.40. Для регистрации сигнала использовали три канала: диод 395 нм (экспозиция 100 миллисекунд, интенсивность 9%), диод 470 нм (экспозиция 200 миллисекунд, интенсивность 9%) и проходящий свет. Для обоих сенсоров (Нурocrates и НурocratesCS) мы измеряли соотношение флуоресценции, возбужденной при 470 нм и 395 нм. Полученные значения нормировали относительно величин, установленных в моменты, предшествующие фагоцитозу. Для анализа результатов использовали программы Fiji (<https://fiji.sc>), Excel 2016 (Microsoft) и OriginPro 9.0 (OriginLab).

## **2.17. Визуализация (псевдо)гипогалогенного стресса в модели ампутации хвостового плавника *Danio rerio*.**

Необходимые эксперименты проводили совместно с нашими коллегами из лаборатории профессора Sophie Vrız (Париж, Франция). Соответствующее исследование было одобрено Французским Министерством сельского хозяйства (n°C75-05-12).

На первом этапе осуществляли *in vitro* синтез мРНК, кодирующих Hupocrates, HupocratesCS и HyPerRed, при помощи mMessage mMachine Transcription Kit (Invitrogen) согласно протоколу производителя. Для временной экспрессии сенсоров в тканях мальков *D. rerio* (дикий тип, линия Tübingen) проводили закол мРНК в эмбрионы на стадии одной клетки (80 нг/мкл для Hupocrates и HupocratesCS; 50 нг/мкл для HyPerRed). Эмбрионы содержали при 28 °C в воде с добавлением 0.2 mM N-фенилтиомочевины (Sigma), препятствующей накоплению пигмента. Флуоресцентную микроскопию осуществляли спустя 48 часов после оплодотворения. Мальков анестезировали в 0.02% MS-222 трикаине (Sigma), погружали в легкоплавкую агарозу (0.8%), после чего подвергали ампутации хвостового плавника под стереомикроскопом. Сигналы сенсоров визуализировали при помощи флуоресцентного микроскопа Zeiss Axio Observer Z1, снабженного вращающимся диском CSU-W1 Yokogawa, камерой sCMOS Hamamatsu и масляным объективом 25x (Zeiss 0.8 Imm WD: 0.19 mm). Hupocrates и HupocratesCS возбуждали под действием твердотельных лазеров с диодной накачкой (100 мВт 405 нм, 150 мВт 491 нм, барьерный фильтр 525/50). Для HyPerRed использовали лазер 100 мВт 561 нм (барьерный фильтр 595/50). С целью вычисления амплитуды ответа флуоресцентный сигнал, приходящий из тканей, нормировали относительно средней эмиссии образца до ампутации. Статистическую обработку данных проводили при помощи двухфакторного дисперсионного анализа с последующим тестом Тьюки. Анализ полученных результатов осуществляли в программах Fiji (<https://fiji.sc>), Excel 2016 (Microsoft) и OriginPro 9.0 (OriginLab).

### 3. Результаты и обсуждение.

#### 3.1. Выбор платформы для разработки генетически кодируемого сенсора (псевдо)гипогалогенных кислот и их производных.

На первом этапе работы мы должны были выбрать белок, обладающий достаточной селективностью и чувствительностью к (псевдо)гипогалогенным кислотам, чтобы использовать его в качестве сенсорного модуля разрабатываемого индикатора. Интересная особенность гипогалогенного стресса заключается в том, что, по всей видимости, в бактериях отсутствуют высокоспециализированные регулоны, ответственные за его нейтрализацию, аналоги которых широко известны для таких АФК как пероксид водорода (*OxyR* регулон) или же супероксид-анион (*SoxR* регулон) [633]. Напротив, многочисленные данные транскриптомики свидетельствуют о том, что воздействие НОСl активирует множество генов, при этом почти все из них принимают участие и в иных метаболических программах, направленных на противодействие окислительному стрессу, повышению концентрации активных электрофилов, серному голоданию или же увеличению лабильного пула металлов [120]. В опубликованной литературе убедительно показано, что гипогалогенные кислоты регулируют экспрессию генов путем воздействия на такие белки как *OxyR*, *SoxR*, *OhrR*, *PerR*, *Spx* и другие. К сожалению, по ряду причин ни один из них не может выступать в качестве удовлетворительного кандидата на роль сенсорного модуля разрабатываемого инструмента. Во-первых, в большинстве случаев конкретные механизмы НОСl-опосредованной регуляции остаются неясными. Например, *OhrR*, *OxyR* и *Spx* содержат редокс-активные остатки цистеинов, однако, неизвестно, взаимодействуют ли они с гипогалогенными кислотами напрямую или же детектируют какие-либо вторичные события [634–636]. В частности, показано, что НОСl способна участвовать в реакциях Фентоновского типа, одним из известных последствий которых является усиление перекисного окисления липидов [637]. Таким образом, можно предположить, что именно интермедиаты данного процесса являются непосредственными активаторами *OhrR*. *PerR* содержит два металл-связывающих центра – структурный сайт, включающий в свой состав ион  $Zn^{2+}$ , и регуляторный сайт, связывающий  $Fe^{2+}$  [638]. При увеличении концентрации  $H_2O_2$  ион железа окисляется, что приводит к образованию гидроксил-радикала, незамедлительно взаимодействующего с ключевыми остатками гистидина белка. Описанная цепочка событий вызывает изменение его конформации и, как результат, потерю способности связываться с операторными участками ДНК.

Эксперименты *in vivo* показали, что HOCl окисляет остатки цистеина, участвующие в координации  $Zn^{2+}$ , однако, остается неизвестным, лежит ли данная реакция в основе инактивации PerR в условиях гипогалогенного стресса [634]. Так, работы, проведенные с использованием живых бактерий, предполагают, что вторичное увеличение концентрации супероксид-аниона, возникающее вследствие ингибирования SOD, вносит существенный вклад в HOCl-опосредованную регуляцию PerR [639]. Впрочем, недостаточная изученность конкретных молекулярных механизмов, обеспечивающих чувствительность к гипогалогенным кислотам, является куда менее значительной проблемой, нежели тот факт, что почти все перечисленные белки, даже при условии, что они взаимодействуют с HOCl напрямую, не являются строго селективными в отношении данного агента. Редокс-активные остатки цистеина OxyR могут окисляться под действием  $H_2O_2$ ,  $NO\bullet$  и полисульфидов [640–642]. Селективными мишенями OhrR служат пероксиды органических молекул [643]. Sprx взаимодействует с  $H_2O_2$  и активными электрофилами [644], а PerR выступает сенсором на активные формы кислорода и азота [645]. Наконец, окисление железосерного кластера SoxR происходит под действием  $O_2^{\bullet-}$  [646]. Таким образом, в течение многих лет в литературе преобладала точка зрения, согласно которой гипогалогенные кислоты являются настолько мощными и неселективными агентами, повреждающими столь широкий спектр клеточных мишеней, что возникновение специализированных систем по их детекции оказывается ненужным (т.е. существует необходимость одновременной активации множества разнообразных анти-стресс программ) или даже и вовсе невозможным.

Ситуация изменилась в 2012-2013 годах, когда три независимых коллектива продемонстрировали, что белки HupT (YjiE) [647], HupR из *B. subtilis* (YybR) [648], RclR (YkgD) [649] и NemR [624] являются относительно селективными в отношении гипогалогенных кислот. Несколько позже были открыты и другие полипептиды с аналогичными свойствами – HupR из *S. aureus* (2018 год, не является гомологом HupR из *B. subtilis*) [650], HupS [651], а также HprS (2021 год) [652]. Настоящий проект был начат в 2017 году, таким образом, мы не могли располагать информацией, опубликованной позже обозначенного периода времени.

HupR из *B. subtilis* относится к большой группе регуляторов из семейства MarR, к которым принадлежит, например, OhrR. Palm и коллеги убедительно продемонстрировали, что способность HupR изменять свою активность под действием HOCl связана с образованием дисульфидной связи между остатками Cys14 и Cys49, входящими в состав двух индивидуальных полипептидных цепей гомодимера [648]. Cys14

находится с N-концевой стороны  $\alpha$ -спирали-1, диполь которой приводит к его активации за счет снижения  $pK_a$  тиоловой группы до 6.36 единицы, что делает его отличной мишенью для электрофильных молекул [648]. Существует как минимум две причины из-за которых NurR не может служить удовлетворительным кандидатом на роль сенсорного домена разрабатываемого инструмента. Во-первых, хоть профиль его селективности и не был детально охарактеризован *in vitro*, имеющиеся данные позволяют предполагать, что помимо НОСІ обсуждаемый белок также взаимодействует с активными электрофилами по типу хинонов. При этом механизмы обеих реакций, по всей видимости, вовлекают одни и те же аминокислоты. Во-вторых, в отличие от родственных белков MexR и OhrR [653], ключевые остатки цистеина NurR расположены на достаточно близком расстоянии друг от друга (8-9 Å), поэтому образование ковалентной связи между ними не вызывает выраженное изменение конформаций индивидуальных субъединиц. Согласно рентгеноструктурному анализу, наибольшие пространственные сдвиги происходят на уровне четвертичной структуры всего комплекса [648]. Таким образом в NurR отсутствуют участки с высокой конформационной мобильностью, которые служат для сопряжения сенсорного и репортерного доменов индикатора. NurS из *M. smegmatis* является еще одним представителем семейства MarR. Воздействие НОСІ приводит к тому, что две индивидуальные субъединицы белка окисляются и образуют дисульфидную связь между остатками Cys58 [651]. К сожалению, профиль селективности NurS не был изучен ни *in vitro*, ни *in vivo*, а его пространственная структура не расшифрована. Схожие проблемы характерны и для NurR из *S. aureus*, который принадлежит к группе Rrf2-подобных регуляторов и работает за счет образования межсубъединичной связи между Cys33 и Cys99 [650].

NurT относится к LysR-подобным транскрипционным факторам – большой группе белков, которая включает в свой состав, например, OxyR. Его активация в ответ на гипогалогенный стресс связана с обратимым окислением остатков Met123, Met206 и Met230 до метионин-сульфоксидов [654]. Согласно экспериментальным данным ни один из цистеинов белка не является необходимым для его функционирования, при этом связывание с ДНК происходит лишь после того, как НОСІ провзаимодействует со всеми ключевыми метионинами [654]. По всей видимости, именно это обстоятельство обеспечивает высокую селективность NurT в отношении гипогалогенных кислот, но не  $H_2O_2$ , поскольку последний также может окислять серу в составе метионинов, однако, соответствующая константа скорости принимает значение на 9-10 порядков ниже [655]. Таким образом, одновременное окисление трех остатков метионина под действием

физиологических концентраций  $\text{H}_2\text{O}_2$  видится маловероятным событием. Несмотря на то, согласно опубликованным данным, взаимодействие НурТ с широкой панелью оксидантов никогда не изучалось, обсуждаемый белок считается одним из самых селективных транскрипционных факторов, обеспечивающих способность бактерий регистрировать гипогалогенный стресс. Впрочем, надо понимать, что некоторые физиологические окислители, например  $\text{ONOO}^-$ , демонстрируют относительно высокие константы скорости взаимодействия с остатками метионина [656]. Таким образом, не исключен тот факт, что НурТ не является специфичным в отношении гипогалогенных кислот в той мере, в которой это принято обсуждать в литературе. Поскольку пространственная структура НурТ из *S. Typhimurium* была расшифрована лишь в 2019 году, мы не стали использовать обсуждаемый белок в качестве сенсорного домена для создаваемого инструмента. Мы посчитали, что работа с полипептидом, про который неизвестно, содержит ли он подвижные участки, а если содержит – как именно они изменяют свою конформацию в ответ на окисление, связана со слишком большим числом рисков. На текущий момент показано, что между субдоменами RD-I и RD-II в составе НурТ расположен типичный для LysR-подобных белков сайт связывания лиганда [657]. Он представляет собой небольшую полость, доступную для растворителя, в которую направлена боковая цепь Met206. Быстрое замачивание кристаллов белка в  $\text{HOCl}$  позволило установить, что молекулы окислителя действительно заходят в обсуждаемое пространство, где они удерживаются водородными связями, направленными от пептидных групп Ser110, Tyr205 и Met206, а также от боковой цепи Ser110 [657]. Для того, чтобы исследовать эффекты окисления метионинов в белках, иногда используют замену Met→Gln, поскольку последний демонстрирует электронную плотность, близкую к сульфоксиду метионина. Расшифровка пространственной структуры мутанта НурТ<sup>Met206Gln</sup> показала, что в данном полипептиде происходит выраженное вращение RD-I и RD-II относительно друг друга, достигающее амплитуды около  $30^\circ$  [657]. Таким образом, НурТ является интересным кандидатом для создания генетически-кодируемых сенсоров (псевдо)гипогалогенных кислот и может быть использован в будущих работах.

Другим белком, задействующим окисление остатков метионина для детекции  $\text{HOCl}$ , является HprS, участник двухкомпонентной сигнальной системы, которую изначально рассматривали в качестве сенсора на  $\text{H}_2\text{O}_2$  [658]. Однако, более поздние работы продемонстрировали, что HprS не является в достаточной мере чувствительным, чтобы регистрировать физиологические концентрации этого оксиданта [652]. Существует целый ряд причин, по которым HprS даже сейчас не может быть легко использован для

разработки генетически кодируемых сенсоров. Во-первых, конкретный механизм его активации под действием НОСІ остается не до конца проясненным. Эмпирические данные свидетельствуют в пользу ключевой роли консервативных остатков Met72 и Met153, однако участие Met73 также не было исключено [652]. Во-вторых, HprS является трансмембранным белком, и обсуждаемые аминокислоты расположены в его периплазматической петле, пространственная укладка которой, скорее всего, в существенной мере поддерживается гидрофобными доменами, пронизывающими бислой липидов.

Пожалуй, RclR представляет собой белок, чья селективность в отношении гипогалогенных кислот и их производных доказана в наибольшей мере. Данные, полученные в экспериментах *in vivo* с участием живых бактерий, убедительно продемонстрировали, что активация RclR происходит лишь в ответ на НОСІ и N-хлоротаурин, но не на широкую панель активных форм кислорода, азота или же реакционноспособных электрофилов [649]. Обсуждаемый полипептид относится к AgaC-семейству регуляторов, при этом его N-концевой домен демонстрирует гомологию в отношении малоизученной группы белков под общим названием Cupin\_6 [649]. RclR содержит два консервативных остатка цистеина – Cys21 и Cys89, которые обеспечивают его способность чувствовать НОСІ. Экспериментальные данные свидетельствуют, что в системах *in vitro* необходимым является лишь первый из них, в то время как в условиях *in vivo* обе аминокислоты должны присутствовать для запуска ответа [649]. По всей видимости, Cys21 служит первичной мишенью НОСІ, под действием которой он конвертируется в сульфеновую кислоту, что оказывается достаточным для изменения конформации белка. Однако, в живых клетках данная модификация может быть подвержена быстрой репарации, поэтому образование внутримолекулярной дисульфидной связи с вовлечением Cys89 увеличивает время жизни активированного состояния [649]. Несмотря на то, что RclR представляет собой крайне перспективного кандидата для разработки генетически кодируемых сенсоров, мы не стали использовать его в своей работе. Дело в том, что представители Cupin\_6 крайне плохо изучены, поэтому даже теоретическое предсказание того, как именно дисульфидная связь влияет на пространственную укладку белка, является достаточно сложным. Насколько нам известно, с 2013 года структура RclR так и не была расшифрована.

NemR из *E. coli* представляет собой транскрипционный фактор, относящийся к семейству TetR-подобных регуляторов, активность которого зависит от алкилирования остатков цистеина, входящих в его состав [659]. Поиски физиологических модуляторов

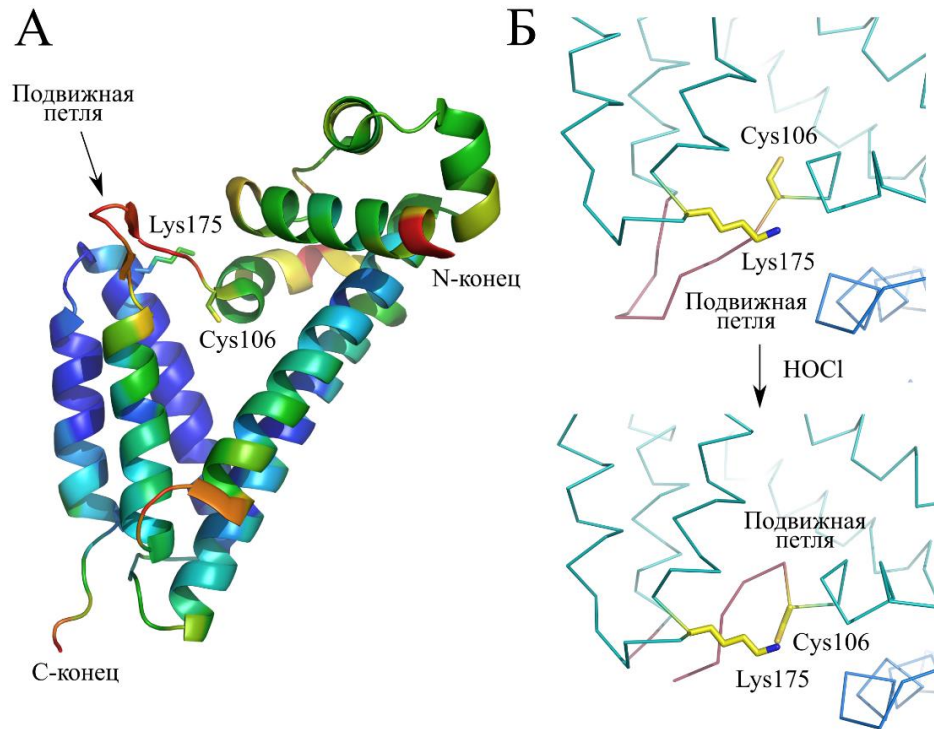


NemR позволили установить, что данный белок контролирует экспрессию трех генов (*nemR*, *nemA* и *gloA*), объединенных в единый оперон [660]. NemA и GloA являются частью системного ответа бактерий на стресс, вызванный активными электрофилами, поскольку они способны нейтрализовывать окисленные хиноны, а также реакционноспособные карбонильные соединения по типу глиоксаля. Детальные биохимические исследования показали, что под действием упомянутых молекул в димерах NemR образуются межсубъединичные дисульфидные связи между остатками Cys21 и Cys21', а также Cys116 и Cys116', которые снижают сродство белка к операторным последовательностям в ДНК [660]. В том же году было показано, что транскрипция *nemA* и *gloA* усиливается в ответ на HOCl, при этом выживаемость бактерий зависит от возможности экспрессировать соответствующие ферменты [624]. Данное наблюдение позволило предположить, что NemR является транскрипционным фактором, детектирующим гипогалогенный стресс и участвующим в его нейтрализации. В ходе биоинформатического анализа гомологичных последовательностей, коллектив лаборатории под руководством профессора Ursula Jacob, установил, что среди шести остатков цистеина в NemR (21, 98, 106, 116, 149 и 153), только Cys106 является строго консервативным [624]. Эксперименты с различными мутантами, в которых обсуждаемые позиции были заменены на реакционно-инертные аланины, показали, что Cys106 является достаточным, но не строго необходимым для диссоциации комплекса NemR-оператор под действием HOCl. Однако, в том случае, если белок содержал все цистеины кроме 106-ого, экспрессия *nemR*-оперона быстро затухала во времени. Иначе говоря, обсуждаемый аминокислотный остаток важен для стабильной индукции генов, происходящей в условиях гипогалогенного стресса [624]. Таким образом, были сформированы представления о том, что NemR представляет собой транскрипционный регулятор, обеспечивающий способность бактерий противостоять как активным электрофилам, так и гипогалогенным кислотам. На текущий момент известно, что электрофильный стресс является следствием гипогалогенного стресса. Данное обстоятельство связано с тем фактом, что по сравнению с большинством активных окислителей, гипогалогенные кислоты единственные вызывают массовую денатурацию клеточных белков [120]. Для того, чтобы избежать обильного накопления денатурированных агрегатов в цитоплазме, бактерии усиливают синтез полифосфатов, которые служат своеобразными шаперонами, защищающими развернутые полипептиды от ассоциации друг с другом [661]. В результате этой реакции в клетке резко падает концентрация свободного фосфата, что приводит к активации белков, которые разлагают дигидроксиацетонфосфат на остаток

фосфорной кислоты и метилглиоксаль [662]. В конечном итоге, способность противостоять гипогалогенному стрессу хотя бы отчасти связана со способностью нейтрализовать активные электрофилы.

В своей первой статье, коллективу авторов не удалось установить механизм, который лежит в основе чувствительности NemR к активным формам хлора. Они лишь продемонстрировали, что Cys106 не участвует в образовании дисульфидных связей, а также не конвертируется в сульфеновую кислоту в присутствии окислителя [624]. Позже они смогли получить кристаллы NemR<sup>C106</sup> (мутант белка, содержащий цистеин лишь в 106-ой позиции) и расшифровать их пространственную структуру [663]. Оказалось, что регион белка, представленный 97-105-ым остатками, формирует крайне подвижную петлю, которая принимает различные конформации в рамках ассиметричной единицы кристалла (**Рис. 27А**). В частности, в одной из цепей боковая группа Cys106 расположена таким образом, что ее атом серы значительно сближен с атомом азота из Lys175 (**Рис. 27Б**). На основании данного наблюдения авторы предположили, что в том случае, если Cys106 будет хлорирован под действием HOCl, он сможет служить электрофильной мишенью для аминокислотной группы Lys175 [663]. Обсуждаемая реакция будет завершаться образованием ковалентной сульфенамидной связи. Интересно, что остаток Lys175 также демонстрирует относительно высокую консервативность среди гомологов NemR. При помощи ряда флуориметрических и масс-спектрометрических опытов коллектив авторов косвенно подтвердил, что обработка активными формами хлора приводит к возникновению сульфенамидной связи в NemR [663].

В свете информации, изложенной выше, в 2017 году мы пришли к выводу, что NemR<sup>C106</sup> является наиболее удачным кандидатом на роль сенсорного домена для разрабатываемого инструмента (**Табл. 3**). Во-первых, хоть он и чувствует активные электрофилы, в основе данного свойства лежат реакции с участием Cys21 и Cys116. В то же самое время, Cys106 является достаточным для взаимодействия белка с активными формами хлора. Во-вторых, Gray и соавторы показали, что в условиях *in vivo* ни пероксид водорода, ни супероксид-анион, ни оксид азота не вызывают экспрессию *nemR*-оперона [624]. Таким образом, мы могли ожидать, что NemR<sup>C106</sup> является селективным в отношении активных галогенов, но не активных форм азота или кислорода. В-третьих, для NemR<sup>C106</sup> из *E. coli* расшифрована пространственная структура. И, наконец, в-четвертых, опубликованная структура предполагает, что взаимодействие белка с HOCl приводит к



**Рисунок 27.** (А) Пространственная структура транскрипционного фактора  $NemR^{C106}$  из *E. coli*. Теплые цвета свидетельствуют о молекулярной подвижности (b-фактор). (Б) Подвижная петля  $NemR^{C106}$  принимает две возможные конформации. Gray и соавторы предполагают, что данный переход индуцируется HOCl-опосредованным окислением. Рисунок сделан на основе PDB ID: 4YZE.

**Таблица 3.** Некоторые свойства редокс-активных белков, которые могут быть использованы в качестве сенсорных доменов генетически кодируемого индикатора для регистрации HOCl.

Название	Организм	Год	Механизм	Селективность	Структура	Подвижность
HupT	<i>E. coli</i>	2012	Окисление Met123, Met206 и Met230	?	+ (2019, <i>S. Typhimurium</i> )	Выраженная (2019, <i>S. Typhimurium</i> )
HupR	<i>B. subtilis</i>	2012	Дисульфидная связь (Cys14-Cys49')	–	+	Слабая
RclR	<i>E. coli</i>	2013	Дисульфидная связь (Cys21-Cys89)	+	–	?
NemR	<i>E. coli</i>	2013	Сульфенамидная связь (Cys106-Lys175)	+	+	Умеренная
HupR	<i>S. aureus</i>	2018	Дисульфидная связь (Cys33-Cys99')	?	–	?
HupS	<i>M. smegmatis</i>	2020	Дисульфидная связь (Cys58-Cys58')	?	–	?
HprS	<i>E. coli</i>	2021	Окисление Met72 и Met153; возможно Met73	?	– (трансмембранный)	?

Апостроф обозначает образование межузьединичной связи.

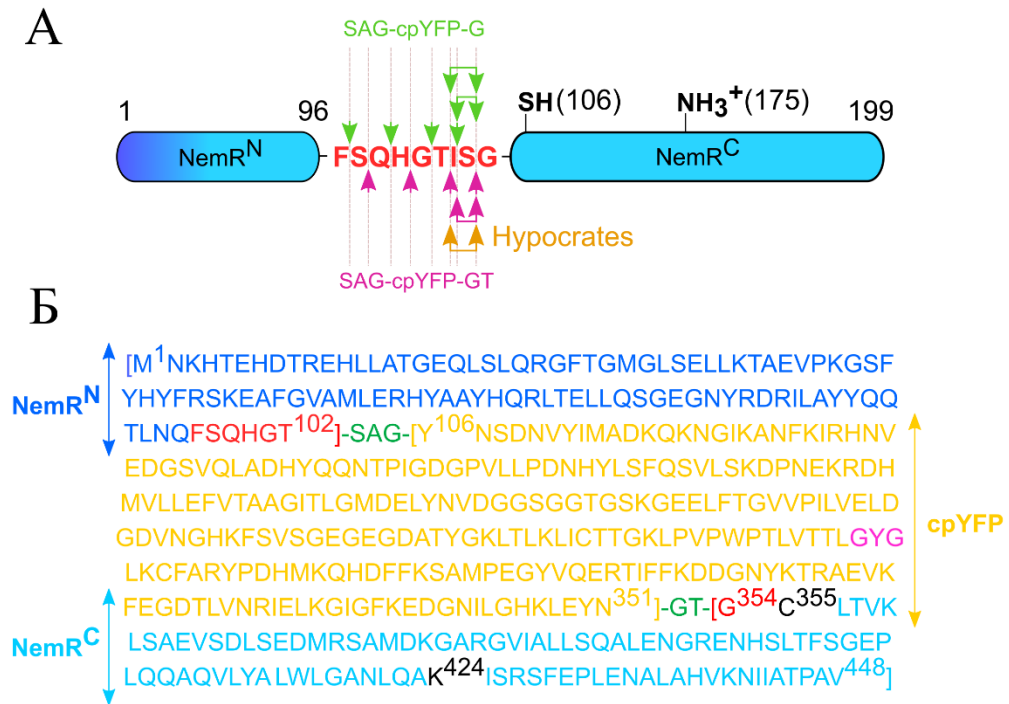
локальным конформационным изменениям, выраженным в достаточной мере, чтобы они могли выступать в качестве молекулярного переключателя, воздействующего на оптические свойства флуоресцентного белка.

### **3.2. Получение и тестирование первичных версий сенсора для детекции (псевдо)гипогалогенных кислот и их производных.**

Поскольку под действием гипогалогенных кислот  $NemR^{C106}$  демонстрирует хоть и выраженное, но очень локальное изменение конформации, которое не затрагивает общую архитектуру белка или положение его N- и C-концов, мы пришли к выводу о том, что наиболее оптимальной стратегией разработки сенсора будет интеграция  $srFP$  в область подвижной петли. При этом в качестве репортерного домена мы решили использовать  $srYFP$ , который отлично зарекомендовал себя при создании генетически кодируемых индикаторов (например, пробы семейства  $HyPer$  [591–593],  $MetROx$  [598],  $GEVALs$  [664] и другие). По сравнению с  $srGFP$  данный белок чаще сохраняет ESPT в химерных конструкциях и, тем самым, обеспечивает ратиометрический сигнал [567]. Конечно, наилучшим решением стала бы интеграция красного варианта, поскольку практическая работа с ними сопряжена с меньшей токсичностью возбуждающего света для клеток, а также позволяет осуществлять визуализацию более глубоких образцов. Однако, на текущий момент круговые пермутанты с подобными свойствами являются относительно бледными, а также редко демонстрируют два пика возбуждения [567].

В общей сложности мы создали восемь молекулярно-генетических конструкций (**Рис. 28А**), в рамках которых вставка  $srYFP$  покрывает всю область подвижной петли  $NemR^{C106}$  (с 97-ого по 105-ый остатки). Поскольку эффективность сопряжения сенсорного и репортерного доменов сильно зависит от физического контакта между ними, мы задействовали две пары гибких линкеров ( $SAG/GT$  и  $SAG/G$ ), которые наиболее часто используют в комбинации с данным флуоресцентным белком [567]. Во многих исследованиях по разработке полипептидных сенсоров показано, что внесение небольших делеций в регион сопряжения также является плодотворной стратегией. По всей видимости, это позволяет хромофорному окружению вступить в более «тесный» контакт с конформационно-подвижными остатками сенсорного домена. Описанный подход был использован, например, при создании  $SoNar$  [601]. Таким образом, мы собрали еще четыре дополнительные конструкции, которые содержат делеции 104-ой или же 104-105-ых позиций  $NemR^{C106}$ .

Химерные белки были проэкспрессированы в клетках *E. coli* на твердой



**Рисунок 28.** (А) Позиции вставки *cpYFP* в область подвижной петли  $NemR^{C106}$ , которые мы тестировали в своей работе. Числа соответствуют порядковым номерам аминокислотных остатков согласно последовательности  $NemR^{C106}$ . Красные буквы соответствуют подвижной петле. Одиночные и двойные стрелки соответствуют вставкам, которые сопровождалась и не сопровождалась делециями. (Б). Аминокислотная последовательность версии  $NemR^{1-102}$ -SAG-*cpYFP*-GT- $NemR^{105-199}$ , которая была названа *Hypocrates*. Синий – N-концевая часть  $NemR^{C106}$ . Голубой – С-концевая часть  $NemR^{C106}$ . Красный – подвижная петля. Зеленый – линкеры. Желтый – *cpYFP*. Розовый – хромофорная триада. Черный – ключевые остатки Cys и Lys.

**Таблица 4.** Некоторые свойства очищенных препаратов избранных версий  $NemR$ -*cpYFP* в PBS.

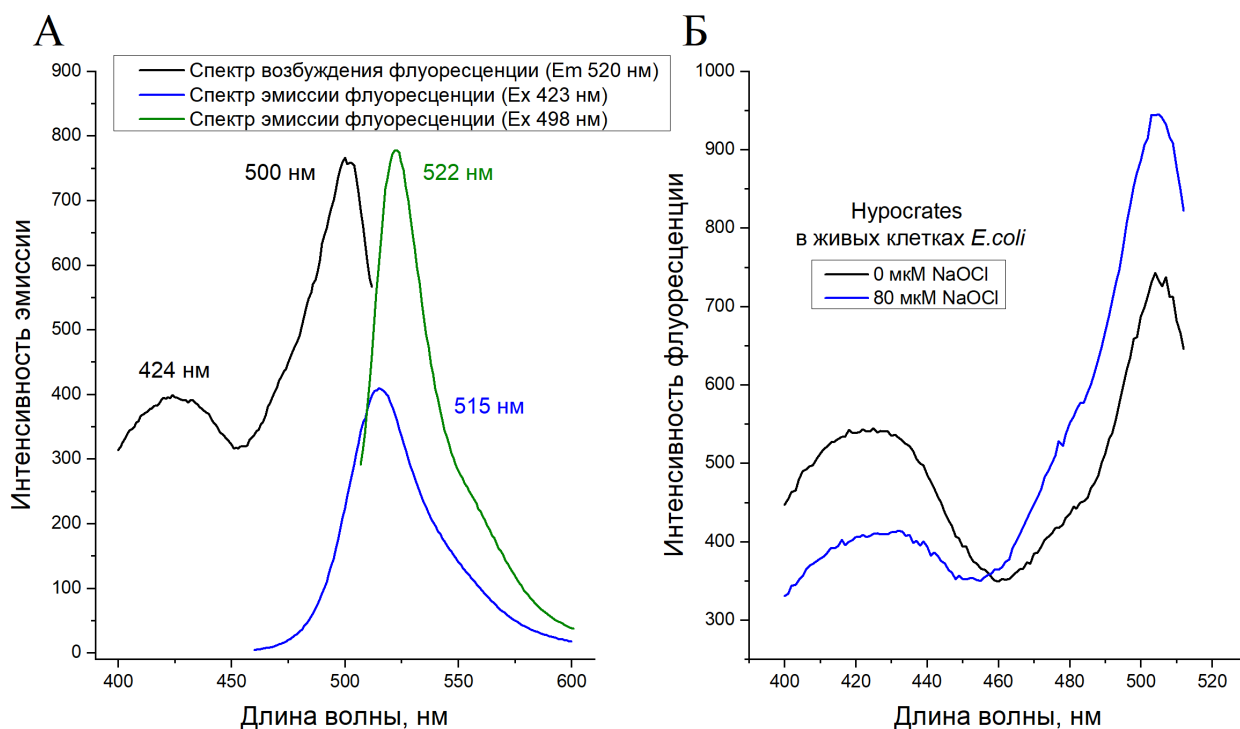
Позиция вставки	Амплитуда ответа	Яркость при 425 нм (% от <i>Hypocrates</i> )	Яркость при 500 нм (% от <i>Hypocrates</i> )
104-105 (SAG/GT)	~1.2	~132	~82
103-105 (SAG/G)	~1.2	~71	~52
103-105 (SAG/GT)	~1.3	~143	~146
102-105 (SAG/G)	~1.3	~78	~49
102-105 (SAG/GT); <i>Hypocrates</i>	~1.6	100	100

питательной среде, после чего мы визуальнo оценивали интенсивность их свечения при помощи флуоресцентного бинокуляра. На первый день все двенадцать первичных версий демонстрировали эмиссию в обоих каналах возбуждения (синий, соответствует протонированному хромофору, и циановый, соответствует депротонированному

хромофору), которая значительно превышала уровень автофлуоресценции бактерий. Однако, ни один из белков не обладал достаточной яркостью для того, чтобы быть использованным в дальнейших тестах. Данная проблема является достаточно частой для сенсоров на основе *cpYFP* – дестабилизированные структуры требуют больше времени для созревания [567]. Соответственно, мы оставили чашки с бактериями еще на сутки при 17°C, поскольку пониженная температура способствует более эффективному фолдингу. На второй день все конструкции светились с достаточной интенсивностью, что позволило нам описать их основные свойства.

Первичные версии сенсора тестировали путем добавления 80 мкМ NaOCl к суспензии бактерий в PBS (данные не приведены). Среди двенадцати вариантов лишь 104-105 (SAG/GT), 103-105 (SAG/G), 103-105 (SAG/GT), 102-105 (SAG/G) и 102-105 (SAG/GT) продемонстрировали относительно выраженное изменение оптических свойств в результате гипохлорит-опосредованного окисления. Во всех случаях мы наблюдали рост правого пика, а также падение левого пика возбуждения флуоресценции. Таким образом, сигнал  $\text{NemR}^{\text{C106}}\text{-cpYFP}$  может быть рассчитан как  $E_{x500}/E_{x425}$ . Для того, чтобы изучить биохимические свойства пяти наилучших версий более детально, мы очистили соответствующие белки при помощи метал-аффинной хроматографии, после чего оценивали их максимальные амплитуды ответа, а также яркость (Табл. 4). Во время отработки протокола мы заметили интересную особенность, что наличие восстанавливающих агентов в буферах для выделения не оказывало существенного влияния на амплитуду ответа белков. Таким образом, мы можем предположить, что  $\text{NemR}^{\text{C106}}\text{-cpYFP}$  обладает высокой устойчивостью к атмосферному кислороду. Оказалось, что версия 103-105 (SAG/GT) демонстрирует наибольшую интенсивность свечения, однако, по силе ответа она уступает варианту 102-105 (SAG/GT). Поскольку величина 1.6 раза сама по себе является достаточно скромной, мы решили отдать предпочтение второй конструкции и отобрали ее для дальнейшего описания. Данный белок получил название *Hypocrates* (от Hypochlorite Ratiometric Sensor), что является созвучным с именем великого древнегреческого врача Гиппократ (англ. Hippocrates), который был одним из первых людей в истории, изучавших воспаление как медицинский феномен. Стоит обратить внимание на то, что ключевые аминокислотные остатки  $\text{NemR}^{\text{C106}}$ , Cys106 и Lys175, принимают номера 355 и 424 согласно первичной последовательности *Hypocrates* (Рис. 28Б).

Очищенный препарат *Hypocrates* характеризуется двумя максимумами



**Рисунок 29.** (А) Оптические свойства очищенного препарата Nurocrates в PBS. (Б) Изменение спектра возбуждения флуоресценции Nurocrates в бактериальных клетках под действием экзогенной добавки NaOCl.

возбуждения флуоресценции (424 нм и 500 нм), которым соответствует единый пик эмиссии, расположенный в области 517 нм (Рис. 29А). Небольшая разница в положении его максимума в зависимости от длины волны возбуждения связана с тем, что при ESPT микроокружение хромофора не успевает перестроиться в состояние с наименьшей энергией. Рисунок 29Б демонстрирует изменение спектра возбуждения флуоресценции Nurocrates в бактериальных клетках, обработанных NaOCl.

Когда мы оценивали яркость первичных версий  $NemR^{C106}$ -срYFP, мы осуществляли измерение концентрации полипептидов при помощи бицинхонинового протокола. Однако, следует понимать, что очищенные препараты флуоресцентных белков могут содержать заметную долю несозревших молекул с не до конца сформированными хромофорами. Поэтому мы приняли решение измерить квантовый выход и молярный коэффициент поглощения Nurocrates более аккуратно, и для этого установили его концентрацию методом щелочной денатурации. В условиях высоких значений pH желтые флуоресцентные белки разворачиваются, при этом созревшие хромофоры конвертируются в форму, которая поглощает свет при длине волны 445 нм с  $\epsilon = 44,000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  [310]. Мы также проверяли, как обсуждаемые параметры изменяются при окислении сенсора

**Таблица 5.** Оптические свойства Нурocrates в полностью восстановленном (ДТТ) и окисленном (NCT) состояниях. Яркость вычисляли как произведение квантового выхода флуоресценции и молярного коэффициента поглощения.

Длина волны, нм	Восстановленный	Окисленный
	Квантовый выход	
425	~0.19	~0.15
500	~0.82	~0.83
	Молярный коэффициент поглощения, М <sup>-1</sup> см <sup>-1</sup>	
425	~31200	~29600
500	~12000	~16700
	Яркость	
425	~5900	~4400
500	~9900	~13900

активными формами хлора. Полученные данные суммированы в **Таблице 5**. Как можно видеть, яркость Нурocrates, оцененная как произведение квантового выхода флуоресценции и молярного коэффициента поглощения, составляет примерно 7%-22% от яркости EYFP, который был использован в качестве контроля (Fpbase ID: 8DNLG). Таким образом, в этом вопросе сенсор в заметной мере уступает интактному флуоресцентному белку, что является общим случаем при разработке инструментов подобного типа. Интересно, что снижение яркости Нурocrates происходит в основном за счет довольно скромных показателей поглощения, при этом квантовый выход протонированной формы хромофора оказывается достаточно высоким.

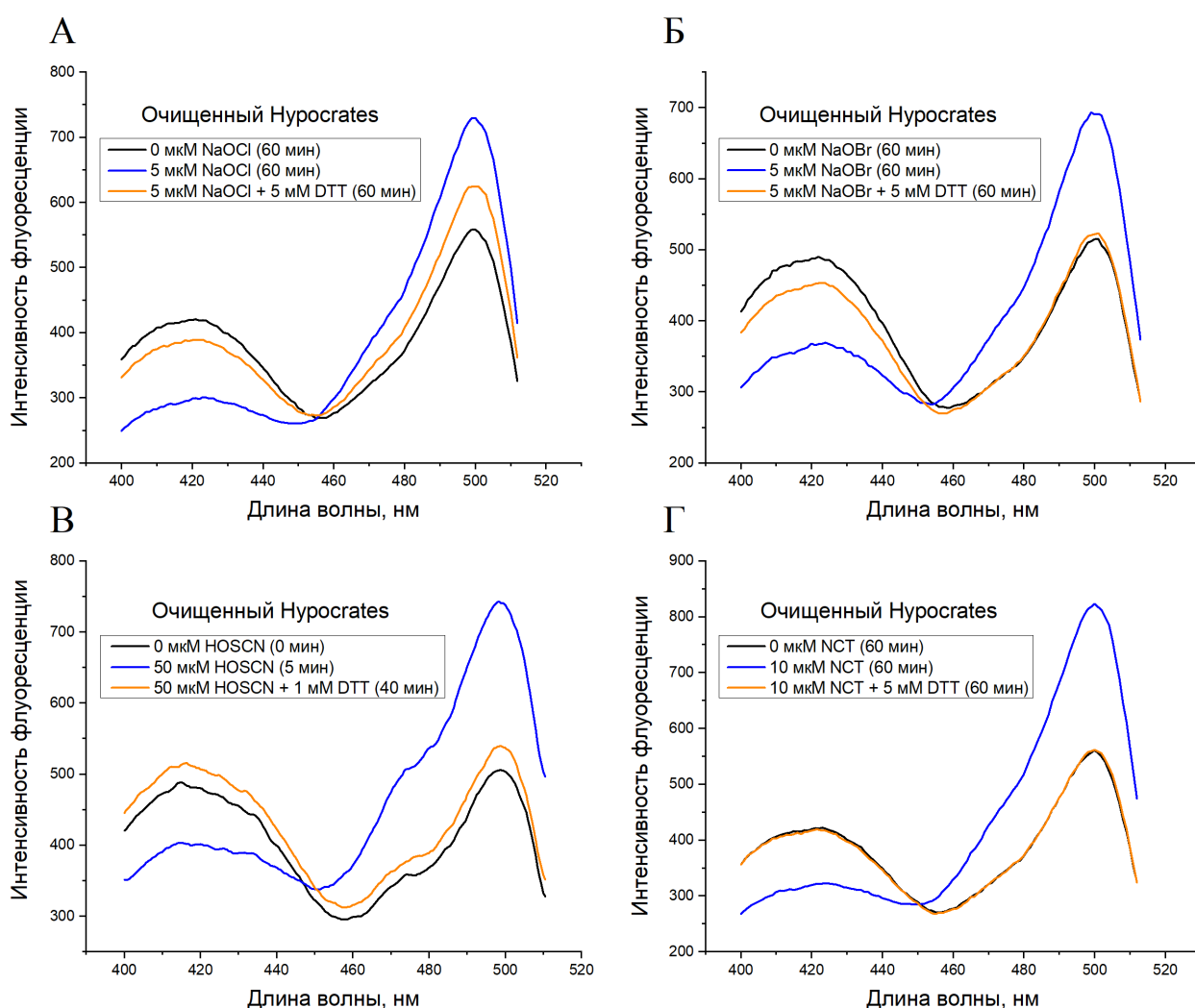
Оптические параметры Нурocrates также позволяют в общих чертах предположить механизм его функционирования. В целом, сенсоры, основанные на сrFP, могут демонстрировать два крайних случая [665]. В первом, изменение оптических свойств происходит за счет сдвигов в рK<sub>a</sub> хромофора, что влияет на представленность протонированной и депротонированной форм. Во втором, их соотношение остается постоянным, однако изменяются пути релаксации энергии. Нурocrates, как и большинство инструментов данного типа, по всей видимости, сочетает в себе оба сценария. Мы можем видеть, что при окислении квантовые выходы левого и правого пиков возбуждения падают и растут, соответственно. Однако, более выраженные изменения касаются молярных коэффициентов поглощения, которые двигаются в аналогичных направлениях. Впрочем, детальное установление биофизических основ работы инструмента является предметом отдельного исследования.



### 3.3. Взаимодействие *Nurocrates* с (псевдо)гипогалогенными кислотами и их производными.

На следующем этапе работы мы решили охарактеризовать взаимодействие *Nurocrates* с целевыми аналитами. Для этого мы обрабатывали очищенный препарат белка аликвотами NaOCl, NaOBr и HO SCN и регистрировали изменения, происходящие в спектре возбуждения флуоресценции (**Рис. 30**). Кроме того, мы проверили, способен ли сенсор чувствовать производные гипогалогенных кислот. В качестве тестового соединения, мы задействовали N-хлоротаурин (NCT), поскольку известно, что активированные нейтрофилы производят достаточно высокие концентрации данного хлорирующего агента [181,666,667]. Оказалось, что во всех случаях окисленный препарат демонстрировал характерный радиометрический сдвиг оптических свойств. Таким образом, *Nurocrates* может быть описан как сенсор, регистрирующий общую силу (псевдо)гипогалогенного стресса. Важно оговориться, что мы не считаем данное свойство недостатком инструмента и не интерпретируем его как «низкую селективность». Во-первых, как мы обсуждали в обзоре литературы, в физиологических условиях МПО и родственные ферменты генерируют смесь (псевдо)гипогалогенных кислот [27], которые, в зависимости от концентраций (псевдо)гипогалогенид-анионов, неферментативно конвертируются друг в друга [227]. Во-вторых, современная картина знаний предполагает, что HOCl едва ли является агентом, который оказывает свои биологические эффекты напрямую. Если мы сравним хлорноватистую кислоту с другим распространенным окислителем, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, окажется, что их временные и пространственные паттерны поведения совершенно различны. По имеющимся оценкам время жизни пероксида водорода в физиологических условиях (~ 10 с) [668] превышает аналогичный параметр для HOCl (~ 0.1 с) [669] в 100 раз. Таким образом, в то время как H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> способен диффундировать на достаточно большие расстояния, радиус действия HOCl скорее всего ограничен областью около 0.1 мкм (1/10 длины клетки *E. coli*). Живые системы содержат достаточно высокие концентрации нуклеофильных групп – они могут быть обнаружены в свободных аминокислотах, белках, липидах, нуклеиновых кислотах и кофакторах ферментов [670]. Поскольку HOCl реагирует с аминогруппами с достаточно высокими константами скоростей, скорее всего почти весь окислитель оказывается конвертирован в галамины в местах своей продукции, и уже они выступают основными агентами гипогалогенного стресса. Описанный взгляд может быть ярко проиллюстрирован классическими экспериментами по токсичности активных форм хлора в отношении эритроцитов [671]. Известно, что инкубация данных клеток с активированными нейтрофилами не вызывает

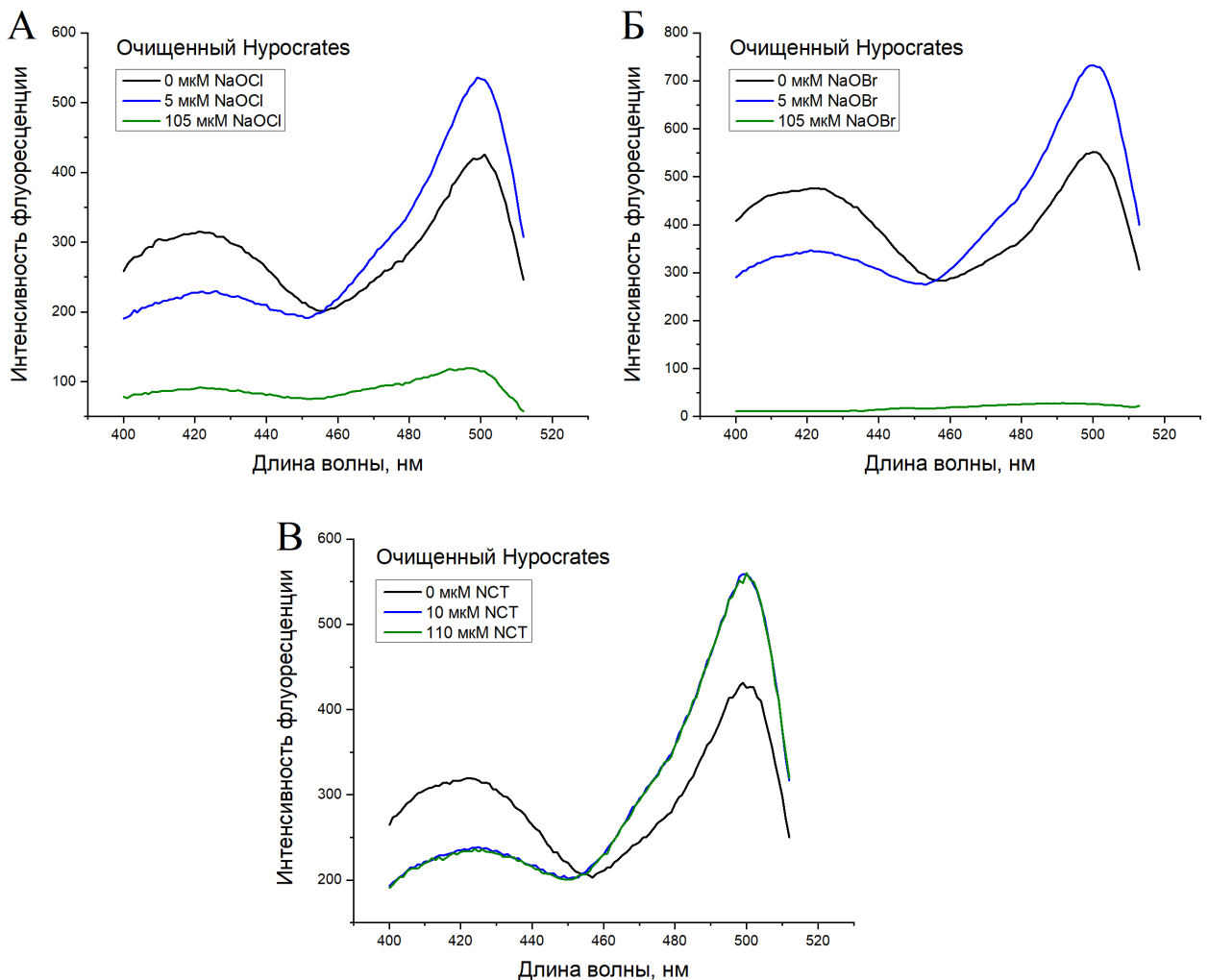
лизис мембран, однако, приводит к выраженному окислению гемоглобина. В то же самое время, воздействие  $\text{HOCl}$  влечет за собой прямо-противоположные последствия. Способность индуцировать окисление гемоглобина является известным свойством  $\text{NH}_2\text{Cl}$  и других гидрофобных галаминов. Таким образом, наиболее разумное объяснение эмпирических данных состоит в том, что активированные нейтрофилы воздействуют на эритроциты через подобные посредники [671]. Если бы они выделяли интактную  $\text{HOCl}$  в каких-либо заметных количествах, это бы привело к увеличению лизиса мембран, что не происходит на практике. Получается, что в том случае, если бы селективность сенсора была ограничена лишь хлорноватистой кислотой, но не ее производными, он бы смог визуализировать гипохлоритный стресс лишь в узком регионе активности МПО. Однако, с



**Рисунок 30.** Изменение спектра возбуждения очищенного препарата Nupocrates под действием  $\text{NaOCl}$  (А),  $\text{NaOBr}$  (Б),  $\text{HOscN}$  (В) и  $\text{NCT}$  (Г) с последующей обработкой DTT. Панели А и Г сняты в PBS. Панели Б и В сняты в 100 мМ натрий-фосфатном буфере. Концентрация белка на панелях А, Б и Г составляла 500 нМ. Концентрация белка на панели В составляла 2 мкМ.

точки зрения физиологических и медицинских исследований регистрация общего (псевдо)гипогалогенного стресса является более важной задачей в большинстве модельных систем.

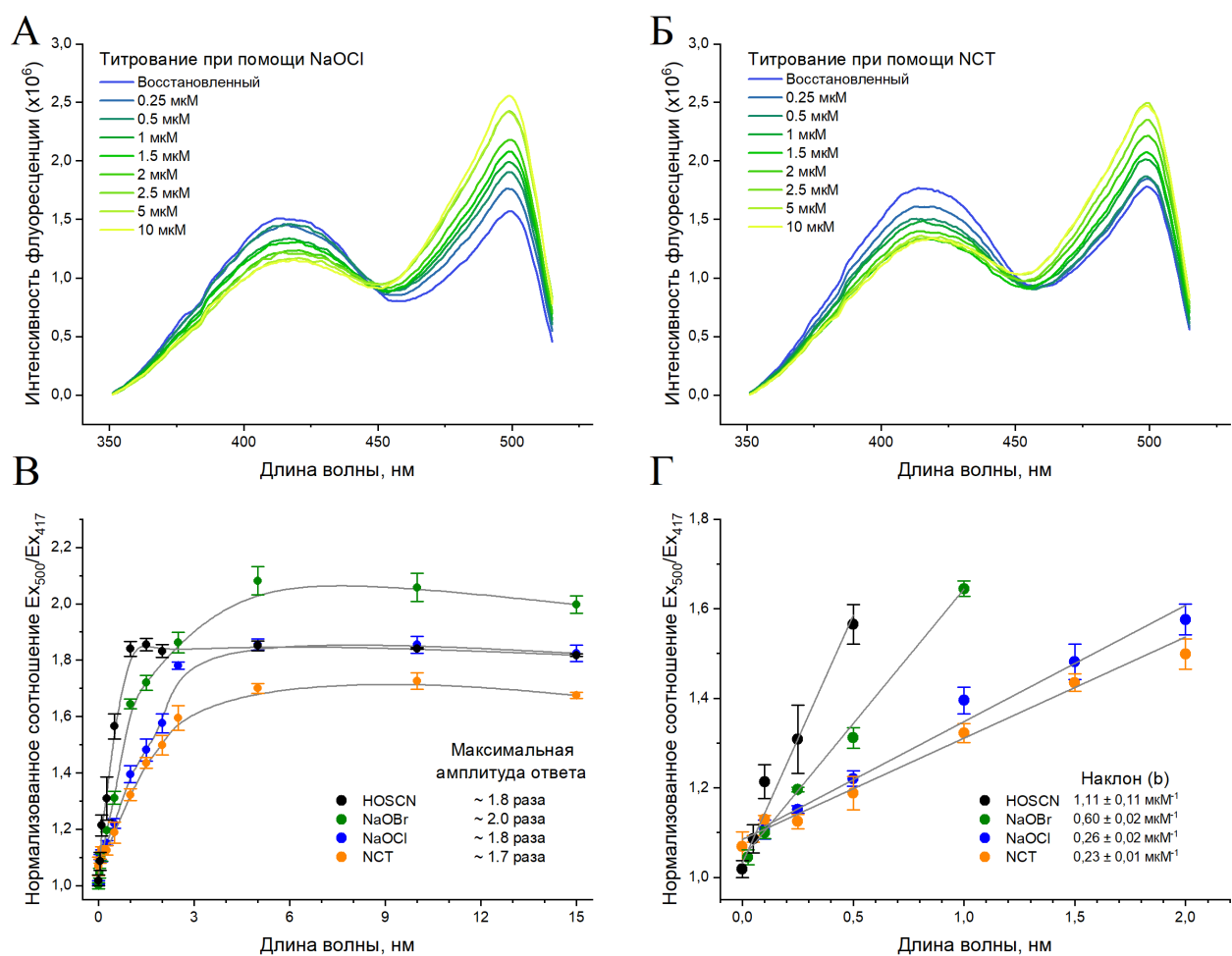
Мы также проверили, является ли ответ Hypocrates обратимым, для чего инкубировали окисленные препараты сенсора в присутствии DTT (**Рис. 30**). Оказалось, что во всех случаях спектр белка сдвигается в сторону исходного состояния. Это дало нам основания предположить, что инструмент будет вести себя обратимо и в условиях цитоплазмы живых клеток. Данное свойство очень важно на практике, поскольку оно позволяет регистрировать не только акты окисления, но и работу антиоксидантных систем по противодействию развивающемуся стрессу. Интересно, что полная обратимость ответа была зарегистрирована лишь для HOSCN и NCT (**Рис. 30В и Г**), что, по всей видимости,



**Рисунок 31.** Изменение спектра возбуждения очищенного препарата Hypocrates под действием высоких концентраций NaOCl (**А**), NaOBr (**Б**) и NCT (**В**). Панели **А** и **В** сняты в PBS. Панель **Б** снята в 100 мМ натрий-фосфатном буфере. Концентрация белка составляет 500 нМ.

связано с их меньшей реакционной способностью и большей селективностью в отношении остатков цистеина [30,49]. Можно предположить, что в условиях *in vitro* обработка Нуросратес аликвотами NaOCl и NaOBr приводит к возникновению сульфеновых и сульфиновых кислот, сульфонов метионина, а также прочных сшивок по типу тирозин-тирозиновых или оснований Шиффа. Перечисленные модификации могут изменять пространственную укладку сенсора и тем самым «запирать» его в окисленном состоянии. Для того, чтобы косвенно проверить это предположение, мы обработали препараты Нуросратес крайне высокими концентрациями NaOCl, NaOBr и NCT в молярном соотношении 1:200. В то время как в последнем случае спектр белка остался неизменным и соответствовал максимально окисленному состоянию, первые два агента привели к выраженному выгоранию эмиссии (**Рис. 31**). Полученный результат согласуется с данными литературы. Ранее было показано, что уже при молярном соотношении 1:40 NaOCl вызывает заметную фрагментацию и агрегацию фибронектина I [98]. В случае аполилопротеинов агрегация могла быть обнаружена при еще меньших пропорциях, равных 1:25 [100]. Наконец, в то время как NaOCl индуцировал фрагментацию коллагена при соотношениях 1:200 и выше, NCT не был способен оказывать схожий эффект во всем диапазоне тестируемых концентраций [99]. Следовательно, мы можем заключить, что взаимодействие Нуросратес с HOscN и NCT является более специфичным, нежели с NaOCl и NaOBr, и приводит к меньшему числу повреждающих модификаций.

Важным свойством любого генетически кодируемого сенсора является его динамический диапазон ответа, поскольку он задает область концентраций аналита, которые могут быть визуализированы при помощи инструмента. Для того, чтобы оценить обсуждаемый параметр у Нуросратес, мы проводили титрование очищенного препарата белка возрастающими концентрациями окислителей. На каждом шаге эксперимента мы могли наблюдать скоординированные изменения интенсивностей пиков возбуждения флуоресценции, соответствующих протонированной и депротонированной формам хромофора (**Рис. 32А и Б**). Изобестическая точка располагалась в области 450 нм. Согласно результатам титрования максимальная амплитуда ответа инструмента находится в диапазоне от 1.7 раза до 2.0 раз и зависит от используемого окислителя (**Рис. 32В**). Это позволяет заключить, что химический характер дополнительных модификаций сенсора оказывает определенное влияние на его пространственную структуру и, как результат, на спектр возбуждения флуоресценции.



**Рисунок 32.** Титрование очищенного препарата Hurocrates возрастающими концентрациями специфических окислителей. Изменение спектров возбуждения флуоресценции сенсора под действием NaOCl (А) и NCT (Б). Кривые титрования Hurocrates (В). Панель Г представляет собой приближенный участок панели В. Концентрация белка во всех случаях составляла 500 нМ. Данные представлены как среднее  $\pm$  SEM,  $n \geq 2$ .

Hurocrates достигает насыщения при молярном соотношении окислителя и белка  $\sim 9:1$  для NaOCl, NaOBr, NCT, и  $\sim 2:1$  для HOSCN (Рис. 32В). По всей видимости, полученный результат может быть объяснен в свете более высокой селективности HOSCN к остаткам цистеина по сравнению с другими агентами. Отдельно отметим, что специфичность HOSCN выше, чем у NCT, который более интенсивно взаимодействует с метионинами, может переносить атомы хлора на свободные аминогруппы и даже способен галогенировать остатки тирозина. Таким образом, мы предполагаем, что HOSCN в меньшей мере расходуется на побочные реакции, не вызывающие сдвиги в оптических свойствах, и преимущественно реагирует с ключевым Cys355. Несмотря на то, согласно данным литературы, зависимость диссоциации комплекса  $NemR^{C106}$ -ДНК от концентрации активных форм галогенов никогда не изучали, мы можем сравнить

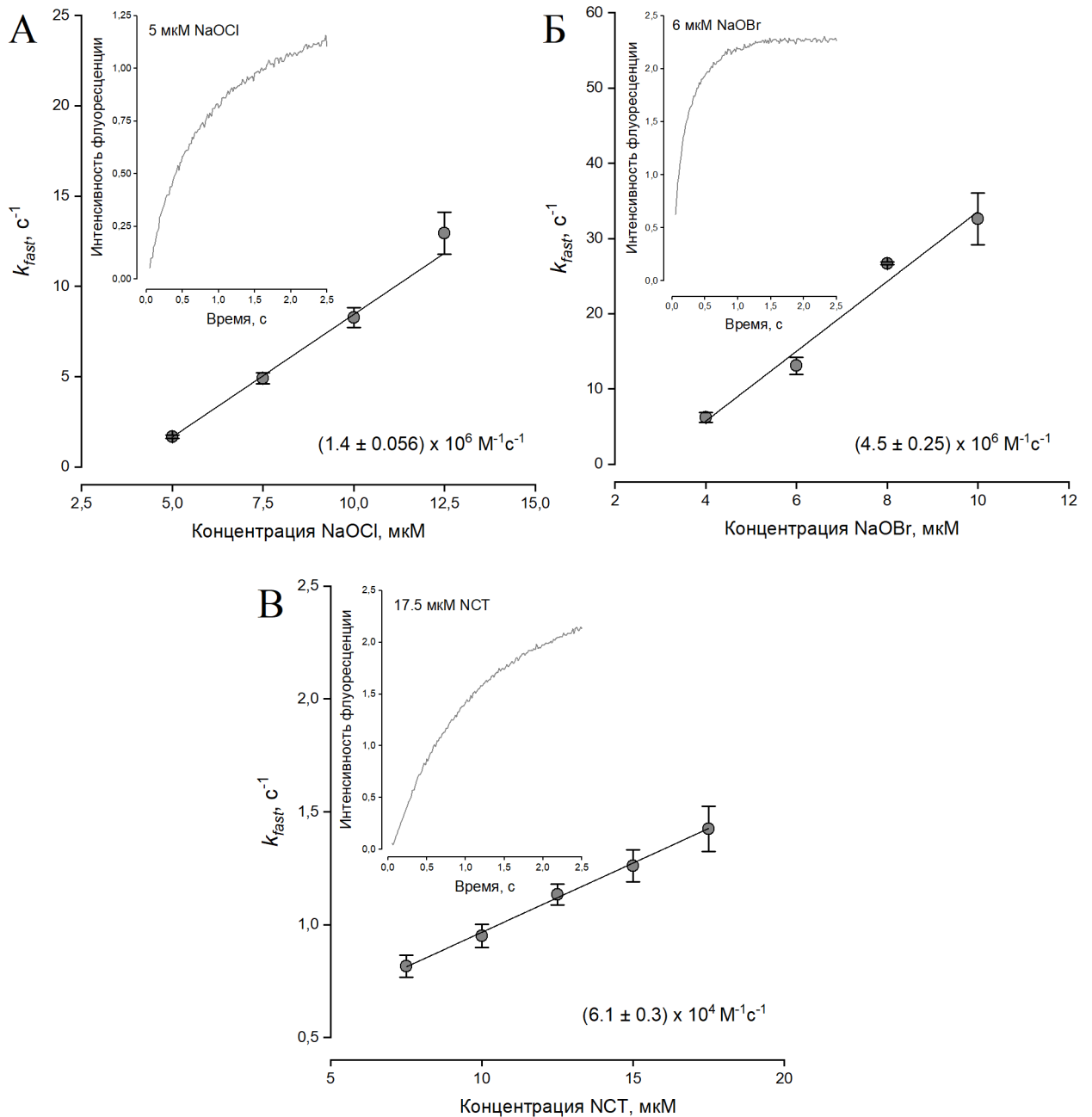
Нурocrates с другими белками, функционирование которых модулируется HOCl-опосредованным окислением. Так, активация НурТ *in vitro* требует как минимум 6 молей HOCl на 1 моль белка [654]. Для редокс-регулируемого шаперона Hsp33 аналогичное соотношение составляет 10:1 [672]. Представленные данные позволяют однозначно заключить, что Нурocrates демонстрирует чувствительность, схожую с таковой для других известных гипохлорит-регулируемых полипептидов.

Наконец, мы решили установить, какие минимальные концентрации аналитов могут быть достоверно обнаружены сенсором в используемой нами системе (пределы детекции). Для этого мы рассчитали величины  $3S_{y/x}/b$ , где  $S_{y/x}$  соответствует остаточному стандартному отклонению регрессионной модели, а  $b$  отражает угол наклона линейного участка кривой титрования. Полученные значения составили ~100 нМ для NaOBr, ~120 нМ для HO SCN, ~290 нМ для NCT и ~330 нМ для NaOCl (**Рис. 32Г**). Они соответствуют следующим соотношениям окислитель/белок: ~0.20 для NaOBr, ~0.24 для HO SCN, ~0.58 для NCT и ~0.66 для NaOCl. Поскольку концентрации (псевдо)гипогалогенных кислот в очагах воспаления могут достигать миллимолярных значений [673], мы можем утверждать, что динамический диапазон Нурocrates является достаточным для его использования *in vivo*.

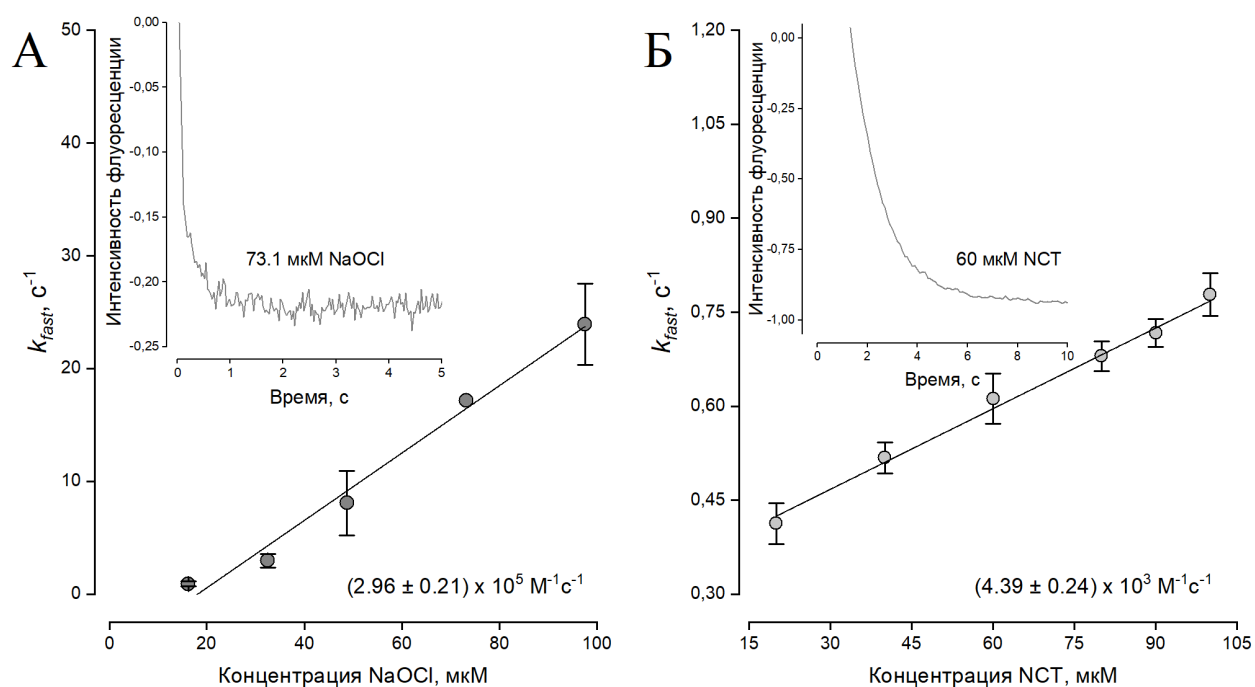
### 3.4. Кинетические параметры Нурocrates.

Тот факт, что (псевдо)гипогалогенные кислоты и их производные, представляют собой высоко реакционноспособные молекулы и характеризуются крайне малыми временами жизни в физиологических условиях, накладывает определенные кинетические ограничения на инструменты для их визуализации. Действительно, эффективному сенсору недостаточно иметь высокую чувствительность или, иначе говоря, продемонстрировать большое соотношение амплитуды ответа к количеству прореагировавшего аналита. Дело в том, что в живой клетке молекулы индикатора вынуждены конкурировать за окислитель с другими нуклеофилами, представленными в высоких концентрациях. Таким образом, инструмент будет надежно визуализировать (псевдо)гипогалогенный стресс лишь в том случае, если он будет взаимодействовать со своими мишенями с достаточно высокими константами скоростей. В то же самое время, это позволит ему регистрировать быстрые и временные события.

Для оценки обсуждаемого параметра мы произвели измерение кинетических свойств Нурocrates методом остановленной струи. Необходимые эксперименты были



**Рисунок 33.** Кинетические параметры Nurocrates, измеренные при помощи метода остановленной струи. Вставки отображают изменение флуоресценции *srYFP* ( $E_x$  485 нм,  $E_m > 515$  нм), индуцированное внесением окислителя. Полученные кривые анализировали при помощи двойной экспоненциальной модели, что позволило вычислить величины  $k_{\text{fast}}$ . Основные графики представляют собой зависимость  $k_{\text{fast}}$  от возрастающих концентраций NaOCl (**А**), NaOBr (**Б**) и NCT (**В**). Значения констант второго порядка вычисляли на основании угла наклона прямых [ $k_{\text{fast}} = k_{\text{on}} \cdot [\text{окислитель}] + k_{\text{off}}$ ]. Данные представлены как среднее  $\pm$  SD,  $n \geq 2$ .



**Рисунок 34.** Кинетические параметры  $\text{NemR}^{\text{C106}}$ , измеренные при помощи метода остановленной струи. Вставки отображают изменение флуоресценции остатков триптофана, индуцированное внесением окислителя. Полученные кривые анализировали при помощи двойной экспоненциальной модели, что позволило вычислить величины  $k_{fast}$ . Основные графики представляют собой зависимость  $k_{fast}$  от возрастающих концентраций NaOCl (**А**) и NCT (**Б**). Значения констант второго порядка вычисляли на основании угла наклона прямых [ $k_{fast} = k_{on} \cdot [\text{окислитель}] + k_{off}$ ]. Данные представлены как среднее  $\pm$  SD,  $n \geq 1$ .

поставлены совместно с нашими коллегами из лаборатории профессора Joris Messens (Брюссель, Бельгия). Зарегистрированные кривые описывали при помощи двойных экспоненциальных уравнений, после чего строили зависимость быстрых кинетических компонент ( $k_{fast}$ ) от концентрации окислителя. Наконец, мы определяли константы скоростей второго порядка путем вычисления угла наклона полученных прямых (**Рис. 33**). Экспериментальные данные свидетельствуют о том, что Hurocrates взаимодействует с NaOBr ( $\sim 4.5 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{c}^{-1}$ ) и NaOCl ( $\sim 1.4 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{c}^{-1}$ ) примерно в 100 раз быстрее, чем с NCT ( $\sim 6.1 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{c}^{-1}$ ). Поскольку кинетические свойства  $\text{NemR}$  или его мутантов не описаны в литературе, мы также решили проверить, сохранил ли сенсор параметры родительского белка. Для этого мы провели аналогичные эксперименты с  $\text{NemR}^{\text{C106}}$ , при этом в качестве метода считки сигнала использовали внутреннюю флуоресценцию остатка тирозина (**Рис. 34**). Анализ собранной информации показал, что  $\text{NemR}^{\text{C106}}$  также является более селективным в отношении NaOCl ( $\sim 3.0 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{c}^{-1}$ ) по сравнению с NCT ( $\sim 4.4 \times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{c}^{-1}$ ).



Полученные результаты интересны по целому ряду причин. Константы скоростей реакций между Hupocrates/NemR<sup>C106</sup> и NCT, который ведет себя как менее мощный окислитель, ожидаемо, оказываются меньшими, нежели аналогичные величины для NaOCl и NaOBr. Однако, мы можем наблюдать необычный феномен. Во-первых, гипогалогенные кислоты взаимодействуют, что с сенсором, что с исходным белком, примерно на два-три порядка медленнее, чем со свободным цистеином или его низкомолекулярными аналогами [674]. Во-вторых, измеренные значения для констант скоростей в отношении NCT оказываются необычно большими. Так, аналогичный параметр для свободного цистеина принимает значение величиной  $2.1 \times 10^2 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  [52]. При изучении литературы мы нашли лишь одну статью, которая бы экспериментально исследовала кинетику взаимодействия NCT и белков. В рамках данной работы авторы продемонстрировали, что реакции между обсуждаемым окислителем и ферментами глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназой и креатинкиназой, которые содержат функционально-значимые остатки цистеина в своих активных центрах, характеризуются константами величиной  $3.0 \times 10^2 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  и  $1.2 \times 10^2 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ , соответственно [130]. Таким образом, мы можем заключить, что белковое окружение в существенной мере модулирует кинетические свойства ключевого остатка цистеина в составе NemR<sup>C106</sup> и Hupocrates, делая его более селективным в отношении галаминов, нежели гипогалогенных кислот. В этом свете кажется привлекательной гипотеза о том, что подобные свойства позволяют NemR эффективно чувствовать невысокие концентрации галаминов и, тем самым, запускать адаптационную программу в кратчайшие сроки после наступления окислительного стресса. Учитывая ограниченную способность гипогалогенных кислот мигрировать через биологические жидкости, кажется разумным, что транскрипционный фактор, «сформированный» в ходе эволюции для детекции гипогалогенной нагрузки, должен в первую очередь взаимодействовать с их более стабильными производными. Впрочем, данный феномен требует дополнительного изучения, в том числе – установления конкретных механистических причин, лежащих в его основе.

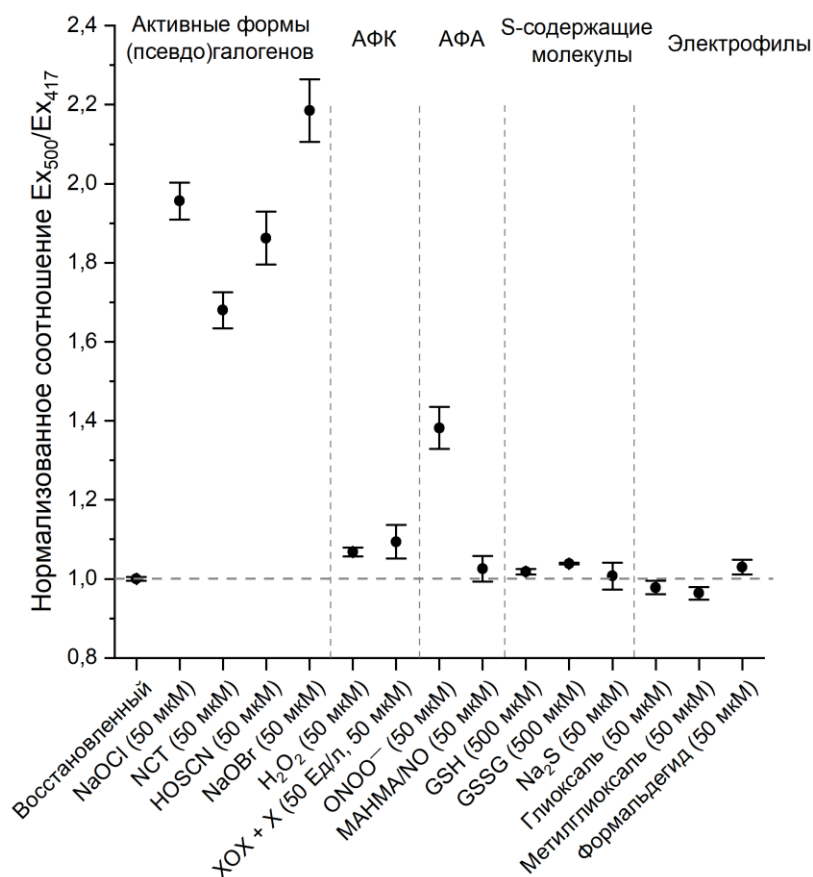
И, все-таки, какие соединения являются ожидаемыми аналитами Hupocrates в физиологическом контексте? По всей видимости, в условиях слабого гипогалогенного стресса сенсор будет проигрывать конкуренцию за HOCl клеточным тиолам, которые представлены, например, остатками цистеина в составе белков или глутатиона, и содержатся в живых системах в больших количествах. Однако, разработанный нами инструмент способен визуализировать возникающие галамины, причем даже в регионах,

удаленных от первичных участков активности МПО, поскольку он обладает высокой селективностью в отношении данных молекул. Впрочем, неизвестно, содержат ли живые организмы какие-либо другие белки с аналогичными необычными свойствами, которые могут служить еще более перспективными мишенями.

Обсуждаемые кинетические эксперименты позволяют сделать два других интересных наблюдения. Первое из них состоит в том, что по неизвестной нам причине, Нурocrates является более реакционноспособным, нежели родительский белок. Данный факт оказывается особенно неожиданным в свете того, что, как правило, искусственное внедрение чужеродных доменов в естественные полипептиды без последующей оптимизации ухудшает их свойства. Второе наблюдение касается того, что полученные кинетические прямые характеризуются достаточно большими отрицательными значениями  $k_{off}$ . Иначе говоря, они пересекают оси ординат в областях отрицательных чисел (**Рис. 32**). Подобная зависимость свидетельствует о том, что в условиях малых концентраций окислителей, скорость измеряемой реакции оказывается сниженной. По всей видимости, это связано с тем, что, будучи агрессивными агентами, гипогалогенные кислоты и их производные способны взаимодействовать с другими участками Нурocrates (например, с остатками метионина), модификация которых не приводит к развитию оптического ответа. Таким образом, должна быть преодолена некоторая пороговая концентрация аналита, после которой реакция с участием Cys355 становится выраженной в достаточной мере.

### 3.5. Селективность Нурocrates.

Однозначная интерпретация сигнала, поступающего от генетически кодируемого сенсора, возможна только в том случае, если он взаимодействует со строго ограниченным набором физиологически значимых аналитов. Поскольку функционирование Нурocrates связано с модификацией редокс-чувствительного остатка цистеина, можно ожидать, что какие-либо представители активных форм кислорода или азота также способны реагировать с ключевым атомом серы. С целью прояснения данного вопроса, мы подвергли очищенные препараты Нурocrates воздействию широкой панели биологических окислителей различной природы (**Рис. 35**). Пероксид водорода ( $H_2O_2$ ), супероксид-анион ( $O_2^{\bullet-}$ ), оксид азота ( $NO^{\bullet}$ ) и окисленный глутатион (GSSG) вызвали лишь незначительные сдвиги в спектре возбуждения флуоресценции пробы. Поскольку родительский белок (NemR) является природным сенсором на активные электрофилы, мы решили проверить



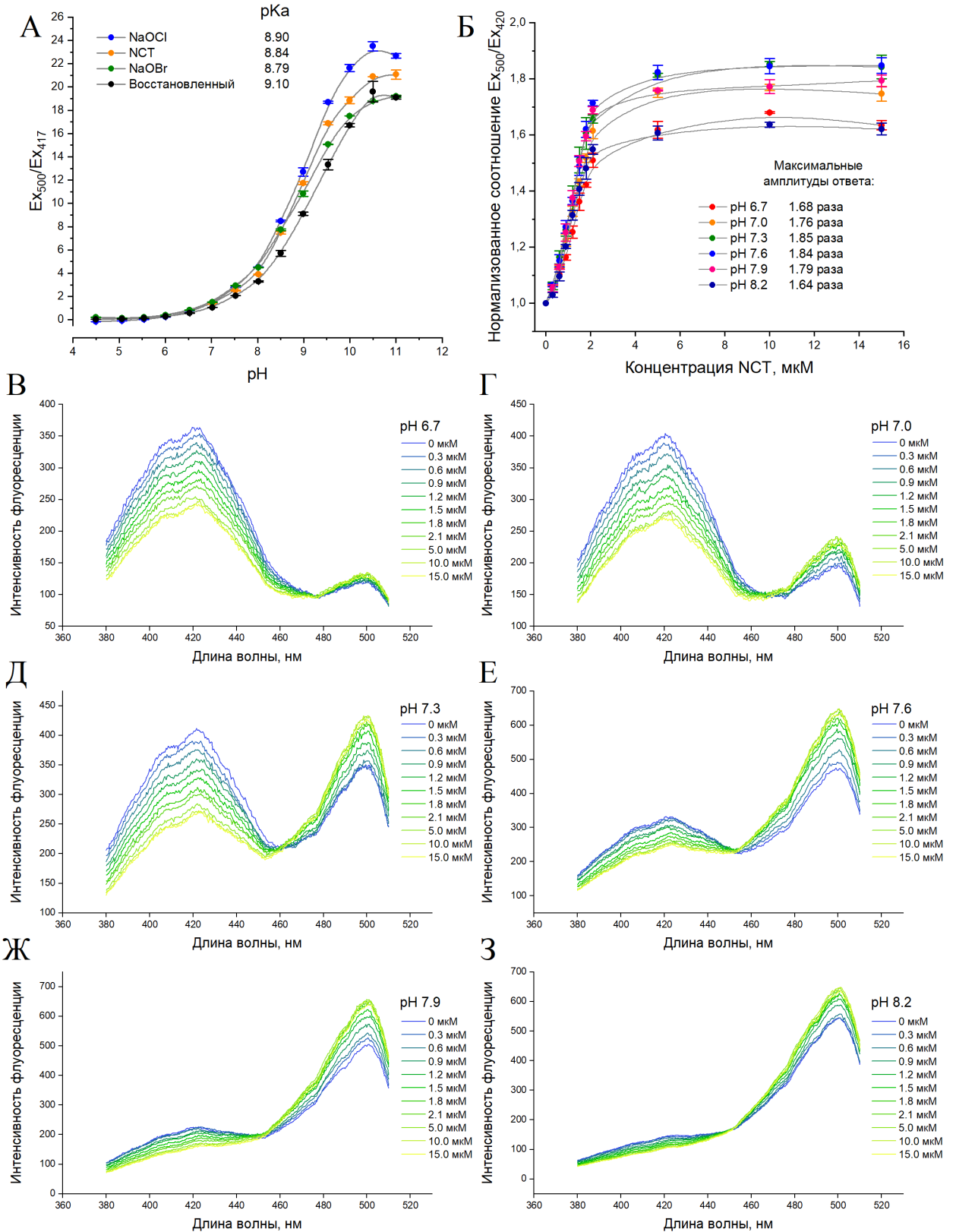
**Рисунок 35.** Диаграмма селективности Nurocrates. Концентрация белка составляла 2 мкМ. NCT – N-хлоротаурин. ХОХ – ксантиноксидаза. Х – ксантин. GSH – восстановленный глутатион. GSSG – окисленный глутатион. АФК – активные формы кислорода. АФА – активные формы азота. Данные представлены как среднее  $\pm$  SEM,  $n \geq 3$ .

влияние соединений данной группы на Nurocrates. Ни глиоксаль, ни метилглиоксаль, ни формальдегид не оказали никакого эффекта на его оптические свойства (**Рис. 35**). Полученные результаты не являются неожиданными, поскольку Gray и соавторы ранее установили, что в условиях *in vivo* H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, O<sub>2</sub><sup>•-</sup> и NO<sup>•</sup> не вызывают экспрессию *nemR*-оперона [624], а NemR<sup>C106</sup>, который был использован в качестве сенсорного домена, не содержит редокс-активных остатков Cys21 и Cys116, участвующих в детекции карбонильных соединений [660].

Однако, Nurocrates оказался чувствительным к пероксинитриту (NaONOO). Поскольку селективность NemR в отношении данного агента никогда не изучали, сложно сказать, является ли данный результат следствием того, что интеграция сrYFP привела к «поломке» белка, или же это его естественное свойство. В любом случае, мы можем сделать вывод, что, если в конкретной экспериментальной модели ожидается выраженная продукция активных форм азота, применение Nurocrates возможно лишь в сочетании с

грамотно-поставленными контролями. На наш взгляд, наиболее оптимальная стратегия подразумевает съемку параллельных серий с предварительной обработкой исследуемых образцов ингибиторами NO-синтаз. В целом, сложно сказать, насколько кросс-селективность в отношении пероксинитрита будет вносить артефакты при использовании Нурocrates на практике. По некоторым оценкам концентрация NO• в физиологических условиях *in vivo* колеблется от 100 пМ до 5 нМ [675]. В то же самое время, в ряду случаев была продемонстрирована продукция миллимолярных количеств данного агента в тканях, охваченных патологическими процессами [676]. При этом, какая доля NO• расходуется на синтез пероксинитрита остается неизвестным. Более того, следует иметь в виду, что сайты активного воспаления характеризуются сложной биохимией, в рамках которой множество факторов взаимно влияют друг на друга. В частности, известно, что активность МПО способна подавлять NO-синтазы путем продукции хлорированного L-аргинина, который выступает известным ингибитором данных ферментов [677].

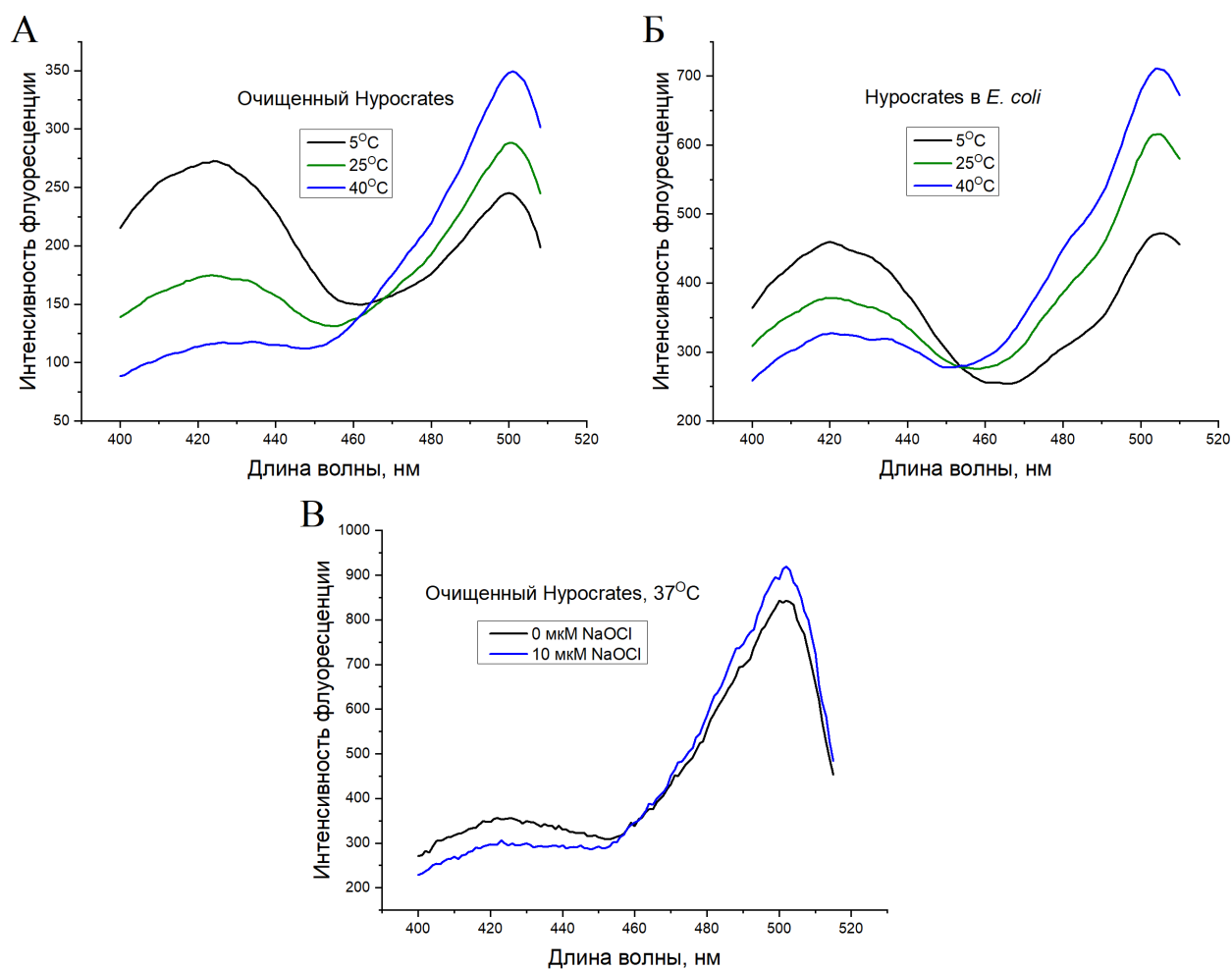
Как мы уже обсуждали в обзоре литературы, все флуоресцентные белки в той или иной мере демонстрируют рН-чувствительность, связанную со смещением равновесия в реакции депротонирования хромофора в зависимости от кислотности окружающей среды. Таким образом, в тех случаях, когда концентрация протонов существенно изменяется в ходе эксперимента, генетически кодируемые сенсоры могут быть подвержены выраженным артефактам измерения. Для того, чтобы оценить чувствительность Нурocrates в отношении обсуждаемого параметра мы помещали очищенные препараты белка в буферы с фиксированными значениями рН, после чего строили зависимость сигнала индикатора от кислотности (**Рис. 36А**). Анализ графика свидетельствуют о том, что восстановленный сенсор характеризуется  $pK_a$  величиной 9.1, при этом его окисление селективными агентами приводит к падению данного значения. Соответственно, мы можем заключить, что Нурocrates является рН-чувствительным в физиологическом диапазоне – защелачивание среды вызывает ответ, который может быть принят за окисление. Например, сдвиг рН с 6.5 до 8.5 приводит к росту сигнала с амплитудой около 8.3 раза. Таким образом, эксперименты с участием Нурocrates должны сопровождаться тщательными рН-контролями. Полученные результаты не оказались неожиданными, поскольку все генетически кодируемые сенсоры на основе *срYFP* демонстрируют выраженную зависимость оптических параметров от концентрации протонов в клетке. В качестве единственного исключения из данного правила можно упомянуть недавно



**Рисунок 36.** Поведение Nurocrates в буферах с различными значениями pH. (А) Зависимость сигнала сенсора от pH буфера. (Б) Кривые титрования сенсора при помощи NCT в 100 мМ натрий-фосфатных буферах с различными показателями pH. Концентрация белка составляла 500 нМ. (В-З) Те же самые данные в виде изменения спектров возбуждения флуоресценции. Значения представлены как средние  $\pm$  SEM,  $n \geq 3$ .

опубликованный HuPep-7, который содержит ряд замен во флуоресцентном домене и сопрягающих линкерах (Asp135Asn, Gly298Ser и Thr379Pro), делающих его относительно устойчивым к колебаниям pH окружающей среды [594]. Мы также решили более внимательно изучить влияние кислотности буфера на специфический ответ Нуросcrates, для чего проводили титрование очищенного белка при помощи NCT в растворах со значениями pH от 6.7 до 8.2 (**Рис. 36Б-3**). Несмотря на то, что максимальная амплитуда ответа несколько падает в областях кислых и щелочных значений, можно с уверенностью утверждать, что разработанный нами инструмент подходит для использования в протестированных условиях, поскольку демонстрирует характерные радиометрические сдвиги в спектре возбуждения флуоресценции во всех случаях. Таким образом, Нуросcrates может быть использован во многих органеллах, различающихся стационарными концентрациями протонов, что позволит будущим исследователям визуализировать субклеточную динамику (псевдо)гипогалогенного стресса и, тем самым, изучать, оказывают ли обсуждаемые окислители свои эффекты напрямую или же опосредованно.

Еще в ранних работах по описанию химических и физических свойств GFP было показано, что его оптические свойства зависят от температуры окружающей среды. В частности, важная задача заключалась в попытках получить варианты белка для гетерологичной экспрессии, которые бы демонстрировали повышенную яркость при 37°C. Случайный мутагенез позволил обнаружить целую серию замен, которые приводили к желаемому эффекту (Phe64Leu, Val163Ala, Ser72Ala, Asn149Lys, Met153Thr и Ile167Thr) [331,337]. Впрочем, дальнейшие эксперименты показали, что во всех случаях оптимизация свойств достигается не за счет улучшения яркости как таковой, а за счет улучшения параметров созревания. Действительно, большинство перечисленных мутаций представляют собой замены объемных неполярных остатков на более компактные варианты, а анализ пространственной структуры белка показывает, что обсуждаемые позиции разбросаны по поверхности глобулы [278]. Интересно, что гомологи GFP, обнаруженные в кораллах, демонстрируют куда более эффективное созревание при 37°C, что, по всей видимости, связано с температурой воды, оптимальной для жизнедеятельности соответствующих организмов [678]. Впрочем, оптические свойства даже полностью созревших молекул GFP заметно зависят от нагревания образцов. Так, сдвиг в температуре с 15°C до 65°C приводит к умеренному падению левого пика возбуждения флуоресценции, а также к росту правого пика, что является результатом



**Рисунок 37.** Зависимость сигнала Hupocrates от температуры. (А) Изменение спектра возбуждения флуоресценции очищенного препарата в PBS. (Б) Изменение спектра возбуждения флуоресценции сенсора в цитоплазме бактериальных клеток. (В) В условиях повышенной температуры максимальная амплитуда ответа Hupocrates снижается.

изменения внутримолекулярной динамики полипептида [311]. Для оценки влияния обсуждаемого параметра на Hupocrates, мы зафиксировали его оптические параметры до и после нагрева. Действительно, увеличение температуры приводит к сдвигам, которые напоминают окисление (Рис. 37А). Данный эффект сохраняется в условиях бактериальной цитоплазмы, свидетельствуя о том, что белковое окружение не оказывает никакого стабилизирующего воздействия (Рис. 37Б). Наконец, чтобы проверить, приводят ли наблюдаемые изменения к снижению максимальной амплитуды ответа сенсора, мы сравнили полностью восстановленные и окисленные спектры возбуждения флуоресценции при разных температурах. Полученные результаты показывают, что при 37°C максимальная амплитуда ответа снижается до 1.3 раза (Рис. 37В). Таким образом, в текущем виде Hupocrates не до конца оптимизирован для использования в теплокровных

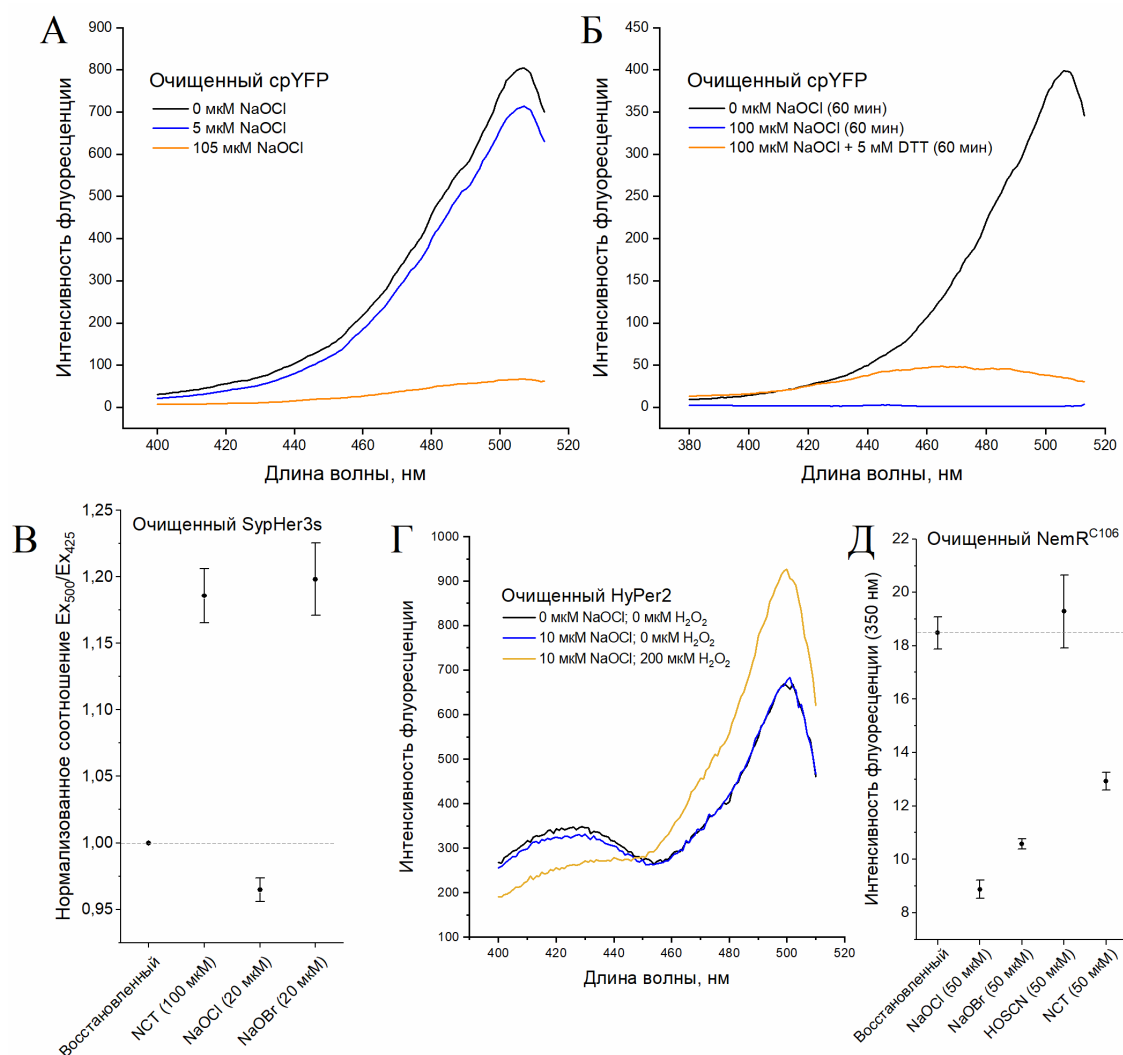
организмах. Впрочем, обсуждаемый параметр может быть улучшен в будущем путем направленного или случайного мутагенеза.

### 3.6. Механизм функционирования *Nurocrates*.

Важным этапом описания нового генетически кодируемого сенсора является установление конкретного молекулярного механизма, который лежит в основе его функционирования. Данная информация может быть использована для различных целей: во-первых, она позволяет создавать инактивированные версии, которые могут быть использованы в качестве контролей; во-вторых, она открывает возможность для направленной оптимизации инструмента для будущих исследований. В первую очередь, мы решили убедиться, что наблюдаемые нами оптические сдвиги *Nurocrates* опосредованы взаимодействием активных форм галогенов с доменом, происходящим из *NemR*<sup>C106</sup>. Для этого мы обработали интактный *srYFP* гипохлоритом натрия в молярном соотношении 1:10, которое является достаточным для индукции максимального ответа сенсора. Подобное воздействие привело лишь к незначительному выгоранию флуоресценции (**Рис. 38А**). Полученный результат, вероятно, связан с тем, что хромофор кругового пермутанта находится в контакте с окружающей средой и может быть подвержен прямому окислению агрессивными агентами. Значительное увеличение тестируемой концентрации  $\text{NaOCl}$  (1:200) вызвало выраженное тушение эмиссии, при этом обработка ДТТ почти не восстанавливала спектр (**Рис. 38А и Б**). Полученные результаты позволяют заключить, что высокие количества гипогалогенных кислот приводят к необратимому выгоранию флуоресцентного домена. Таким образом, ранее зарегистрированное исчезновение эмиссии *Nurocrates* под действием  $\text{NaOCl}$  и  $\text{NaOBr}$ , по всей видимости, связано, в первую очередь, с повреждением именно *srYFP*, но не *NemR*<sup>C106</sup>.

Мы также проверили, какой эффект гипогалогенные кислоты и их производные оказывают на другие популярные сенсоры, основанные на том же самом флуоресцентном домене.  $\text{NaOCl}$ ,  $\text{NaOBr}$  и  $\text{NCT}$ , использованные в очень высоких молярных соотношениях (1:40, 1:40 и 1:200) привели лишь к незначительным сдвигам в сигнале рН-индикатора *SyrHer3s* [679], которые оказались существенно меньшими, нежели его целевой ответ. Интересно, что, в то время как  $\text{NaOBr}$  и  $\text{NCT}$  вызывали рост и падение правого и левого пиков возбуждения флуоресценции,  $\text{NaOCl}$  действовала в обратном направлении (**Рис. 38В**). Хотя, основываясь на химических свойствах использованных агентов, было бы





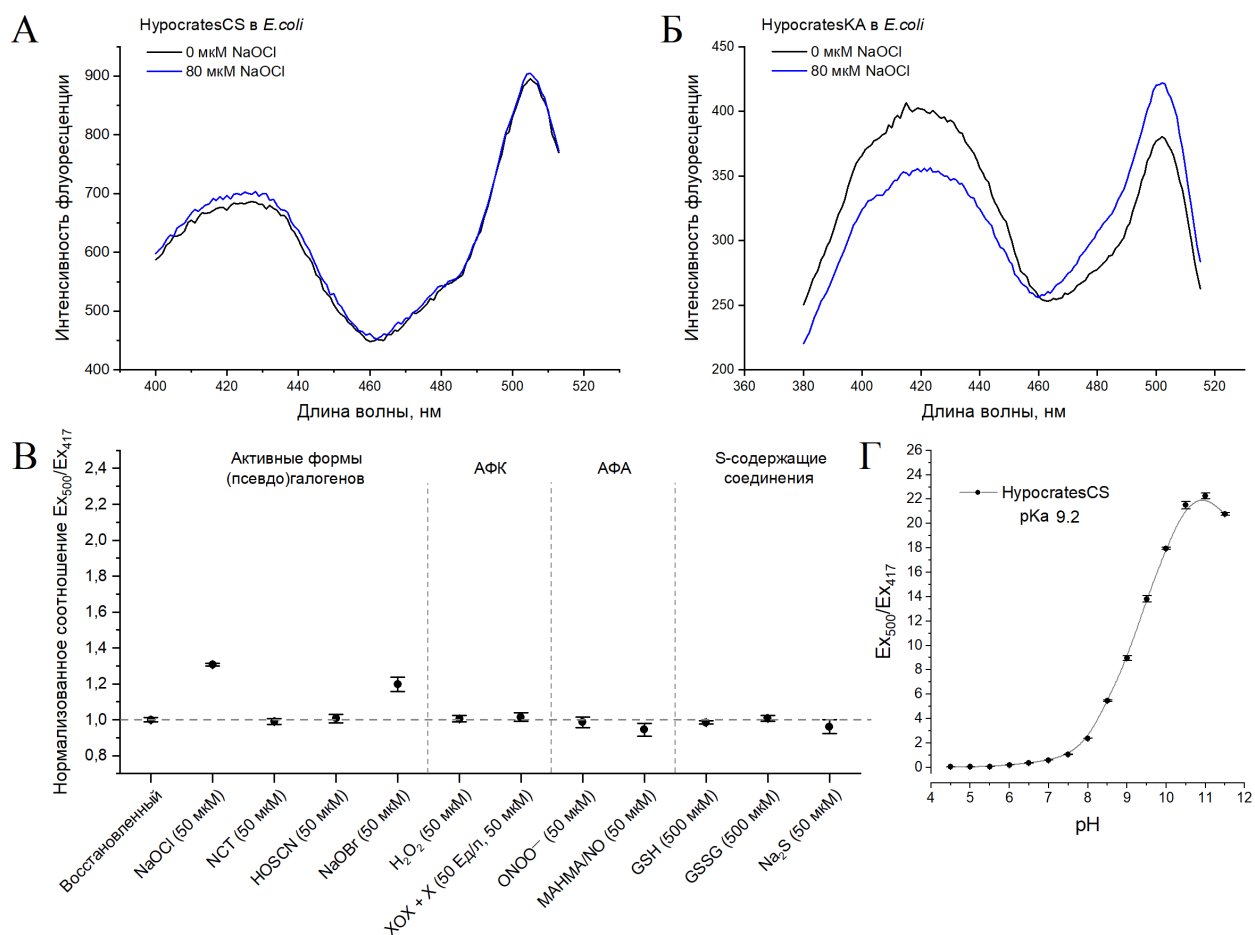
**Рисунок 38.** Влияние активных форм (псевдо)галогенов на различные белки, содержащие srYFP. (А) Высокие количества NaOCl приводят к выраженному выгоранию интактного srYFP. (Б) Данные изменения оптических свойств не могут быть устранены обработкой восстанавливающими агентами. Другие сенсоры на основе srYFP (pH-индикатор SypHer3s, В; индикатор пероксида водорода HyPer2, Г) не отвечают или слабо отвечают на активные формы галогенов. Концентрация белка во всех случаях составляла 500 нМ. На панели В данные представлены как среднее  $\pm$  SEM,  $n = 3$ . (Д) Изменение флуоресценции остатков триптофана NemR<sup>C106</sup> под действием NaOCl, NaOBr, HOscN и NCT. Концентрация белка составляла 2 мкМ. Данные представлены как среднее  $\pm$  SEM,  $n \geq 2$ .

разумно предположить, что характер NaOCl- и NaOBr-опосредованных эффектов окажется схожим. NaOCl, использованная в молярном соотношении 1:20 также не оказала никакого влияния на  $H_2O_2$ -индикатор HyPer2 [592], в то время как его целевой анализ привел к характерному радиометрическому ответу (Рис. 38Г). Как мы уже обсуждали выше, литературные данные свидетельствуют о том, что *OxyR*-регулон активируется под действием HOCl, однако, конкретные механистические причины, лежащие в основе этого

наблюдения, остаются неизвестными [635,636]. Полученные нами результаты предполагают, что OxyR, как минимум в составе NuPer2, не способен взаимодействовать с HOCl напрямую. Впрочем, остается вероятность, что тестируемый препарат сенсора был недостаточно очищен от меркаптоэтанола, который содержится в буферах для выделения соответствующего белка. Учитывая высокую реакционную способность HOCl в отношении данного тиол-содержащего агента, не исключено, что в нашей системе даже следовые количества восстановителя вытитровывали аналит.

Чтобы получить более прямое подтверждение того, что наблюдаемые нами оптические сдвиги связаны с реакционной способностью сенсорного домена, мы обрабатывали интактный NemR<sup>C106</sup> целевыми окислителями (1:25). В ходе экспериментов, функциональное состояние белка визуализировали путем регистрации характерной флуоресценции остатка тирозина (**Рис. 38Д**). В то время как NaOCl, NaOBr и NCT вызвали значительное изменение сигнала, HOSCN не оказала никакого эффекта на тестируемый препарат. Таким образом, мы можем заключить, что способность чувствовать данный аналит является свойством, которое NemR<sup>C106</sup> приобрел в результате вставки srYFP. Полученный результат имеет в том числе и фундаментальную значимость, поскольку селективность NemR в отношении различных активных форм (псевдо)галогенов никогда не изучали до этого.

Экспериментальные данные, собранные в ходе рентгеноструктурного анализа и масс-спектрометрии, косвенно предполагают, что способность NemR взаимодействовать с HOCl связана с образованием обратимой сульфенамидной связи между остатками Cys106 и Lys175 [663]. Для того, чтобы проверить участие соответствующих аминокислот в функционировании Nurocrates, мы получили мутантные версии сенсора, в которых обсуждаемые позиции заменены на реакционно-инертные группы. Белки экспрессировали в живых бактериях, которые затем обрабатывали NaOCl в насыщающих концентрациях. Согласно нашим ожиданиям, NurocratesCS (мутант Cys355Ser) не продемонстрировал никаких ощутимых сдвигов в спектре возбуждения флуоресценции (**Рис. 39А**). Однако, поведение NurocratesKA (мутант Lys424Ala) не отличалось от исходного индикатора (**Рис. 39Б**). Таким образом, полученные нами данные позволяют заключить, что даже если в молекуле Nurocrates и образуется сульфенамидная связь под действием специфических аналитов, она не является необходимой для развития ответа. Иначе говоря, окисление Cys355 оказывается достаточным для изменения микроокружения хромофора, которое может быть визуализировано при помощи оптического оборудования. Поскольку



**Рисунок 39.** Некоторые биохимические свойства контрольных версий Hypocrates. (А) Спектр возбуждения флуоресценции HypocratesCS устойчив к воздействию NaOCl в цитоплазме бактериальных клеток. (Б) Версия HypocratesKA отвечает на добавку NaOCl в условиях цитоплазмы бактериальных клеток. (В) Диаграмма селективности очищенного препарата HypocratesCS. Концентрация белка составляла 2 мкМ. NCT – N-хлоротаурин. ХОХ – ксантиноксидаза. X – ксантин. GSH – восстановленный глутатион. GSSG – окисленный глутатион. АФК – активные формы кислорода. АФА – активные формы азота. Данные представлены как среднее  $\pm$  SEM,  $n \geq 3$ . (Г) Зависимость сигнала очищенного препарата HypocratesCS от pH буфера. Данные представлены как среднее  $\pm$  SEM,  $n = 3$ .

хлорированные тиолы обладают крайне малыми временами жизни в водных условиях и активно подвергаются гидролизу, мы предполагаем, что конечным продуктом взаимодействия между Hypocrates и HOCl является сульфеновая кислота в 355-ом положении. Однако, представленная гипотеза требует экспериментальной проверки в будущих исследованиях.

К нашему удивлению, несмотря на то что очищенный препарат HypocratesCS не взаимодействовал с NCT и HOSCN, NaOCl и NaOBr вызывали характерный радиометрический ответ белка (Рис. 39В). Таким образом, будучи агрессивными

окислителями данные агенты способны реагировать с какими-либо аминокислотными остатками сенсора, отличными от Cys355, модификации которых сказываются на оптических свойствах молекулы. В этом смысле Hurocrates ведет себя так же, как и многие другие изученные гипохлорит-чувствительные полипептиды, для которых показаны различные механизмы регуляции в *in vitro* и в *in vivo* условиях. Например, как мы уже обсуждали ранее, под действием HOCl транскрипционный фактор HupR из *S. aureus* образует межсубъединичные дисульфидные связи с участием Cys33 и Cys99 [650]. Соответственно, мутантная форма белка, содержащая замену Cys33Ala, оказывается не способной диссоциировать от оператора в живых бактериях, испытывающих гипохлоритный стресс. Однако, в очищенном состоянии описанный эффект не воспроизводится. И хотя конкретный молекулярный механизм, обуславливающий такое поведение, остается не до конца понятным, предварительные эксперименты предполагают, что *in vitro* HOCl вызывает образование межсубъединичной связи Cys142-Cys142. Вероятно, данная модификация является достаточной для того, чтобы HupR потерял сродство к ДНК, а ее устойчивость в живой клетке по неизвестной причине крайне низка [650]. Еще один пример схожего поведения представлен белком RclR [649]. *In vivo* его способность чувствовать гипохлоритный стресс полагается на два ключевых остатка, Cys21 и Cys89, между которыми образуется внутрисубъединичная ковалентная связь. Однако, лишь Cys21 оказывается строго необходимым для демонстрации подобного поведения на препарате белка *in vitro*. По всей видимости, окисление данной позиции приводит к основным конформационным изменениям, а формирование дисульфидной связи служит для увеличения времени жизни полученного состояния путем его защиты от антиоксидантных систем клетки [649].

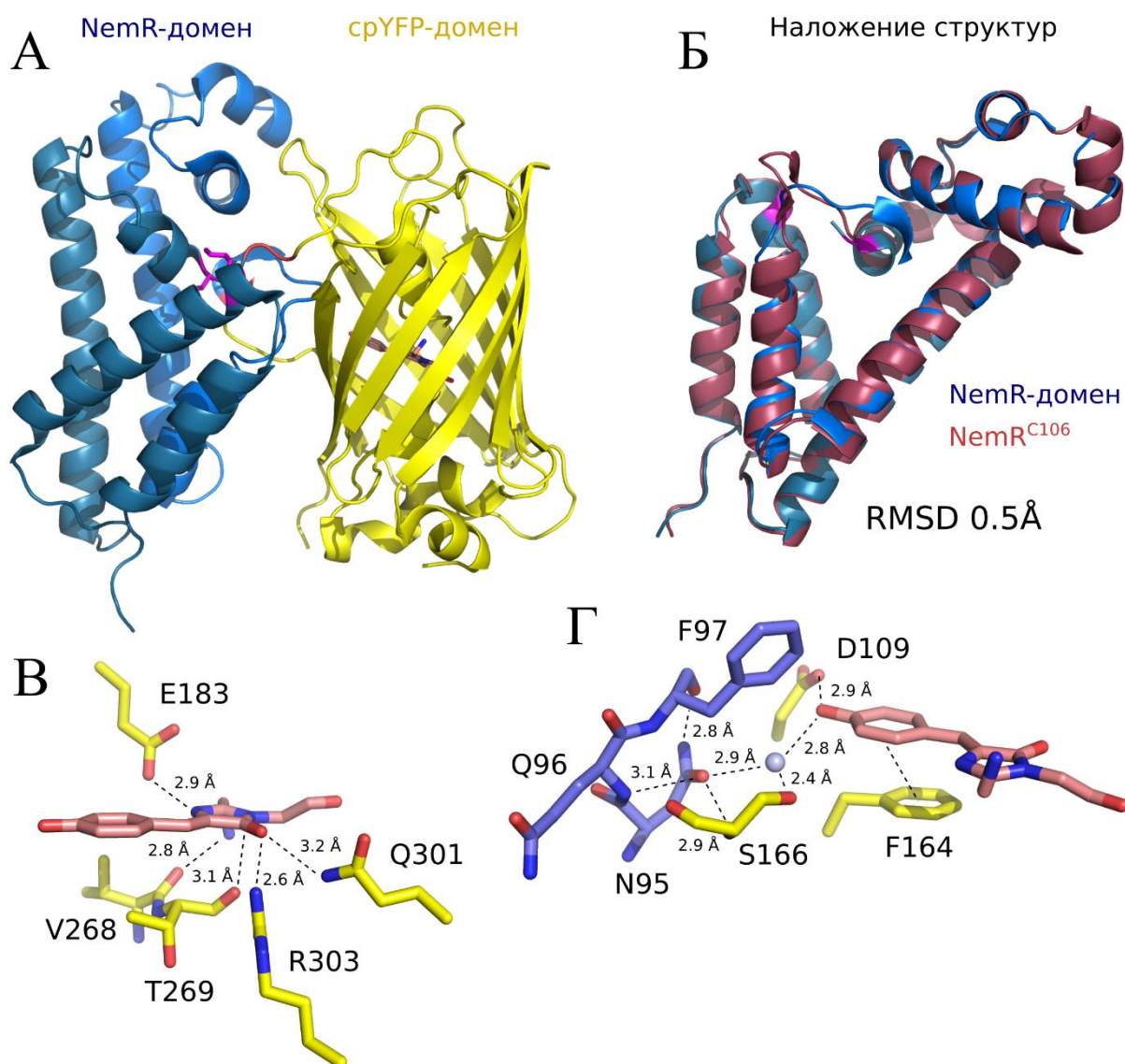
Тот факт, что HurocratesCS отвечает на NaOCl лишь *in vitro*, но не *in vivo* в бактериях, согласуется с данными кинетики и подтверждает гипотезу о том, что именно галамины служат преимущественными мишенями сенсора в физиологических условиях. Иначе говоря, почти вся хлорноватистая кислота, поступающая в клетки, конвертируется во вторичные производные, которые способны взаимодействовать с исходным белком, но не с его инактивированной версией. Однако, встает закономерный вопрос – может ли HurocratesCS быть использован в качестве контрольной версии для исключения артефактов измерения в живых системах? По всей видимости, да, поскольку концентрации NaOCl, вызывающие насыщение Hurocrates в бактериях, не приводят даже к слабому сдвигу оптических свойств CS-мутанта. Тем более, его  $pK_a$ , установленная путем рН-титрования, принимает значение 9.2, которое крайне близко к аналогичному

параметру исходного сенсора (**Рис. 39Г**). Впрочем, стоит держать в уме, что в некоторых условиях, например, в полости фагосомы, продукция хлорноватистой кислоты может быть очень интенсивной – таким образом, нормировка сигнала Нурocrates относительно НурocratesCS будет приводит к недооценке степени гипогалогенного стресса. Отметим, что замена ключевого остатка Cys355 также полностью элиминирует чувствительность к NaONOO (**Рис. 39В**). Следовательно, данный окислитель специфично взаимодействует с обсуждаемой позицией, и дальнейшая оптимизация селективности Нурocrates не может быть осуществлена путем простого удаления реакционных мишеней в его составе. Вероятно, устранение ответа на пероксинитрит потребует существенной модификации сайта, ответственного за распознавание аналитов.

### 3.7. Расшифровка пространственной структуры НурocratesCS.

Функционирование любого генетически кодируемого индикатора основано на химическом сопряжении сенсорного и репортерного доменов. В том случае, если исследователям известен конкретный молекулярный механизм, лежащий в основе данного процесса, перед ними открывается широкое окно возможностей по направленной оптимизации свойств инструмента. В частности, расшифровка пространственных структур сенсоров семейства GCaMP открыла возможность для рациональной инженерии этих белков, что в свою очередь привело к получению версий с улучшенными амплитудами ответа, аффинностями и кинетическими свойствами, которые нашли активное применение в различных областях биологии [680–685]. Поскольку в будущих работах мы планируем провести оптимизацию параметров Нурocrates, мы инициировали работу по синтезу кристаллов для рентгеноструктурного анализа. Необходимые эксперименты осуществляли совместно с нашими коллегами из лаборатории профессора Joris Messens (Брюссель, Бельгия).

Мы попытались получить структуры для Нурocrates в восстановленном и окисленном состояниях, а также для НурocratesCS. Лишь CS-версия образовывала орторомбические кристаллы ( $C2221$ ,  $a = 90.242$ ,  $b = 95.447$ ,  $c = 106.278$ ,  $\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$ ), содержащие одну молекулу сенсора на ассиметричную единицу, с достаточным качеством дифракции (разрешение  $2.1 \text{ \AA}$ ). Для расшифровки конформации белка применяли подход молекулярной замены, используя NemR<sup>C106</sup> (PDB ID: 4YZE) и кальциевый сенсор Case16 (PDB ID: 3O77), также основанный на srYFP, в качестве моделей поиска (**Рис. 40А**). Наложение структур NemR<sup>C106</sup> и сенсорного домена из НурocratesCS ярко демонстрирует

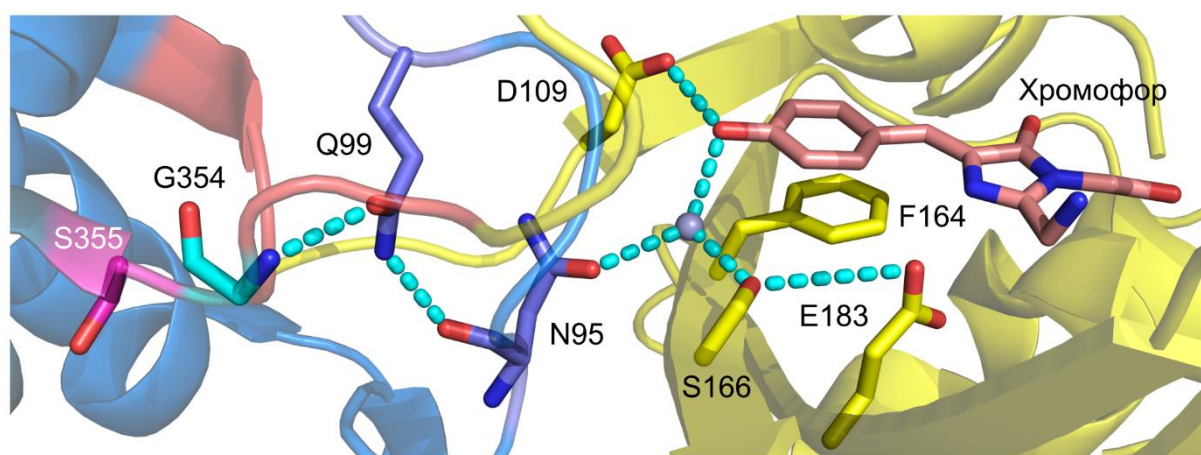


**Рисунок 40.** Пространственная структура HucratesCS. (А) Общий вид укладки белка. Голубой цвет – N-концевая часть NemR<sup>S106</sup>. Синий – С-концевая часть NemR<sup>S106</sup>. Желтый – srYFP. Красный – линкеры. Розовый – ключевые остатки Ser355 и Lys424. Регионы, представленные остатками 1-7, 40-42 и 193-207, отсутствуют. (Б) Наложение NemR<sup>C106</sup> (PDB ID: 4YZE) и чувствительного домена HucratesCS. RMSD – среднеквадратичное отклонение. (В) Аминокислотное микроокружение имидазолинового кольца в составе хромофора. Желтый цвет – остатки из srYFP. (Г) Остаток Asn95 сопрягает сенсорный и репортерный домены индикатора через скоординированную молекулу воды (голубая сфера). Желтый цвет – остатки из srYFP. Синий – остатки из NemR<sup>S106</sup>.

схожесть пространственных организаций, характеризующуюся средним квадратичным отклонением 0.506 Å для 159 атомов (Рис. 40Б). Важно отметить, что конфигурации Cys106 и Lys175 из NemR<sup>C106</sup> очень похожи на таковые для Ser355 и Lys424 из сенсора. Таким образом, интеграция srYFP оказала лишь минимальный структурный эффект на общую укладку домена, происходящего из NemR.

HydrocratesCS является вторым *srYFP*-содержащим белком с расшифрованной пространственной структурой, а также первым редокс-сенсором на основе *srFP*, для которого известна подобная информация. Его хромофор находится в *цис*-конфигурации и состоит из имидазолинового кольца, соединенного с планарным 4-гидроксибензильным кольцом. Последнее стабилизировано путем образования  $\pi$ - $\pi$  стекинговых взаимодействий с ароматической группой Phe164, расположенного на расстоянии около 3.9 Å. Данная особенность обеспечивает желтый цвет сенсора за счет батохромного сдвига пиков возбуждения и эмиссии флуоресценции в более длинноволновую область оптического диапазона. Имидазолиновое кольцо хромофора также образует несколько стабилизирующих взаимодействий с окружающими остатками (**Рис. 40В**).

Asn95, расположенный на N-конце подвижной петли, представляет собой аминокислоту, которая химически сопрягает сенсорный домен индикатора с хромофорным окружением репортерного домена (**Рис. 40Г**). Помимо этого, обсуждаемая позиция образует контакты с полипептидным остовом, принадлежащим Gln96 и Phe97, также расположенным вплотную к подвижному региону. Еще одним партнером Asn95 выступает Ser166 – консервативный остаток, участвующий в организации пути переноса протона в возбужденном состоянии (ESPT). Интересно, что взаимодействие репортерного и сенсорного доменов в кальциевом индикаторе Case16, сконструированном на основе *srYFP*, происходит схожим образом. В случае данного белка связывающим остатком является Ser24 [686]. Описанная информация обладает крайне высокой ценностью как для



**Рисунок 41.** Предполагаемый механизм сопряжения ключевого остатка Cys355 и хромофора. Голубой цвет – N-концевая часть *NemR*<sup>S106</sup>. Синий – C-концевая часть *NemR*<sup>S106</sup>. Желтый – *srYFP*. Красный – линкеры. Розовый – ключевые остатки Ser355 и Lys424. Циановый – остов остатка Gly354. Голубая сфера отображает молекулу воды. Пояснения в тексте.

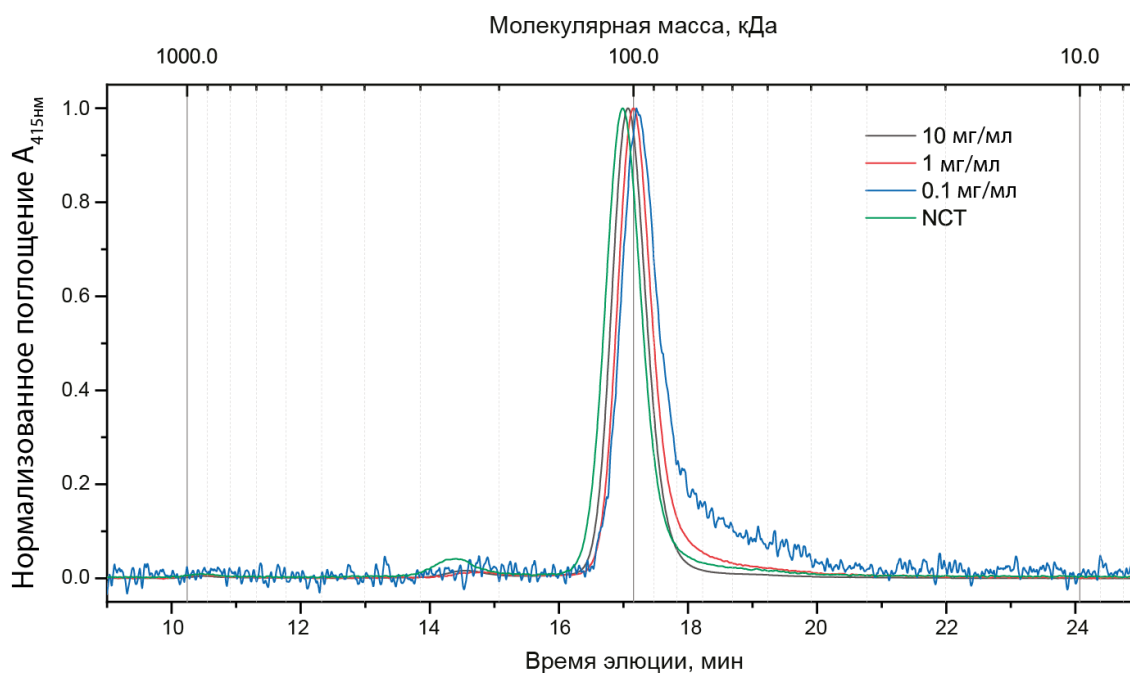
понимания механизмов функционирования Нурocrates, так и для его рационального улучшения. Конформационные перестройки, происходящие в области подвижной петли под действием NaOCl, могут влиять на положение Asn95 и тем самым модулировать параметры его взаимодействия с хромофорным окружением. В свою очередь, именно оно определяет константу диссоциации хромофора, а также квантовые выходы флуоресценции протонированной и депротонированной форм. Таким образом, полученный кристалл может быть использован для проектирования новых версий индикатора с более эффективным сопряжением сенсорного и репортерного доменов.

Рентгеноструктурные данные позволяют предполагать, что остов Asn95 образует водородную связь с боковой цепью Gln99, который, в свою очередь, взаимодействует с пептидной группой Gly354. Интересно, что данная аминокислота находится в непосредственном контакте с ключевым остатком Cys355. В этом свете кажется привлекательной гипотеза о том, что описанная сеть водородных связей представляет собой путь передачи химической информации от сайта распознавания аналита до хромофора, отвечающего за генерацию оптического сигнала (**Рис. 41**). В будущих работах мы планируем сконструировать необходимые точечные мутанты и более внимательно проверить роль упомянутых позиций в функционировании Нурocrates.

Дальнейшее изучение структуры показывает, что нековалентные контакты между интерфейсами  $\beta$ -бочонка сpYFP и NemR<sup>S106</sup> достаточно ограничены. Мы обнаружили возможные  $\pi$ - $\pi$  взаимодействия между ароматическими кольцами Tyr67/Tyr106 и Phe184/Phe429. Расстояния, допускающие формирование водородных связей, могут быть замечены в случаях Gln91/Gln165, Gln19/Asn131, а также боковой цепи Arg24 и пептидного кислорода Glu133. Неизвестно, играют ли данные контакты какую-либо роль в сопряжении сенсорного и репортерного доменов. Исследование их вклада в функционирование Нурocrates может служить предметом отдельного проекта.

Другая информация, которую предоставляет кристалл сенсора, касается выявления факторов, влияющих на рKa хромофора. В частности, путь переноса протона в возбужденном состоянии оказывает существенное влияние на обсуждаемый параметр. В случае НурocratesCS данная цепочка образована молекулой воды (W1) и остатком Ser166, выступающими в качестве промежуточных переносчиков, а также Glu183, играющим роль конечного акцептора. Изучение факторов, влияющих на пространственную конфигурацию и кислотно-основные свойства упомянутых групп, открывает возможность для направленного модулирования параметров диссоциации хромофора. Одним из наиболее





**Рисунок 42.** Аналитическая гель-фильтрация очищенного препарата Hupocrates. Восстановленный белок тестировали в трех концентрациях (0.1-10 мг/мл). Окисленный белок тестировали в концентрации 1 мг/мл после воздействия NCT в молярном соотношении 1:20 (сенсор/окислитель).

интересных практических применений полученных знаний может стать попытка создания рН-нечувствительной версии индикатора.

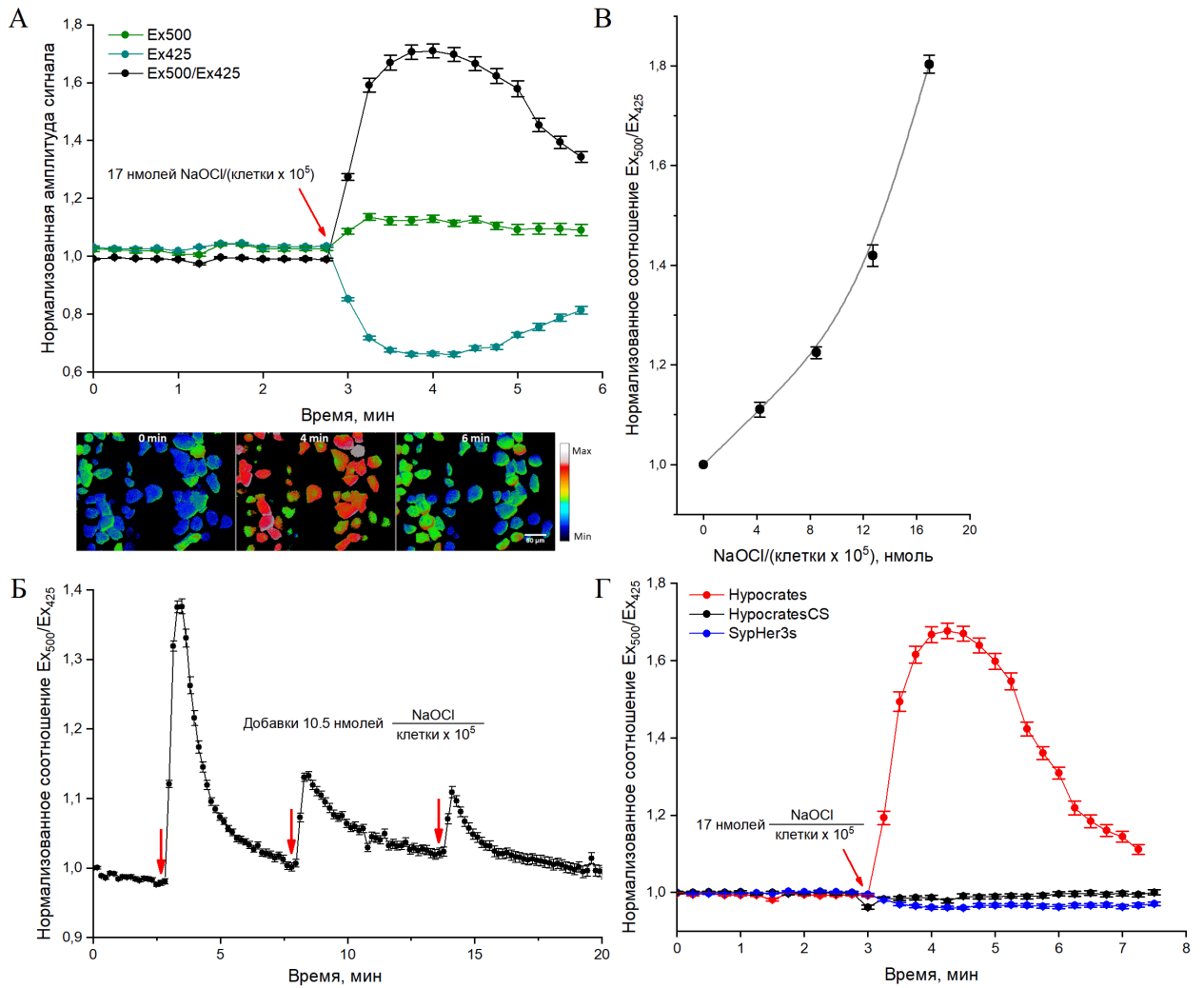
Поскольку литературные данные свидетельствуют о том, что NemR формирует функциональный гомо-димер [660], мы решили проверить, оказала ли интеграция *srYFP* какой-либо эффект на его олигомерное состояние. Согласно экспериментам по гель-фильтрации, Hupocrates ведет себя как строгий димер (99.85 кДа) вне зависимости от концентрации белка и редокс-статуса (**Рис. 42**).

### 3.8. Тестирование Hupocrates в культурах эукариотических клеток.

После детального описания основных биохимических свойств Hupocrates, мы решили проверить, является ли разработанный нами инструмент функциональным в эукариотических системах экспрессии. Для первичных экспериментов мы выбрали линию клеток HeLa Kyoto, которая легка в обращении и хорошо охарактеризована в литературе. Плазмиду, несущую ген *Hupocrates*, доставляли в клетки при помощи липофекции и на следующий день полученные препараты визуализировали в режиме широкопольной флуоресцентной микроскопии. Базовые тесты заключались в изучении влияния экзогенного гипохлоритного стресса на сигнал, регистрируемый от сенсора. Важно отметить следующий момент – поскольку HOCI ведет себя как крайне

реакционноспособная молекула, она моментально разрушается при контакте с биологическими образцами. Таким образом, вместо указания абсолютных концентраций окислителя, имеет смысл ориентироваться на используемое соотношение между аналитом и клетками. Мы также использовали PBS в качестве среды для микроскопии, поскольку более привычные варианты содержат нуклеофильные молекулы в своем составе, которые способны вытитровать гипогалогенные кислоты. Наконец, съемку осуществляли при комнатной температуре с целью избежать занижения максимальной амплитуды ответа сенсора.

Воздействие NaOCl в концентрации 17 нмоль/( $10^5$  клеток) приводило к характерному радиометрическому ответу Hurocrates величиной около 1.8 раза (**Рис. 43А**). Интересно, что в условиях эукариотической цитоплазмы основной вклад в наблюдаемую динамику вносит выраженное падение левого пика возбуждения флуоресценции, в то время как правый пик растет достаточно скромно. Уже через одну минуту после внесения добавки, спектр сенсора начинает возвращаться к исходному состоянию, свидетельствуя о том, что Hurocrates способен взаимодействовать с антиоксидантными системами клетки. Таким образом, в условиях цитоплазмы ответ индикатора является обратимым, что подтверждает наши *in vitro* данные, полученные с использованием ДТТ. Мы также продемонстрировали, что Hurocrates пригоден для визуализации нескольких последовательных актов окисления и восстановления (**Рис. 43Б**). Впрочем, начиная со второй добавки его максимальная амплитуда ответа снижается. Поскольку промежутки времени между воздействиями были достаточно маленькими, вряд ли подобный эффект связан с дополнительной активацией антиоксидантных систем. Скорее всего, высокие концентрации NaOCl приводят к окислительному повреждению сенсора, которое «запирает» белок в неоптимальной конформации. Для того, чтобы установить динамический диапазон инструмента в эукариотических клетках, мы оценивали амплитуду сигнала Hurocrates на добавки окислителя в возрастающих концентрациях (**Рис. 43В**). Минимальный достоверно детектируемый ответ мог быть обнаружен при воздействии NaOCl в количестве  $\sim 4.2$  нмоль/( $10^5$  клеток). Когда тестируемая величина превышала 17 нмоль/( $10^5$  клеток), амплитуда сигнала начинала падать за счет выраженного выгорания флуоресцентного домена. Более того, в подобных условиях клетки крайне быстро изменяли свою форму, теряли контакт с подложкой и демонстрировали признаки гибели. Таким образом, проверка эффектов, оказываемых более высокими концентрациями окислителя, оказалась невозможной.

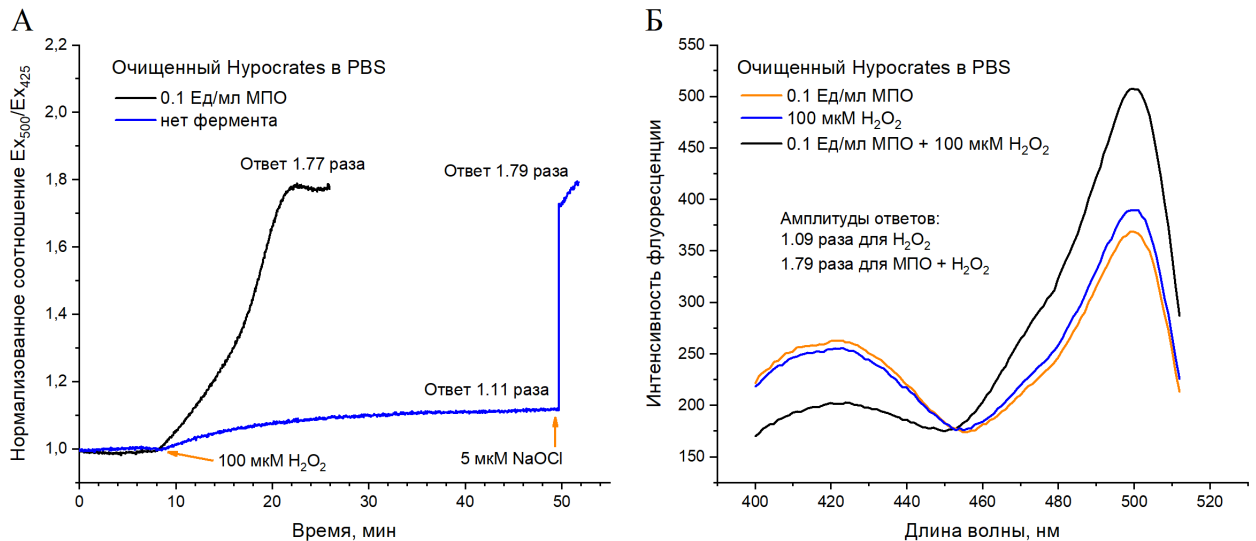


**Рисунок 43.** Тестирование Hyprocrates на культуре клеток HeLa Kyoto. **(А)** Изменение оптических параметров сенсора после разовой добавки NaOCl. Данные представлены как среднее  $\pm$  SEM, N=2 эксперимента,  $n \geq 30$  клеток на эксперимент. Под графиком приведена раскадровка одного из экспериментов, где псевдоцвет соответствует соотношению Ex500/Ex425. **(Б)** Hyprocrates подходит для многократной регистрации событий окисления в цитоплазме клеток HeLa Kyoto. Данные представлены как среднее  $\pm$  SEM, N = 1 эксперимент,  $n = 26$  клеток. **(В)** Кривая титрования Hyprocrates в цитоплазме клеток HeLa Kyoto возрастающими концентрациями NaOCl. Данные представлены как среднее  $\pm$  SEM, N=2 эксперимента,  $n \geq 25$  клеток на эксперимент. **(Г)** Сравнение сигналов Hyprocrates, HyprocratesCS и SypHer3s в цитоплазме клеток HeLa Kyoto в присутствии экзогенной добавки NaOCl. Данные представлены как среднее  $\pm$  SEM, N = 3 эксперимента для Hyprocrates и HyprocratesCS, N = 2 эксперимента для SypHer3s,  $n \geq 28$  клеток на эксперимент.

Для того, чтобы убедиться, что наблюдаемая нами динамика действительно связана с гипогалогенным стрессом, мы провели параллельные серии экспериментов, в которых использовали инактивированную версию HyprocratesCS, а также рН-индикатор

SyrHer3s (Рис. 43Г). В обоих случаях протестированные концентрации NaOCl не вызвали никаких сдвигов в оптических свойствах. Полученные данные позволяют сделать несколько выводов. Во-первых, экзогенный гипогалогенный стресс не приводит к выраженному изменению кислотности цитоплазмы HeLa Kyoto. Во-вторых, вне всяких сомнений Нурocrates способен визуализировать (псевдо)гипогалогенные кислоты и их производные в эукариотических клетках. Его максимальная амплитуда ответа (~1.8 раза) соответствует значениям, характерным для бактериальных клеток, а также для очищенного препарата белка. Сигнал сенсора является обратимым и может быть возвращен к исходному уровню за счет работы антиоксидантных систем клетки. И, наконец, в-третьих, НурocratesCS не отвечает на NaOCl не только в прокариотическом, но и в эукариотическом контексте. Соответственно, данный мутант может быть задействован в качестве контрольной версии для детекции артефактов, связанных с колебаниями pH, ионной силы и других факторов.

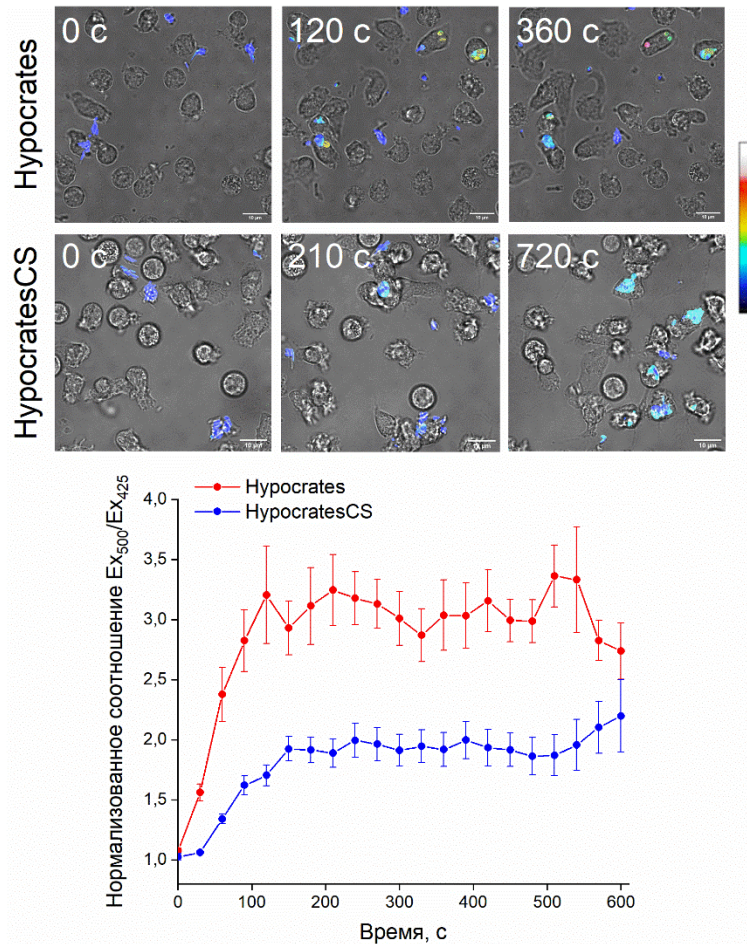
Известно, что эффекты, которые (псевдо)гипогалогенные кислоты и их производные оказывают на живые системы, в существенной мере зависят от режима обработки. Например, можно ожидать, что разовая высокая доза HOCl будет способна проникнуть вглубь клеток, однако, такое же количество окислителя, доставленное до



**Рисунок 44.** Тестирование очищенного препарата Нурocrates в присутствии каталитически-активной МПО. (А) Временная динамика сигнала Нурocrates в присутствии системы МПО-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, а также исключительно H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> без фермента. HOCl, синтезируемая под действием МПО, вызывает максимальный ответ сенсора, в то время как экстремально высокая концентрация H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> приводит лишь к небольшим сдвигам в оптических свойствах. (Б) Спектры возбуждения флуоресценции Нурocrates в присутствии МПО и H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, а также системы МПО-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Время инкубации составляло 5 минут. На обеих панелях концентрация белка равнялась 500 мкМ.

мишени в виде небольших порций в течение длительного промежутка времени, преимущественно прореагирует с образцом в районе плазмалеммы. Едва ли в физиологических условиях какие-либо клетки сталкиваются с мощными и краткосрочными гипохлоритными импульсами. Скорее, имеет место второй сценарий. В свете представленных рассуждений, мы решили проверить функционирование Нурocrates в условиях эндогенного (псевдо)гипогалогенного стресса. Одной из лучших моделей для выполнения поставленной задачи является культура первичных нейтрофилов человека. Однако, прежде чем приступить к более сложным экспериментам, мы провели предварительные тесты, в рамках которых мы подвергали очищенный препарат сенсора воздействию системы, состоящей из хлорид-анионов, пероксида водорода и МПО. Полученные результаты свидетельствуют о том, что сигнал сенсора начинает изменяться сразу же после внесения  $H_2O_2$  в пробу, при этом в течение десяти минут он достигает насыщения с финальной амплитудой около 1.8 раза, соответствующей другим протестированным условиям (**Рис. 44А**). Изучение спектров возбуждения флуоресценции препаратов до и после обработки позволяет заключить, что в условиях постепенной генерации  $HOCl$  также приводит к радиометрическому сдвигу в оптических свойствах. При этом  $H_2O_2$  сам по себе оказал лишь незначительное влияние на сенсор, хотя и был представлен в очень высокой, физиологически нерелевантной, концентрации на протяжении большого отрезка времени (**Рис. 44Б**). Важный вывод, полученный на основе проведенных тестов, заключается в том, что несмотря на то, что помимо Cys355 Нурocrates явно содержит дополнительные сайты, которые взаимодействуют с гипогалогенными кислотами, он способен детектировать плавную продукцию  $HOCl$  с первых моментов активации фермента. Впрочем, стоит обратить внимание на то, что зарегистрированная нами динамика не является линейной. Спустя пять-шесть минут после добавки скорость роста сигнала увеличивается. Вполне возможно, что область перегиба соответствует состоянию белка, в котором дополнительные реакционные мишени оказались полностью вытритрованными. Однако, этот вопрос требует дальнейшего экспериментального изучения.

Для визуализации эндогенной продукции (псевдо)гипогалогенных кислот и их производных первичными нейтрофилами человека, мы выделяли необходимые клетки из крови добровольцев, после чего активировали их РМА. На следующем этапе, в ходе флуоресцентной микроскопии мы вносили в чашки предварительно опсонизированные *E. coli*, экспрессирующие либо Нурocrates, либо НурocratesCS. Как только бактерия



**Рисунок 45.** Динамика сигналов Hypocrates и HypocratesCS в цитоплазме бактериальных клеток, фагоцитируемых первичными нейтрофилами человека. Нулевая точка графика соответствует одному кадру до момента фагоцитоза. Верхние панели представляют собой раскадровки избранных экспериментов, где псевдоцвет соответствует соотношению Ex<sub>500</sub>/Ex<sub>425</sub>. Данные представлены как среднее  $\pm$  SEM, N = 3 эксперимента, n = 35 клеток.

оказывалась в фагосоме нейтрофила, сигнал, регистрируемый от сенсора, начинал резко расти, после чего выходил на плато в среднем через две минуты (**Рис. 45**). Подобная динамика соответствует данным, опубликованным в литературе. В частности, Degrossoli и коллеги наблюдали очень схожий характер поведения сенсоров на основе roGFP2 при их экспрессии в *E. coli*, поглощаемых нейтрофил-подобными клетками линии PLB-985 [620]. В своей статье авторы не смогли обнаружить какие-либо изменения в сигналах, поступающих от свободных бактерий, на основе чего они сделали вывод, что в тестируемых условиях агрессивные окислители, продуцируемые PLB-985, не покидают их цитоплазму. Мы также не наблюдали, чтобы клетки *E. coli*, экспрессирующие Hypocrates и не попавшие внутрь нейтрофила, изменяли свои оптические свойства. В другой статье с использованием NaOCl/pH-селективного сенсора z-cNOClate, основанного на ДНК и

низкомолекулярных красках, коллектив авторов показал, что после интернализации частиц зимозана, взрыв продукции хлорноватистой кислоты в фагосоме приходится на временное окно, расположенное между 5 и 10 минутами [687]. Неизвестно, связаны ли описанные различия с тем фактом, что мы и Degrossoli задействовали сенсоры, экспресисруемые в бактериях, в то время как в упомянутой статье проба находилась прямо в полости фагосомы, либо же с различиями в химической природе самих индикаторов.

Интересно, что в наших экспериментах HupocratesCS также демонстрировал ответ, однако, по амплитуде (~1.9 раза против ~3.1 раза) он был заметно меньше, чем аналогичный параметр исходного белка (Рис. 45). Природа данного явления должна стать предметом будущих работ. Одно из объяснений заключается в том, что продукция гипогалогенных кислот в нейтрофилах оказывается настолько интенсивной, что они не успевают конвертироваться во вторичные производные и взаимодействуют с CS-мутантом напрямую, как это происходит в условиях *in vitro*. Впрочем, известно, что показатель pH фагосомы меняется по мере ее созревания. Так, в первые минуты после интернализации захватываемой частицы он сдвигается в область щелочных значений [688,689]. Подобный тренд был обнаружен в том числе в уже упомянутой работе с использованием z-сНОСlate [687]. Таким образом, можно предположить, что динамика HupocratesCS по большей части соответствует pH-опосредованным сдвигам. Косвенным подтверждением представленной гипотезы выступает тот факт, что в тестируемой модели максимальная амплитуда ответа Hupocrates (~3.1 раза) существенно превышает значения, зарегистрированные для других систем (~1.8 раза). Подобный эффект может быть получен путем суммирования NaOCl- и pH-индуцированных сдвигов в спектре возбуждения флуоресценции. В любом случае, каким бы ни было истинное объяснение обсуждаемого явления, мы можем быть уверены, что в модели фагоцитоза бактерий первичными нейтрофилами человека сигналы Hupocrates и HupocratesCS достоверно отличаются. Таким образом, разработанный нами сенсор подходит для визуализации эндогенной продукции (псевдо)гипогалогенных кислот и их производных. В частности, он может быть задействован в высокопроизводительных скринингах, направленных на поиск химических агентов, модулирующих метаболизм нейтрофилов, или же в работах, направленных на изучение взаимодействия патогенных бактерий и иммунной системы.

### 3.9. Визуализация (псевдо)гипогалогенного стресса *in vivo* в модели ампутации хвостового плавника *D. rerio*.

На последнем этапе проекта мы решили использовать Нурocrates в условиях *in vivo*, что, с одной стороны, позволит доказать его работоспособность в сложных живых системах, а с другой стороны прольет свет на еще не до конца исследованные физиологические процессы. После тщательного изучения опубликованной литературы мы остановились на модели ампутации хвостового плавника мальков *D. rerio*. Во-первых, подобные эксперименты не являются очень сложными с технической точки зрения и часто используются для проверки новых индикаторов. В частности, они были задействованы при тестировании НурPer3 [593], iNар [605] и НурPer7 [594]. Во-вторых, обсуждаемая модель представляет существенный интерес в контексте исследования гипогалогенного стресса.

Первая работа, в рамках которой генетически кодируемый сенсор был использован для визуализации метаболических процессов, происходящих после механического повреждения тканей *D. rerio*, была опубликована в 2009 году [690]. Niethammer и коллеги проверяли гипотезу о том, что  $H_2O_2$  может работать как паракринный регулятор в организме позвоночного, как это происходит у растений в ходе развития ксилемы [691]. На тот момент было известно, что перекись водорода оказывает сигнальные эффекты в культурах животных клеток [692,693], однако, прямые свидетельства существования аналогичных механизмов в условиях *in vivo* отсутствовали. Авторам обсуждаемой работы удалось убедительно продемонстрировать, что редокс-стресс, зарегистрированный при помощи НурPer, наступает раньше, чем лейкоциты успевают прибыть в область раны [690]. Таким образом, это пошатнуло традиционные представления о том, что именно клетки иммунной системы служат основными продуцентами активных окислителей в очагах воспаления. Аккуратные эксперименты, проведенные при помощи ингибиторов ферментов и РНК-интерференции, свидетельствовали о том, что источником  $H_2O_2$  при ампутации хвостового плавника служит DUOX из эпителиальных клеток. Более того, в тех условиях, когда работа белка была нарушена, нейтрофилы переставали мигрировать в сторону повреждения [690]. Таким образом, коллектив авторов элегантно подтвердил гипотезу о том, что  $H_2O_2$  является паракринным регулятором, контролирующим миграцию лейкоцитов в условиях *in vivo*.

С тех пор была опубликована еще пара работ, посвященных редокс-процессам в модели ампутации хвостового плавника, главными целями которых стали попытки



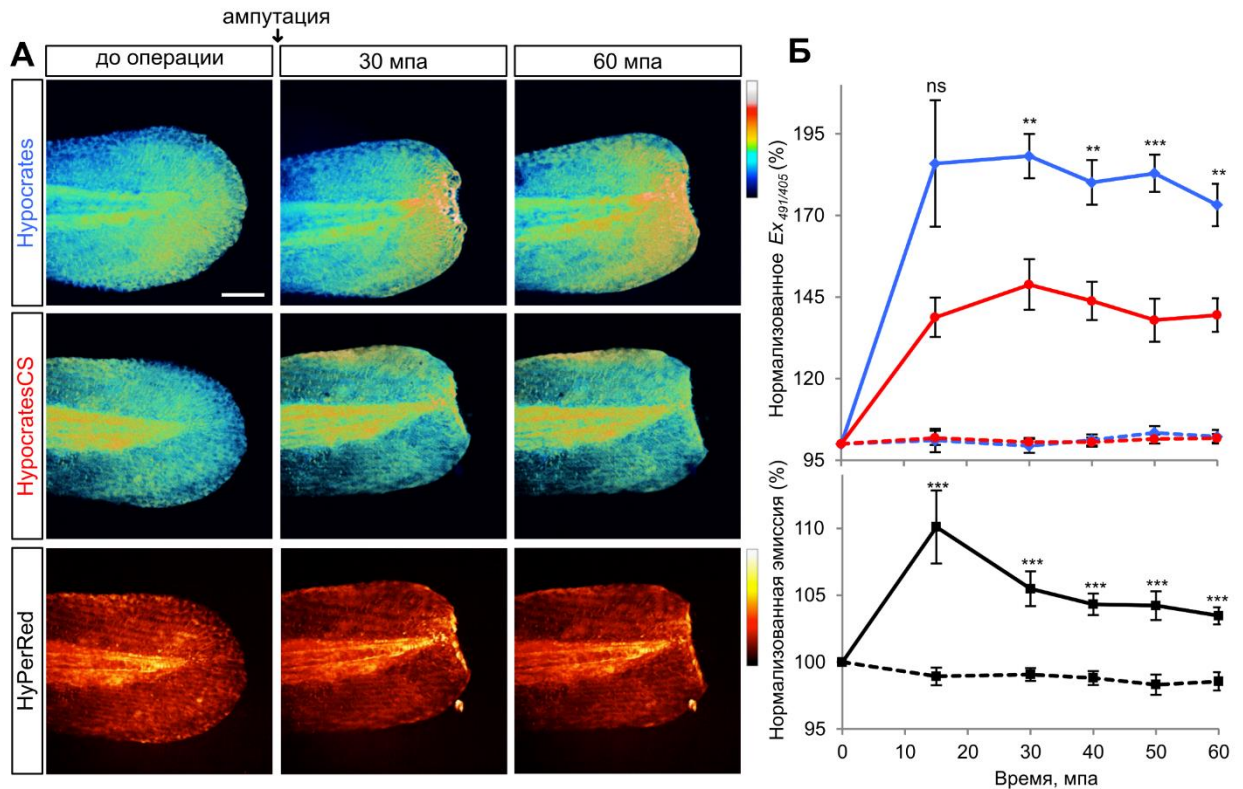
пролить свет на молекулярные механизмы наблюдаемых явлений. К сожалению, полученные данные остаются несколько противоречивыми. Так, Уоо и соавторы показали, что активация Src-подобной киназы Lyp в нейтрофилах является строго необходимой для их привлечения в область раны [694]. Известно, что Lyp содержит редокс-активный остаток цистеина, который способен окисляться под действием  $H_2O_2$  и регулировать работу фермента [694]. Однако, кинетическое моделирование градиентов пероксида, возникающих в ходе ампутации, предполагает, что концентрация окислителя, достаточная для преодоления емкости антиоксидантных систем, распространяется не дальше, чем на 30 мкм от зоны разреза. При этом кровеносные сосуды, в которых находятся нейтрофилы, расположены в среднем на дистанции около 200 мкм [695]. Таким образом, встает вопрос – как именно Lyp чувствует редокс-стресс? Является ли его ключевой остаток цистеина достаточно реакционноспособным, чтобы конкурировать с пероксиредоксинами, или же в тканях рыбы возникает цепочка окислительных процессов, передающая информацию к конечному эффектору?

Другой важный вопрос касается того, какие факторы лежат в основе пространственно-временной динамики  $H_2O_2$  в обсуждаемой модели. Химическое ингибирование пероксиредоксинов, а также тиоредоксинов, снабжающих их восстановительными эквивалентами, приводит к тому, что градиент редокс-стресса становится более интенсивным и простирается в более глубокие ткани животного [695]. Действительно, было бы разумным предполагать, что именно работа антиоксидантных систем нейтрализует возникающие возмущения. Однако, эксперименты, проведенные Pase и коллегами, подвергают такой интуитивно-понятный взгляд большим сомнениям [201]. При помощи рыб, лишенных лейкоцитов, они показали, что градиент  $H_2O_2$  не исчезает на достаточно длинных промежутках времени, достигающих 90 минут. Интересно, что точно такой же эффект мог быть воспроизведен в животных, дефектных по гену МПО. При этом, он не был связан с изменением количества нейтрофилов в организме, а также с нарушениями в их активности или миграции [201]. Это позволило предположить, что именно галогенирующая активность МПО является ключевым фактором, элиминирующим пероксид водорода из области воспаления. Однако, важно понимать, что обсуждаемая работа предоставила лишь косвенные свидетельства предложенного сценария. В частности, неизвестно, способна ли МПО конкурировать за субстрат с такими эффективными ферментами как пероксиредоксины. В том случае, если традиционные гистохимические тесты на активность МПО проводили без предварительной обработки образцов пероксидом водорода, окрашенные зоны могли быть обнаружены в

непосредственном контакте с регионом ампутации, но не дальше [201]. Это является существенным аргументом в пользу того, что данная область содержит фермент, осуществляющий свой каталитический цикл в условиях *in vivo*. Авторы также обнаружили, что значительная доля нейтрофилов, прибывших в зону раны, демонстрируют более низкие уровни  $H_2O_2$ , нежели окружающие клетки, что также позволяет предполагать их непосредственное участие в его поглощении [201]. И, все-таки, работы, которые бы убедительно демонстрировали конверсию пероксида водорода в (псевдо)гипогалогенные кислоты в области раны, отсутствуют. Таким образом, мы поставили перед собой задачу пролить свет на описанную проблему при помощи разработанного нами сенсора.

Необходимые эксперименты были проведены совместно с нашими коллегами из лаборатории профессора Sophie Vriz (Париж, Франция). В первую очередь, мы нарабатывали мРНК, кодирующие *Hypocrates*, *HypocratesCS*, а также красный сенсор на пероксид водорода *HyPerRed* [595] при помощи *in vitro* транскрипции. Полученные образцы очищали, после чего закалывали в оплодотворенные икринки *D. rerio* для достижения временной экспрессии индикаторов. Для того, чтобы одновременно следить за динамикой  $H_2O_2$  и (псевдо)гипогалогенных кислот мы использовали две комбинации инструментов – *Hypocrates/HyPerRed* и *HypocratesCS/HyPerRed*. Ингибирование пигментации тканей, препятствующее надежному считыванию сигналов, осуществляли за счет воздействия фенилтиокарбамида, который нарушает выработку меланина. Малькам позволяли развиваться в течение двух дней, после чего их извлекали из хориона, анестезировали в растворе трикаина и иммобилизовали на чашке с легкоплавкой агарозой. Далее, мы проводили ампутацию хвостового плавника и визуализировали сигналы, поступающие от сенсоров, в режиме широкопольной флуоресцентной микроскопии.

Зарегистрированный пик продукции пероксида водорода приходился на 15-ую минуту съемки (**Рис. 46**), что соответствует данным Niethammer и соавторов [690]. Степень (псевдо)гипогалогенного стресса достигала максимальной амплитуды к тому же моменту времени, однако, демонстрировала иную динамику в дальнейшем. В то время как ответ *HyPerRed* постепенно снижался, сигнал *Hypocrates* оставался стабильным в течение всего эксперимента (**Рис. 46**). Таким образом, нам удалось подтвердить предположения Pase [201] и доказать, что при ампутации хвостового плавника *D. rerio* область раны является очагом генерации НОС1 и/или родственных соединений. При этом наблюдаемый (псевдо)гипогалогенный стресс оказывается достаточно устойчивым во времени.



**Рисунок 46.** Визуализация динамики (псевдо)гипогалогенных кислот и пероксида водорода в модели ампутации хвостового плавника *D. rerio*. **(А)** Матричные РНК, кодирующие Нурocrates, НурocratesCS и HyPerRed, закалывали в эмбрионы рыб на стадии одной клетки. Ампутацию проводили спустя 48 часов после оплодотворения. Флуоресцентные изображения регистрировали до операции, после чего продолжали съемку вплоть до 60 минут после ампутации (мпа). Псевдоцвета соответствуют сигналам сенсоров. **(Б)** Временная динамика сигналов Нурocrates, НурocratesCS и HyPerRed. Сигналы нормализовали относительно средних значений, зарегистрированных на первых кадрах съемки. Сплошные линии соответствуют экспериментальным малькам, подвергнутым операции. Пунктирные линии соответствуют контрольным малькам (без ампутации). Синий цвет – Нурocrates, красный цвет – НурocratesCS, черный цвет – HyPerRed. Для проверки статистической значимости наблюдаемых различий использовали двухфакторный дисперсионный анализ, а также тест Тьюки. Данные представлены как среднее  $\pm$  SEM,  $N=4$  эксперимента,  $n \geq 3$  эмбриона (для Нурocrates и НурocratesCS). Данные представлены как среднее  $\pm$  SEM,  $N=3$  эксперимента,  $n \geq 7$  эмбрионов (для HyPerRed). Для Нурocrates статистическую значимость проверяли относительно НурocratesCS. Для HyPerRed статистическую значимость проверяли относительно контрольных эмбрионов. \*\* соответствует  $P < 0.01$ , \*\*\* соответствует  $P < 0,001$ , ns соответствует отсутствию статистической значимости.

Интересно, что сигнал НурocratesCS также менялся, однако, в меньшей мере, и статистические тесты подтверждают наличие достоверной разницы (**Рис. 46**). Несмотря на то, что с большой вероятностью данное наблюдение свидетельствует о зацелачивании

среды в ходе микроскопии, мы не можем исключать возможность того, что продукция НОС1 в тестируемых условиях является настолько выраженной, что концентрация окислителя становится достаточной для модификации инактивированного белка. В будущем мы планируем провести аналогичные эксперименты с рядом модификаций. В частности, было бы интересно использовать рыб, нейтрофилы которых мечены красным флуоресцентным белком. Это позволит нам визуализировать динамику (псевдо)гипогалогенных кислот в их непосредственном окружении по мере миграции к очагу воспаления. Еще один вариант предполагает экспрессию Nupocrates в цитоплазме самих нейтрофилов с целью оценки параметров редокс-гомеостаза иммунных клеток, участвующих в регенерации поврежденной ткани.

#### 4. Заключение.

Клонирование гена зеленого флуоресцентного белка из *Aequorea victoria* произвело настоящую революцию в молекулярной биологии. За последние тридцать лет GFP и его гомологи послужили платформами для создания огромного количества аналитических инструментов, которые позволяют исследовать явления и процессы, ранее недоступные для научного сообщества. В частности, генетически кодируемые сенсоры представляют собой одну из наиболее бурно развивающихся ветвей в обсуждаемой сфере. Коллективы из лабораторий со всех уголков мира постоянно создают и описывают новые индикаторы, которые постепенно вытесняют более старые методики, подверженные существенному количеству артефактов и плохо применимые для визуализации биохимических событий в режиме реального времени. Однако, все еще существует достаточно большое количество соединений, для которых соответствующие инструменты пока не разработаны. Поэтому в наших картинах нормальных физиологических процессов и патологических состояний до сих пор остаются белые пятна.

В настоящей работе мы разработали первый в мире генетически кодируемый сенсор (Нурocrates) для регистрации (псевдо)гипогалогенных кислот и их производных в условиях *in vivo*. Нурocrates обладает отличными свойствами, позволяющими использовать его в модельных системах различного уровня сложности. Он демонстрирует достаточно выраженную амплитуду ответа (~1.8 раза), при этом оптический сигнал является обратимым, что открывает возможность по визуализации не только актов окисления, но и работы антиоксидантных систем по их нейтрализации. Мы также охарактеризовали селективность инструмента, и показали, что его использование в условиях изменяющегося показателя pH и высокой продукции пероксинитрита может быть затруднено. Таким образом, мы уверены, что внимательные исследователи, использующие наш инструмент, не столкнутся с неожиданными артефактами измерений.

Нурocrates обладает необычными кинетическими свойствами, ранее не описанными в литературе. Это выражается в его уникально высокой чувствительности в отношении галаминов, которые, скорее всего, являются его преимущественными мишенями *in vivo*. Поскольку константы скоростей реакций с участием активных форм хлора обычно изучают на примерах низкомолекулярных модельных соединений, неизвестно, насколько подобное явление распространено в природе. Можно предположить, что наша работа станет отправной точкой по поиску белков с аналогичными параметрами и исследованию их роли в живых клетках.

Мы также предприняли первые шаги по выявлению молекулярного механизма функционирования Nurocrates. В отличие от родительского белка, NemR, разработанный нами сенсор, по всей видимости, не полагается на формирование обратимой сульфенамидной связи между ключевыми остатками цистеина или лизина. В условиях цитоплазмы живых клеток наличие одного лишь Cys355 оказывается достаточным для генерации специфичного сигнала. Однако, конкретная природа модификаций белка, возникающих под действием активных форм галогенов, должна быть установлена в будущих работах. Данные рентгеноструктурного анализа позволяют предположить, что остаток Asn95 играет принципиальную роль в сопряжении сенсорного и репортерного доменов Nurocrates, поскольку он одновременно формирует контакты с хромофором и его микроокружением, подвижной петлей в составе NemR и Gly354, прилегающим к ключевому цистеину. В этом свете, гипотеза о том, что он служит своеобразным «узлом», интегрирующим различные участки сенсора, кажется очень привлекательной.

В целом, Nurocrates представляет собой первый редокс-сенсор на основе srFP, чья пространственная структура расшифрована. Мы надеемся, что эта информация послужит не только для его собственной оптимизации в будущем, но и для улучшения свойств других srYFP-зависимых инструментов: например, индикаторов семейства HyPer для регистрации  $H_2O_2$ , SoNar для регистрации NAD(H) и iNar для регистрации NADP(H).

Наконец, Nurocrates позволил нам найти ответы на ряд биологических вопросов, актуальных в контексте изучения (псевдо)гипогалогенного стресса. В частности, нам удалось зарегистрировать временную динамику активных форм галогенов в цитоплазме бактерий, фагоцитируемых первичными нейтрофилами человека. Тем самым, мы подтвердили ранние результаты, полученные при помощи неселективных инструментов, согласно которым, клетки *E. coli* испытывают мощный гипогалогенный стресс с первых секунд после интернализации в полость фагосомы. Мы надеемся, что отработанная нами модельная система найдет широкое применение в научном сообществе и послужит для исследования механизмов взаимодействия патогенов и иммунной системы. Мы также смогли впервые в мире напрямую продемонстрировать тот факт, что пероксид водорода, который производится эпителиальными клетками в области раны и служит для привлечения лейкоцитов в зону воспаления, конвертируется в активные формы галогенов под действием миелопероксидазы.

## Выводы.

1. На основе транскрипционного фактора NemR из *E. coli* и cpYFP разработан генетически кодируемый сенсор Нурocrates для регистрации динамики (псевдо)гипогалогенных кислот и их производных в живых системах.
2. Максимальный ответ Нурocrates наступает при молярном соотношении сенсора к окислителю не более, чем 1:10, и характеризуется амплитудой около 1.8 раза. Ответ инструмента является быстрым, обратимым и достаточно селективным. Однако, Нурocrates демонстрирует чувствительность к пероксинитриту и показателю pH среды, что требует постановки дополнительных контролей при его использовании.
3. Установлена ключевая роль остатка Cys355 в способности Нурocrates взаимодействовать с активными формами (псевдо)галогенов. На основании данной информации создана инактивированная версия белка, НурocratesCS, которая может выступать в качестве контроля.
4. Расшифрована пространственная структура НурocratesCS, что делает его первым редокс-сенсором на основе cpFP, про который известна подобная информация.
5. Нурocrates протестирован на культурах эукариотических клеток. Показано, что *E. coli*, фагоцитируемые первичными нейтрофилами человека, подвергаются выраженному (псевдо)гипогалогенному стрессу в первые моменты после интернализации.
6. При помощи Нурocrates впервые визуализирована динамика (псевдо)гипогалогенного стресса в модели ампутации хвостового плавника *D. rerio*. Таким образом, мы доказали, что пероксид водорода, генерируемый эпителиальными клетками в области раны, действительно конвертируется в активные формы галогенов *in vivo*.

## Благодарности.

Я хотел бы выразить благодарности ряду людей, без которых я не смог бы осуществить представленную работу, опубликовать статьи по ее материалам и написать соответствующий текст диссертации.

Во-первых, я искренне благодарен моему руководителю, Дмитрию Сергеевичу Билану, за мудрые советы, терпение к моим недостаткам, искреннее желание помочь и попытки научить меня смотреть на мир более оптимистично. Я также благодарен Всеволоду Вадимовичу Белоусову, который в 2017 году предложил мне заняться этим проектом и создал все условия для продуктивной творческой деятельности.

Во-вторых, я благодарен всему коллективу Отдела метаболизма и редокс-биологии ИБХ РАН. Вы не только делились со мной своим опытом, участвовали в ценных дискуссиях, но и были рядом во время всех моих научных «взлетов» и «падений». Особенно я бы хотел отметить Анастасию Панову, Анастасию Сергееву и Романа Раевского, которые помогали мне с проведением некоторых экспериментов.

В-третьих, я хотел бы поблагодарить наших коллег из других лабораторий, которые заинтересовались моей работой и охотно согласились принять участие в исследованиях. Это Михаил Баранов и Андрей Гороховатский из ИБХ РАН; Maria-Armineh Tossounian и Joris Messens из Vrije Universiteit Brussel; Marion Thauvin и Sophie Vrız из Collège de France. Благодаря их усердному труду представленный проект оказался наполнен разносторонними результатами и смог раскрыться в полной мере.

В-четвертых, я благодарен всему коллективу Кафедры биохимии Биологического факультета МГУ. Это люди, стоящие у истоков моего научного пути. Именно они научили меня базовым экспериментальным навыкам, которыми я продолжаю пользоваться до сих пор. Кроме того, за годы обучения Кафедра стала для меня «вторым домом», и, всякий раз, оказываясь в ее стенах, я наполняюсь позитивными эмоциями.

Наконец, я хочу поблагодарить моих друзей. Мы не так часто говорили про науку, но именно благодаря вам я смог пережить множество бурь, сохранить здравый рассудок и найти умиротворение. А это, в свою очередь, дало мне силы заниматься исследованиями. Адам, Андрей, Даша, Игорь, Лиза, Мирьям, Олег, спасибо, что вы все это время были где-то рядом. И, конечно же, я благодарен моим родителям, которые продолжают поддерживать меня на каждом моем шагу.



### Список литературы.

1. Morris, J.C. The Acid Ionization Constant of HOCl from 5 to 35°. *J. Phys. Chem.* **1966**, *70*, 3798–3805, doi:10.1021/j100884a007.
2. Troy, R.C.; Margerum, D.W. Non-Metal Redox Kinetics: Hypobromite and Hypobromous Acid Reactions with Iodide and with Sulfite and the Hydrolysis of Bromosulfate. *Inorg. Chem.* **1991**, *30*, 3538–3543, doi:10.1021/ic00018a028.
3. Thomas, E.L. Lactoperoxidase-Catalyzed Oxidation of Thiocyanate: Equilibriums between Oxidized Forms of Thiocyanate. *Biochemistry* **1981**, *20*, 3273–3280, doi:10.1021/bi00514a045.
4. Zámocký, M.; Hofbauer, S.; Schaffner, I.; Gasselhuber, B.; Nicolussi, A.; Soudi, M.; Pirker, K.F.; Furtmüller, P.G.; Obinger, C. Independent Evolution of Four Heme Peroxidase Superfamilies. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **2015**, *574*, 108–119, doi:10.1016/j.abb.2014.12.025.
5. Sakamaki, K.; Kanda, N.; Ueda, T.; Aikawa, E.; Nagata, S. The Eosinophil Peroxidase Gene Forms a Cluster with the Genes for Myeloperoxidase and Lactoperoxidase on Human Chromosome 17. *Cytogenetic and Genome Research* **2000**, *88*, 246–248, doi:10.1159/000015529.
6. Cheng, G.; Salerno, J.C.; Cao, Z.; Pagano, P.J.; Lambeth, J.D. Identification and Characterization of VPO1, a New Animal Heme-Containing Peroxidase. *Free Radical Biology and Medicine* **2008**, *45*, 1682–1694, doi:10.1016/j.freeradbiomed.2008.09.009.
7. Ma, Q.-L.; Zhang, G.-G.; Peng, J. Vascular Peroxidase 1: A Novel Enzyme in Promoting Oxidative Stress in Cardiovascular System. *Trends in Cardiovascular Medicine* **2013**, *23*, 179–183, doi:10.1016/j.tcm.2012.11.002.
8. Huang, L.; Wojciechowski, G.; de Montellano, P.R.O. Role of Heme-Protein Covalent Bonds in Mammalian Peroxidases: Protection of the heme by a single engineered heme-protein link in horseradish peroxidase \*. *Journal of Biological Chemistry* **2006**, *281*, 18983–18988, doi:10.1074/jbc.M602307200.
9. Siraki, A.G. The Many Roles of Myeloperoxidase: From Inflammation and Immunity to Biomarkers, Drug Metabolism and Drug Discovery. *Redox Biology* **2021**, *46*, 102109, doi:10.1016/j.redox.2021.102109.
10. Agner, K. *Verdoperoxidase: A Ferment Isolated from Leucocytes*; Norstedt, 1941;
11. Zederbauer, M.; Furtmüller, P.G.; Brogioni, S.; Jakopitsch, C.; Smulevich, G.; Obinger, C. Heme to Protein Linkages in Mammalian Peroxidases: Impact on Spectroscopic, Redox and Catalytic Properties. *Nat. Prod. Rep.* **2007**, *24*, 571–584, doi:10.1039/B604178G.
12. Maehly, A.C. [142] Myeloperoxidase. In *Methods in Enzymology*; Academic Press, 1955; Vol. 2, pp. 794–801 ISBN 0076-6879.
13. Hansson, M.; Olsson, I.; Nauseef, W.M. Biosynthesis, Processing, and Sorting of Human Myeloperoxidase. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **2006**, *445*, 214–224, doi:10.1016/j.abb.2005.08.009.
14. Lefkowitz, D.L.; Lefkowitz, S.S. Microglia and Myeloperoxidase: A Deadly Partnership in Neurodegenerative Disease. *Free Radical Biology and Medicine* **2008**, *45*, 726–731, doi:10.1016/j.freeradbiomed.2008.05.021.
15. Davies, M.J.; Hawkins, C.L.; Pattison, D.I.; Rees, M.D. Mammalian Heme Peroxidases: From Molecular Mechanisms to Health Implications. *Antioxidants & Redox Signaling* **2008**, *10*, 1199–1234, doi:10.1089/ars.2007.1927.
16. Furtmüller, P.G.; Arnhold, J.; Jantschko, W.; Pichler, H.; Obinger, C. Redox Properties of the Couples Compound I/Compound II and Compound II/Native Enzyme of Human Myeloperoxidase. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **2003**, *301*, 551–557, doi:10.1016/S0006-291X(02)03075-9.

17. Kettle, A.J.; Gedye, C.A.; Winterbourn, C.C. Superoxide Is an Antagonist of Anti-Inflammatory Drugs That Inhibit Hypochlorous Acid Production by Myeloperoxidase. *Biochemical Pharmacology* **1993**, *45*, 2003–2010, doi:10.1016/0006-2952(93)90010-T.
18. Burner, U.; Krapfenbauer, G.; Furtmüller, P.G.; Regelsberger, G.; Obinger, C. Oxidation of Hydroquinone, 2,3-Dimethylhydroquinone and 2,3,5-Trimethylhydroquinone by Human Myeloperoxidase. *null* **2000**, *5*, 185–190, doi:10.1179/135100000101535735.
19. Kettle, A.J.; Robertson, I.G.C.; Palmer, B.D.; Anderson, R.F.; Patel, K.B.; Winterbourn, C.C. Oxidative Metabolism of Amsacrine by the Neutrophil Enzyme Myeloperoxidase. *Biochemical Pharmacology* **1992**, *44*, 1731–1738, doi:10.1016/0006-2952(92)90066-R.
20. van der Walt, B.J.; van Zyl, J.M.; Krieglner, A. Aromatic Hydroxylation during the Myeloperoxidase-Oxidase Oxidation of Hydrazines. *Biochemical Pharmacology* **1994**, *47*, 1039–1046, doi:10.1016/0006-2952(94)90415-4.
21. Kettle, A.J.; Winterbourn, C.C. Myeloperoxidase: A Key Regulator of Neutrophil Oxidant Production. *Redox Rep* **1997**, *3*, 3–15, doi:10.1080/13510002.1997.11747085.
22. Winterbourn, C.C.; Hampton, M.B.; Livesey, J.H.; Kettle, A.J. Modeling the Reactions of Superoxide and Myeloperoxidase in the Neutrophil Phagosome: Implications for microbial killing\*. *Journal of Biological Chemistry* **2006**, *281*, 39860–39869, doi:10.1074/jbc.M605898200.
23. Kettle, A.J.; Winterbourn, C.C. Superoxide Modulates the Activity of Myeloperoxidase and Optimizes the Production of Hypochlorous Acid. *Biochemical Journal* **1988**, *252*, 529–536, doi:10.1042/bj2520529.
24. Spalteholz, H.; Panasenko, O.M.; Arnhold, J. Formation of Reactive Halide Species by Myeloperoxidase and Eosinophil Peroxidase. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **2006**, *445*, 225–234, doi:10.1016/j.abb.2005.06.025.
25. Marquez, L.A.; Dunford, H.B. Chlorination of Taurine by Myeloperoxidase. Kinetic Evidence for an Enzyme-Bound Intermediate. *Journal of Biological Chemistry* **1994**, *269*, 7950–7956, doi:10.1016/S0021-9258(17)37143-0.
26. Senthilmohan, R.; Kettle, A.J. Bromination and Chlorination Reactions of Myeloperoxidase at Physiological Concentrations of Bromide and Chloride. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **2006**, *445*, 235–244, doi:10.1016/j.abb.2005.07.005.
27. van Dalen, C.J.; Whitehouse, M.W.; Winterbourn, C.C.; Kettle, A.J. Thiocyanate and Chloride as Competing Substrates for Myeloperoxidase. *Biochem J* **1997**, *327* ( Pt 2), 487–492, doi:10.1042/bj3270487.
28. Furtmüller, P.G.; Burner, U.; Obinger, C. Reaction of Myeloperoxidase Compound I with Chloride, Bromide, Iodide, and Thiocyanate. *Biochemistry* **1998**, *37*, 17923–17930, doi:10.1021/bi9818772.
29. Morgan, P.E.; Pattison, D.I.; Talib, J.; Summers, F.A.; Harmer, J.A.; Celermajer, D.S.; Hawkins, C.L.; Davies, M.J. High Plasma Thiocyanate Levels in Smokers Are a Key Determinant of Thiol Oxidation Induced by Myeloperoxidase. *Free Radical Biology and Medicine* **2011**, *51*, 1815–1822, doi:10.1016/j.freeradbiomed.2011.08.008.
30. Pattison, D.I.; Davies, M.J.; Hawkins, C.L. Reactions and Reactivity of Myeloperoxidase-Derived Oxidants: Differential Biological Effects of Hypochlorous and Hypothiocyanous Acids. *null* **2012**, *46*, 975–995, doi:10.3109/10715762.2012.667566.
31. Wilson, J. Cyanide in Human Disease: A Review of Clinical and Laboratory Evidence. *Fundam Appl Toxicol* **1983**, *3*, 397–399, doi:10.1016/s0272-0590(83)80011-6.
32. Vesey, C.J.; Cole, P. Blood Cyanide and Thiocyanate Concentrations Produced by Long-Term Therapy with Sodium Nitroprusside. *British journal of anaesthesia* *57* 2, 148–155.
33. Carlsson, L.; Mlingi, N.; Juma, A.; Ronquist, G.; Rosling, H. Metabolic Fates in Humans of Linamarin in Cassava Flour Ingested as Stiff Porridge. *Food and Chemical Toxicology* **1999**, *37*, 307–312, doi:10.1016/S0278-6915(99)00015-0.

34. Aminlari, M.; Malekhusseini, A.; Akrami, F.; Ebrahimnejad, H. Cyanide-Metabolizing Enzyme Rhodanese in Human Tissues: Comparison with Domestic Animals. *Comparative Clinical Pathology* **2007**, *16*, 47–51, doi:10.1007/s00580-006-0647-x.
35. Spagnolo, A.; Torsello, S.; Morisi, G.; Petrozzi, E.; Antonini, R.; Ricci, G.; Urbinati, G.C.; Menotti, A. Serum Thiocyanate Levels as an Objective Measure of Smoking Habits in Epidemiological Studies. *Eur J Epidemiol* **1988**, *4*, 206–211, doi:10.1007/BF00144753.
36. Nguyen, G.T.; Green, E.R.; Meccas, J. Neutrophils to the ROScues: Mechanisms of NADPH Oxidase Activation and Bacterial Resistance. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* **2017**, *7*.
37. Klebanoff Seymour J. Myeloperoxidase-Halide-Hydrogen Peroxide Antibacterial System. *Journal of Bacteriology* **1968**, *95*, 2131–2138, doi:10.1128/jb.95.6.2131-2138.1968.
38. Klebanoff, S.J. Myeloperoxidase: Contribution to the Microbicidal Activity of Intact Leukocytes. *Science* **1970**, *169*, 1095–1097, doi:10.1126/science.169.3950.1095.
39. Lanza, F. Clinical Manifestation of Myeloperoxidase Deficiency. *Journal of Molecular Medicine* **1998**, *76*, 676–681, doi:10.1007/s001090050267.
40. Lehrer, R.I.; Cline, M.J. Leukocyte Myeloperoxidase Deficiency and Disseminated Candidiasis: The Role of Myeloperoxidase in Resistance to Candida Infection. *J Clin Invest* **1969**, *48*, 1478–1488, doi:10.1172/JCI106114.
41. Kalinski, T.; Jentsch-Ullrich, K.; Fill, S.; König, B.; Costa, S.-D.; Roessner, A. Lethal Candida Sepsis Associated with Myeloperoxidase Deficiency and Pre-Eclampsia. *APMIS* **2007**, *115*, 875–880, doi:10.1111/j.1600-0463.2007.apm\_600.x.
42. McMillen, T.S.; Heinecke, J.W.; LeBoeuf, R.C. Expression of Human Myeloperoxidase by Macrophages Promotes Atherosclerosis in Mice. *Circulation* **2005**, *111*, 2798–2804, doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.104.516278.
43. Sugiyama, S.; Okada, Y.; Sukhova, G.K.; Virmani, R.; Heinecke, J.W.; Libby, P. Macrophage Myeloperoxidase Regulation by Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor in Human Atherosclerosis and Implications in Acute Coronary Syndromes. *Am J Pathol* **2001**, *158*, 879–891, doi:10.1016/S0002-9440(10)64036-9.
44. Okada, S.S.; de Oliveira, E.M.; de Araújo, T.H.; Rodrigues, M.R.; Albuquerque, R.C.; Mortara, R.A.; Taniwaki, N.N.; Nakaya, H.I.; Campa, A.; Moreno, A.C.R. Myeloperoxidase in Human Peripheral Blood Lymphocytes: Production and Subcellular Localization. *Cellular Immunology* **2016**, *300*, 18–25, doi:10.1016/j.cellimm.2015.11.003.
45. Green, P.S.; Mendez, A.J.; Jacob, J.S.; Crowley, J.R.; Growdon, W.; Hyman, B.T.; Heinecke, J.W. Neuronal Expression of Myeloperoxidase Is Increased in Alzheimer's Disease. *Journal of Neurochemistry* **2004**, *90*, 724–733, doi:10.1111/j.1471-4159.2004.02527.x.
46. Nagra, R.M.; Becher, B.; Tourtellotte, W.W.; Antel, J.P.; Gold, D.; Paladino, T.; Smith, R.A.; Nelson, J.R.; Reynolds, W.F. Immunohistochemical and Genetic Evidence of Myeloperoxidase Involvement in Multiple Sclerosis. *Journal of Neuroimmunology* **1997**, *78*, 97–107, doi:10.1016/S0165-5728(97)00089-1.
47. Reynolds, W.F.; Rhee, J.; Maciejewski, D.; Paladino, T.; Sieburg, H.; Maki, R.A.; Masliah, E. Myeloperoxidase Polymorphism Is Associated with Gender Specific Risk for Alzheimer's Disease. *Experimental Neurology* **1999**, *155*, 31–41, doi:10.1006/exnr.1998.6977.
48. Arnhold, J.; Monzani, E.; Furtmüller, P.G.; Zederbauer, M.; Casella, L.; Obinger, C. Kinetics and Thermodynamics of Halide and Nitrite Oxidation by Mammalian Heme Peroxidases. *European Journal of Inorganic Chemistry* **2006**, *2006*, 3801–3811, doi:10.1002/ejic.200600436.
49. Pattison, I.D.; Davies, J.M. Reactions of Myeloperoxidase-Derived Oxidants with Biological Substrates: Gaining Chemical Insight into Human Inflammatory Diseases. *Current Medicinal Chemistry* **2006**, *13*, 3271–3290, doi:10.2174/092986706778773095.

50. Pattison, D.I.; Davies, M.J. Absolute Rate Constants for the Reaction of Hypochlorous Acid with Protein Side Chains and Peptide Bonds. *Chem. Res. Toxicol.* **2001**, *14*, 1453–1464, doi:10.1021/tx0155451.
51. Armesto, X.L.; Canle L, M.; Fernández, M.I.; García, M.V.; Santaballa, J.A. First Steps in the Oxidation of Sulfur-Containing Amino Acids by Hypohalogenation: Very Fast Generation of Intermediate Sulfenyl Halides and Halosulfonium Cations. *Tetrahedron* **2000**, *56*, 1103–1109, doi:10.1016/S0040-4020(99)01066-2.
52. Peskin, A.V.; Winterbourn, C.C. Kinetics of the Reactions of Hypochlorous Acid and Amino Acid Chloramines with Thiols, Methionine, and Ascorbate. *Free Radical Biology and Medicine* **2001**, *30*, 572–579, doi:10.1016/S0891-5849(00)00506-2.
53. Hawkins, C.L.; Pattison, D.I.; Davies, M.J. Hypochlorite-Induced Oxidation of Amino Acids, Peptides and Proteins. *Amino Acids* **2003**, *25*, 259–274, doi:10.1007/s00726-003-0016-x.
54. Droz`d`Z, R.; Naskalski, J.W.; Sznajd, J. Oxidation of Amino Acids and Peptides in Reaction with Myeloperoxidase, Chloride and Hydrogen Peroxide. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology* **1988**, *957*, 47–52, doi:10.1016/0167-4838(88)90155-0.
55. Rhee, S.G.; Jeong, W.; Chang, T.-S.; Woo, H.A. Sulfiredoxin, the Cysteine Sulfinic Acid Reductase Specific to 2-Cys Peroxiredoxin: Its Discovery, Mechanism of Action, and Biological Significance. *Kidney International* **2007**, *72*, S3–S8, doi:10.1038/sj.ki.5002380.
56. Fu, X.; Mueller, D.M.; Heinecke, J.W. Generation of Intramolecular and Intermolecular Sulfenamides, Sulfinamides, and Sulfonamides by Hypochlorous Acid: A Potential Pathway for Oxidative Cross-Linking of Low-Density Lipoprotein by Myeloperoxidase. *Biochemistry* **2002**, *41*, 1293–1301, doi:10.1021/bi015777z.
57. Raftery, M.J.; Yang, Z.; Valenzuela, S.M.; Geczy, C.L. Novel Intra- and Inter-Molecular Sulfinamide Bonds in S100A8 Produced by Hypochlorite Oxidation\*. *Journal of Biological Chemistry* **2001**, *276*, 33393–33401, doi:10.1074/jbc.M101566200.
58. Winterbourn, C.C.; Brennan, S.O. Characterization of the Oxidation Products of the Reaction between Reduced Glutathione and Hypochlorous Acid. *Biochemical Journal* **1997**, *326*, 87–92, doi:10.1042/bj3260087.
59. Davies, M.J.; Hawkins, C.L. Hypochlorite-Induced Oxidation of Thiols: Formation of Thiyl Radicals and the Role of Sulfenyl Chlorides as Intermediates. *null* **2000**, *33*, 719–729, doi:10.1080/10715760000301241.
60. Khor, H.K.; Fisher, M.T.; Schöneich, C. Potential Role of Methionine Sulfoxide in the Inactivation of the Chaperone GroEL by Hypochlorous Acid (HOCl) and Peroxynitrite (ONOO<sup>-</sup>) \*. *Journal of Biological Chemistry* **2004**, *279*, 19486–19493, doi:10.1074/jbc.M310045200.
61. Beal, J.L.; Foster, S.B.; Ashby, M.T. Hypochlorous Acid Reacts with the N-Terminal Methionines of Proteins To Give Dehydromethionine, a Potential Biomarker for Neutrophil-Induced Oxidative Stress. *Biochemistry* **2009**, *48*, 11142–11148, doi:10.1021/bi901343d.
62. L. Armesto, X.; Canle L., M.; V. García, M.; A. Santaballa, J. Aqueous Chemistry of N-Halo-Compounds. *Chem. Soc. Rev.* **1998**, *27*, 453–460, doi:10.1039/A827453Z.
63. Prütz, W.A. Interactions of Hypochlorous Acid with Pyrimidine Nucleotides, and Secondary Reactions of Chlorinated Pyrimidines with GSH, NADH, and Other Substrates. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **1998**, *349*, 183–191, doi:10.1006/abbi.1997.0440.
64. Prütz, W.A. Hypochlorous Acid Interactions with Thiols, Nucleotides, DNA, and Other Biological Substrates. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **1996**, *332*, 110–120, doi:10.1006/abbi.1996.0322.

65. Rees, M.D.; Pattison, D.I.; Davies, M.J. Oxidation of Heparan Sulphate by Hypochlorite: Role of N-Chloro Derivatives and Dichloramine-Dependent Fragmentation. *Biochem J* **2005**, *391*, 125–134, doi:10.1042/BJ20050630.
66. Pattison, D.I.; Hawkins, C.L.; Davies, M.J. Hypochlorous Acid-Mediated Oxidation of Lipid Components and Antioxidants Present in Low-Density Lipoproteins: Absolute Rate Constants, Product Analysis, and Computational Modeling. *Chem. Res. Toxicol.* **2003**, *16*, 439–449, doi:10.1021/tx025670s.
67. Anderson, M.M.; Hazen, S.L.; Hsu, F.F.; Heinecke, J.W. Human Neutrophils Employ the Myeloperoxidase-Hydrogen Peroxide-Chloride System to Convert Hydroxy-Amino Acids into Glycolaldehyde, 2-Hydroxypropanal, and Acrolein. A Mechanism for the Generation of Highly Reactive Alpha-Hydroxy and Alpha,Beta-Unsaturated Aldehydes by Phagocytes at Sites of Inflammation. *J Clin Invest* **1997**, *99*, 424–432, doi:10.1172/JCI119176.
68. Armesto, X.L.; Canle, M.L.; Santaballa, J.A.  $\alpha$ -Amino Acids Chlorination in Aqueous Media. *Tetrahedron* **1993**, *49*, 275–284, doi:10.1016/S0040-4020(01)80525-1.
69. Hawkins, C.L.; Davies, M.J. Hypochlorite-Induced Damage to Proteins: Formation of Nitrogen-Centred Radicals from Lysine Residues and Their Role in Protein Fragmentation. *Biochem J* **1998**, *332* ( Pt 3), 617–625, doi:10.1042/bj3320617.
70. L. Hawkins, C.; J. Davies, M. Reaction of HOCl with Amino Acids and Peptides: EPR Evidence for Rapid Rearrangement and Fragmentation Reactions of Nitrogen-Centred Radicals. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2* **1998**, 1937–1946, doi:10.1039/A802949K.
71. van den Berg, J.; Winterbourn, C. [64] Measurement of Reaction Products from Hypochlorous Acid and Unsaturated Lipids. In *Methods in Enzymology*; Academic Press, 1994; Vol. 233, pp. 639–649 ISBN 0076-6879.
72. Albrich, J.M.; McCarthy, C.A.; Hurst, J.K. Biological Reactivity of Hypochlorous Acid: Implications for Microbicidal Mechanisms of Leukocyte Myeloperoxidase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1981**, *78*, 210–214, doi:10.1073/pnas.78.1.210.
73. Prütz, W.A. Reactions of Hypochlorous Acid with Biological Substrates Are Activated Catalytically by Tertiary Amines. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **1998**, *357*, 265–273, doi:10.1006/abbi.1998.0822.
74. Panasenko, O.M.; Amhold, J.; Schiller, J.; Arnold, K.; Sergienko, V.I. Peroxidation of Egg Yolk Phosphatidylcholine Liposomes by Hypochlorous Acid. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Lipids and Lipid Metabolism* **1994**, *1215*, 259–266, doi:10.1016/0005-2760(94)90051-5.
75. Skaff, O.; Pattison, D.I.; Davies, M.J. The Vinyl Ether Linkages of Plasmalogens Are Favored Targets for Myeloperoxidase-Derived Oxidants: A Kinetic Study. *Biochemistry* **2008**, *47*, 8237–8245, doi:10.1021/bi800786q.
76. Thukkani, A.K.; Hsu, F.-F.; Crowley, J.R.; Wysolmerski, R.B.; Albert, C.J.; Ford, D.A. Reactive Chlorinating Species Produced during Neutrophil Activation Target Tissue Plasmalogens: Production of the chemoattractant, 2-chlorohexadecanal \*. *Journal of Biological Chemistry* **2002**, *277*, 3842–3849, doi:10.1074/jbc.M109489200.
77. Dellegar, S.M.; Murphy, S.A.; Bourne, A.E.; DiCesare, J.C.; Purser, G.H. Identification of the Factors Affecting the Rate of Deactivation of Hypochlorous Acid by Melatonin. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **1999**, *257*, 431–439, doi:10.1006/bbrc.1999.0438.
78. Prütz, W.A.; Kissner, R.; Nauser, T.; Koppenol, W.H. On the Oxidation of Cytochrome c by Hypohalous Acids. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **2001**, *389*, 110–122, doi:10.1006/abbi.2001.2321.
79. Pattison, D.I.; Davies, M.J. Kinetic Analysis of the Role of Histidine Chloramines in Hypochlorous Acid Mediated Protein Oxidation. *Biochemistry* **2005**, *44*, 7378–7387, doi:10.1021/bi0474665.

80. Prütz, W.A. Consecutive Halogen Transfer between Various Functional Groups Induced by Reaction of Hypohalous Acids: NADH Oxidation by Halogenated Amide Groups. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **1999**, *371*, 107–114, doi:10.1006/abbi.1999.1377.
81. Prütz, W.A.; Kissner, R.; Koppenol, W.H.; Rügger, H. On the Irreversible Destruction of Reduced Nicotinamide Nucleotides by Hypohalous Acids. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **2000**, *380*, 181–191, doi:10.1006/abbi.2000.1914.
82. Peskin, A.V.; Winterbourn, C.C. Histamine Chloramine Reactivity with Thiol Compounds, Ascorbate, and Methionine and with Intracellular Glutathione. *Free Radical Biology and Medicine* **2003**, *35*, 1252–1260, doi:10.1016/S0891-5849(03)00502-1.
83. Peskina, A.V.; Midwinter, R.G.; Harwood, D.T.; Winterbourn, C.C. Chlorine Transfer between Glycine, Taurine, and Histamine: Reaction Rates and Impact on Cellular Reactivity. *Free Radical Biology and Medicine* **2005**, *38*, 397–405, doi:10.1016/j.freeradbiomed.2004.11.006.
84. Bergt, C.; Fu, X.; Huq, N.P.; Kao, J.; Heinecke, J.W. Lysine Residues Direct the Chlorination of Tyrosines in YXXK Motifs of Apolipoprotein A-I When Hypochlorous Acid Oxidizes High Density Lipoprotein\*. *Journal of Biological Chemistry* **2004**, *279*, 7856–7866, doi:10.1074/jbc.M309046200.
85. Pattison, D.I.; Davies, M.J. Evidence for Rapid Inter- and Intramolecular Chlorine Transfer Reactions of Histamine and Carnosine Chloramines: Implications for the Prevention of Hypochlorous-Acid-Mediated Damage. *Biochemistry* **2006**, *45*, 8152–8162, doi:10.1021/bi060348s.
86. Marcinkiewicz, J.; Kontny, E. Taurine and Inflammatory Diseases. *Amino Acids* **2014**, *46*, 7–20, doi:10.1007/s00726-012-1361-4.
87. Huang, H.; Li, Y.; Liang, J.; Finkelman, F.D. Molecular Regulation of Histamine Synthesis. *Frontiers in Immunology* **2018**, *9*.
88. Jukić, I.; Kolobarić, N.; Stupin, A.; Matić, A.; Kozina, N.; Mihaljević, Z.; Mihalj, M.; Šušnjara, P.; Stupin, M.; Ćurić, Ž.B.; et al. Carnosine, Small but Mighty-Prospect of Use as Functional Ingredient for Functional Food Formulation. *Antioxidants (Basel)* **2021**, *10*, 1037, doi:10.3390/antiox10071037.
89. Pattison, D.I.; Davies, M.J. Kinetic Analysis of the Reactions of Hypobromous Acid with Protein Components: Implications for Cellular Damage and Use of 3-Bromotyrosine as a Marker of Oxidative Stress. *Biochemistry* **2004**, *43*, 4799–4809, doi:10.1021/bi035946a.
90. Nagy, P.; Jameson, G.N.L.; Winterbourn, C.C. Kinetics and Mechanisms of the Reaction of Hypothiocyanous Acid with 5-Thio-2-Nitrobenzoic Acid and Reduced Glutathione. *Chem. Res. Toxicol.* **2009**, *22*, 1833–1840, doi:10.1021/tx900249d.
91. Skaff, O.; Pattison, D.I.; Davies, M.J. Hypothiocyanous Acid Reactivity with Low-Molecular-Mass and Protein Thiols: Absolute Rate Constants and Assessment of Biological Relevance. *Biochem J* **2009**, *422*, 111–117, doi:10.1042/BJ20090276.
92. Skaff, O.; Pattison, D.I.; Morgan, P.E.; Bachana, R.; Jain, V.K.; Priyadarsini, K.I.; Davies, M.J. Selenium-Containing Amino Acids Are Targets for Myeloperoxidase-Derived Hypothiocyanous Acid: Determination of Absolute Rate Constants and Implications for Biological Damage. *Biochem J* **2012**, *441*, 305–316, doi:10.1042/BJ20101762.
93. Nagy, P.; Ashby, M.T. Reactive Sulfur Species: Kinetics and Mechanisms of the Oxidation of Cysteine by Hypohalous Acid to Give Cysteine Sulfenic Acid. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 14082–14091, doi:10.1021/ja0737218.
94. Barrett, T.J.; Pattison, D.I.; Leonard, S.E.; Carroll, K.S.; Davies, M.J.; Hawkins, C.L. Inactivation of Thiol-Dependent Enzymes by Hypothiocyanous Acid: Role of Sulfenyl Thiocyanate and Sulfenic Acid Intermediates. *Free Radical Biology and Medicine* **2012**, *52*, 1075–1085, doi:10.1016/j.freeradbiomed.2011.12.024.

95. Thomas, E.L. Lactoperoxidase-Catalyzed Oxidation of Thiocyanate: Equilibria between Oxidized Forms of Thiocyanate. *Biochemistry* **1981**, *20*, 3273–3280, doi:10.1021/bi00514a045.
96. Hawkins, C.L.; Pattison, D.I.; Stanley, N.R.; Davies, M.J. Tryptophan Residues Are Targets in Hypothiocyanous Acid-Mediated Protein Oxidation. *Biochemical Journal* **2008**, *416*, 441–452, doi:10.1042/BJ20070941.
97. Aune, T.M.; Thomas, E.L.; Morrison, M. Lactoperoxidase-Catalyzed Incorporation of Thiocyanate Ion into a Protein Substrate. *Biochemistry* **1977**, *16*, 4611–4615, doi:10.1021/bi00640a013.
98. Vissers, M.C.M.; Winterbourn, C.C. Oxidative Damage to Fibronectin: I. The Effects of the Neutrophil Myeloperoxidase System and HOCl. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **1991**, *285*, 53–59, doi:10.1016/0003-9861(91)90327-F.
99. Davies, J.M.S.; Horwitz, D.A.; Davies, K.J.A. Potential Roles of Hypochlorous Acid and N-Chloroamines in Collagen Breakdown by Phagocytic Cells in Synovitis. *Free Radical Biology and Medicine* **1993**, *15*, 637–643, doi:10.1016/0891-5849(93)90167-S.
100. O’Connell, A.M.; Gieseg, S.P.; Stanley, K.K. Hypochlorite Oxidation Causes Cross-Linking of Lp(a). *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease* **1994**, *1225*, 180–186, doi:10.1016/0925-4439(94)90076-0.
101. Hazell, L.J.; van den Berg, J.J.; Stocker, R. Oxidation of Low-Density Lipoprotein by Hypochlorite Causes Aggregation That Is Mediated by Modification of Lysine Residues Rather than Lipid Oxidation. *Biochem J* **1994**, *302* ( Pt 1), 297–304, doi:10.1042/bj3020297.
102. Clark, R.A.; Szot, S.; Williams, M.A.; Kagan, H.M. Oxidation of Lysine Side-Chains of Elastin by the Myeloperoxidase System and by Stimulated Human Neutrophils. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **1986**, *135*, 451–457, doi:10.1016/0006-291X(86)90015-X.
103. Drożdż, R.; Guevara, I.; Naskalski, J.W. Immunoglobulin Cleavage by Hypochlorous Acid Treatment. *Clinica Chimica Acta* **1995**, *236*, 155–160, doi:10.1016/0009-8981(95)06048-I.
104. Ashby, M.T.; Carlson, A.C.; Scott, M.J. Redox Buffering of Hypochlorous Acid by Thiocyanate in Physiologic Fluids. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 15976–15977, doi:10.1021/ja0438361.
105. Nagy, P.; Beal, J.L.; Ashby, M.T. Thiocyanate Is an Efficient Endogenous Scavenger of the Phagocytic Killing Agent Hypobromous Acid. *Chem. Res. Toxicol.* **2006**, *19*, 587–593, doi:10.1021/tx050338c.
106. Frangie, C.; Daher, J. Role of Myeloperoxidase in Inflammation and Atherosclerosis (Review). *Biomed Rep* **2022**, *16*, 53, doi:10.3892/br.2022.1536.
107. Chaikijurajai, T.; Tang, W.H.W. Myeloperoxidase: A Potential Therapeutic Target for Coronary Artery Disease. *null* **2020**, *24*, 695–705, doi:10.1080/14728222.2020.1762177.
108. Smyth, L.C.D.; Murray, H.C.; Hill, M.; van Leeuwen, E.; Highet, B.; Magon, N.J.; Osanlouy, M.; Mathiesen, S.N.; Mockett, B.; Singh-Bains, M.K.; et al. Neutrophil-Vascular Interactions Drive Myeloperoxidase Accumulation in the Brain in Alzheimer’s Disease. *Acta Neuropathologica Communications* **2022**, *10*, 38, doi:10.1186/s40478-022-01347-2.
109. Gellhaar, S.; Sunnemark, D.; Eriksson, H.; Olson, L.; Galter, D. Myeloperoxidase-Immunoreactive Cells Are Significantly Increased in Brain Areas Affected by Neurodegeneration in Parkinson’s and Alzheimer’s Disease. *Cell and Tissue Research* **2017**, *369*, 445–454, doi:10.1007/s00441-017-2626-8.
110. Zhang, N.; Aiyasiding, X.; Li, W.; Liao, H.; Tang, Q. Neutrophil Degranulation and Myocardial Infarction. *Cell Communication and Signaling* **2022**, *20*, 50, doi:10.1186/s12964-022-00824-4.

111. Wang, Y.-C.; Lu, Y.-B.; Huang, X.-L.; Lao, Y.-F.; Zhang, L.; Yang, J.; Shi, M.; Ma, H.-L.; Pan, Y.-W.; Zhang, Y.-N. Myeloperoxidase: A New Target for the Treatment of Stroke? *Neural Regeneration Research* **2022**, *17*.
112. Fernandes, R.M.S.N.; Silva, N.P. da; Sato, E.I. Increased Myeloperoxidase Plasma Levels in Rheumatoid Arthritis. *Rheumatology International* **2012**, *32*, 1605–1609, doi:10.1007/s00296-011-1810-5.
113. Wang, Z.; DiDonato, J.A.; Buffa, J.; Comhair, S.A.; Aronica, M.A.; Dweik, R.A.; Lee, N.A.; Lee, J.J.; Thomassen, M.J.; Kavuru, M.; et al. Eosinophil Peroxidase Catalyzed Protein Carbamylation Participates in Asthma\*. *Journal of Biological Chemistry* **2016**, *291*, 22118–22135, doi:10.1074/jbc.M116.750034.
114. Zhu, A.; Ge, D.; Zhang, J.; Teng, Y.; Yuan, C.; Huang, M.; Adcock, I.M.; Barnes, P.J.; Yao, X. Sputum Myeloperoxidase in Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *European Journal of Medical Research* **2014**, *19*, 12, doi:10.1186/2047-783X-19-12.
115. Mika, D.; Guruvayoorappan, C. Myeloperoxidase: The Yin and Yang in Tumour Progression. *J Exp Ther Oncol* **2011**, *9*, 93–100.
116. Churg, A.; Marshall, C.V.; Sin, D.D.; Bolton, S.; Zhou, S.; Thain, K.; Cadogan, E.B.; Maltby, J.; Soars, M.G.; Mallinder, P.R.; et al. Late Intervention with a Myeloperoxidase Inhibitor Stops Progression of Experimental Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Am J Respir Crit Care Med* **2012**, *185*, 34–43, doi:10.1164/rccm.201103-0468OC.
117. Zheng, W.; Warner, R.; Ruggeri, R.; Su, C.; Cortes, C.; Skoura, A.; Ward, J.; Ahn, K.; Kalgutkar, A.; Sun, D.; et al. PF-1355, a Mechanism-Based Myeloperoxidase Inhibitor, Prevents Immune Complex Vasculitis and Anti-Glomerular Basement Membrane Glomerulonephritis. *J Pharmacol Exp Ther* **2015**, *353*, 288, doi:10.1124/jpet.114.221788.
118. Liu, C.; Desikan, R.; Ying, Z.; Gushchina, L.; Kampfrath, T.; Deiuliis, J.; Wang, A.; Xu, X.; Zhong, J.; Rao, X.; et al. Effects of a Novel Pharmacologic Inhibitor of Myeloperoxidase in a Mouse Atherosclerosis Model. *PLOS ONE* **2012**, *7*, e50767, doi:10.1371/journal.pone.0050767.
119. Gan, L.-M.; Lagerström-Fermér, M.; Ericsson, H.; Nelander, K.; Lindstedt, E.-L.; Michaëlsson, E.; Kjaer, M.; Heijer, M.; Whatling, C.; Fuhr, R. Safety, Tolerability, Pharmacokinetics and Effect on Serum Uric Acid of the Myeloperoxidase Inhibitor AZD4831 in a Randomized, Placebo-Controlled, Phase I Study in Healthy Volunteers. *British Journal of Clinical Pharmacology* **2019**, *85*, 762–770, doi:10.1111/bcp.13855.
120. Gray, M.J.; Wholey, W.-Y.; Jakob, U. Bacterial Responses to Reactive Chlorine Species. *Annu. Rev. Microbiol.* **2013**, *67*, 141–160, doi:10.1146/annurev-micro-102912-142520.
121. Vissers, M.C.; Pullar, J.M.; Hampton, M.B. Hypochlorous Acid Causes Caspase Activation and Apoptosis or Growth Arrest in Human Endothelial Cells. *Biochem J* **1999**, *344 Pt 2*, 443–449.
122. Sugiyama, S.; Kugiyama, K.; Aikawa, M.; Nakamura, S.; Ogawa, H.; Libby, P. Hypochlorous Acid, a Macrophage Product, Induces Endothelial Apoptosis and Tissue Factor Expression. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* **2004**, *24*, 1309–1314, doi:10.1161/01.ATV.0000131784.50633.4f.
123. Yap, Y.W.; Whiteman, M.; Bay, B.H.; Li, Y.; Sheu, F.-S.; Qi, R.Z.; Tan, C.H.; Cheung, N.S. Hypochlorous Acid Induces Apoptosis of Cultured Cortical Neurons through Activation of Calpains and Rupture of Lysosomes. *Journal of Neurochemistry* **2006**, *98*, 1597–1609, doi:10.1111/j.1471-4159.2006.03996.x.
124. Vissers, C.M.M.; Carr, C.A.; Chapman, L.P.A. Comparison of Human Red Cell Lysis by Hypochlorous and Hypobromous Acids: Insights into the Mechanism of Lysis. *Biochemical Journal* **1998**, *330*, 131–138, doi:10.1042/bj3300131.
125. Schraufstätter, I.U.; Browne, K.; Harris, A.; Hyslop, P.A.; Jackson, J.H.; Quehenberger, O.; Cochrane, C.G. Mechanisms of Hypochlorite Injury of Target Cells. *J Clin Invest* **1990**, *85*, 554–562, doi:10.1172/JCI114472.



126. Pullar, J.M.; Winterbourn, C.C.; Vissers, M.C.M. Loss of GSH and Thiol Enzymes in Endothelial Cells Exposed to Sublethal Concentrations of Hypochlorous Acid. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* **1999**, *277*, H1505–H1512, doi:10.1152/ajpheart.1999.277.4.H1505.
127. Whiteman, M.; Rose, P.; Siau, J.L.; Halliwell, B. Nitrite-Mediated Protection against Hypochlorous Acid-Induced Chondrocyte Toxicity: A Novel Cytoprotective Role of Nitric Oxide in the Inflamed Joint? *Arthritis & Rheumatism* **2003**, *48*, 3140–3150, doi:10.1002/art.11284.
128. Whiteman, M.; Rose, P.; Siau, J.L.; Cheung, N.S.; Tan, G.S.; Halliwell, B.; Armstrong, J.S. Hypochlorous Acid-Mediated Mitochondrial Dysfunction and Apoptosis in Human Hepatoma HepG2 and Human Fetal Liver Cells: Role of Mitochondrial Permeability Transition. *Free Radical Biology and Medicine* **2005**, *38*, 1571–1584, doi:10.1016/j.freeradbiomed.2005.02.030.
129. Yang, Y.T.; Whiteman, M.; Gieseg, S.P. HOCl Causes Necrotic Cell Death in Human Monocyte Derived Macrophages through Calcium Dependent Calpain Activation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* **2012**, *1823*, 420–429, doi:10.1016/j.bbamcr.2011.09.019.
130. Peskin, A.V.; Winterbourn, C.C. Taurine Chloramine Is More Selective than Hypochlorous Acid at Targeting Critical Cysteines and Inactivating Creatine Kinase and Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase. *Free Radical Biology and Medicine* **2006**, *40*, 45–53, doi:10.1016/j.freeradbiomed.2005.08.019.
131. Vissers, M.C.M.; Lee, W.-G.; Hampton, M.B. Regulation of Apoptosis by Vitamin C: Specific protection of the apoptotic machinery against exposure to chlorinated oxidants \*. *Journal of Biological Chemistry* **2001**, *276*, 46835–46840, doi:10.1074/jbc.M107664200.
132. Lloyd, M.M.; Grima, M.A.; Rayner, B.S.; Hadfield, K.A.; Davies, M.J.; Hawkins, C.L. Comparative Reactivity of the Myeloperoxidase-Derived Oxidants Hypochlorous Acid and Hypothiocyanous Acid with Human Coronary Artery Endothelial Cells. *Free Radical Biology and Medicine* **2013**, *65*, 1352–1362, doi:10.1016/j.freeradbiomed.2013.10.007.
133. Guo, C.; Davies, M.J.; Hawkins, C.L. Role of Thiocyanate in the Modulation of Myeloperoxidase-Derived Oxidant Induced Damage to Macrophages. *Redox Biology* **2020**, *36*, 101666, doi:10.1016/j.redox.2020.101666.
134. Freund, E.; Miebach, L.; Stope, M., B.; Bekeschus, S. Hypochlorous Acid Selectively Promotes Toxicity and the Expression of Danger Signals in Human Abdominal Cancer Cells. *Oncol Rep* **2021**, *45*, 71, doi:10.3892/or.2021.8022.
135. Konno, N.; Kako, K.J. Effects of Hydrogen Peroxide and Hypochlorite on Membrane Potential of Mitochondria in Situ in Rat Heart Cells. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* **1991**, *69*, 1705–1712, doi:10.1139/y91-253.
136. Costantini, P.; Chernyak, B.V.; Petronilli, V.; Bernardi, P. Modulation of the Mitochondrial Permeability Transition Pore by Pyridine Nucleotides and Dithiol Oxidation at Two Separate Sites (\*). *Journal of Biological Chemistry* **1996**, *271*, 6746–6751, doi:10.1074/jbc.271.12.6746.
137. Costantini, P.; Belzacq, A.-S.; Vieira, H.L.; Larochette, N.; de Pablo, M.A.; Zamzami, N.; Susin, S.A.; Brenner, C.; Kroemer, G. Oxidation of a Critical Thiol Residue of the Adenine Nucleotide Translocator Enforces Bcl-2-Independent Permeability Transition Pore Opening and Apoptosis. *Oncogene* **2000**, *19*, 307–314, doi:10.1038/sj.onc.1203299.
138. Halestrap, A.P.; McStay, G.P.; Clarke, S.J. The Permeability Transition Pore Complex: Another View. *Biochimie* **2002**, *84*, 153–166, doi:10.1016/S0300-9084(02)01375-5.
139. Kowaltowski, A.J.; Castilho, R.F.; Vercesi, A.E. Mitochondrial Permeability Transition and Oxidative Stress. *FEBS Letters* **2001**, *495*, 12–15, doi:10.1016/S0014-5793(01)02316-X.

140. Choi, I.-Y.; Lim, J.-H.; Kim, C.; Song, H.Y.; Ju, C.; Kim, W.-K. 4-Hydroxy-2(E)-Nonenal Facilitates NMDA-Induced Neurotoxicity via Triggering Mitochondrial Permeability Transition Pore Opening and Mitochondrial Calcium Overload. *Exp Neurobiol* **2013**, *22*, 200–207, doi:10.5607/en.2013.22.3.200.
141. Kristal, B.S.; Park, B.K.; Yu, B.P. 4-Hydroxyhexenal Is a Potent Inducer of the Mitochondrial Permeability Transition (\*). *Journal of Biological Chemistry* **1996**, *271*, 6033–6038, doi:10.1074/jbc.271.11.6033.
142. Yan, L.-J.; Sohal, R.S. Mitochondrial Adenine Nucleotide Translocase Is Modified Oxidatively during Aging. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **1998**, *95*, 12896–12901, doi:10.1073/pnas.95.22.12896.
143. Whiteman, M.; Chu, S.H.; Siau, J.L.; Rose, P.; Sabapathy, K.; Schantz, J.-T.; Cheung, N.S.; Spencer, J.P.E.; Armstrong, J.S. The Pro-Inflammatory Oxidant Hypochlorous Acid Induces Bax-Dependent Mitochondrial Permeabilisation and Cell Death through AIF-/EndoG-Dependent Pathways. *Cellular Signalling* **2007**, *19*, 705–714, doi:10.1016/j.cellsig.2006.08.019.
144. Kluck, R.M.; Ellerby, L.M.; Ellerby, H.M.; Naiem, S.; Yaffe, M.P.; Margoliash, E.; Bredesen, D.; Mauk, A.G.; Sherman, F.; Newmeyer, D.D. Determinants of Cytochrome c Pro-Apoptotic Activity: The role of lysine 72 trimethylation \*. *Journal of Biological Chemistry* **2000**, *275*, 16127–16133, doi:10.1074/jbc.275.21.16127.
145. Chen, Y.-R.; Chen, C.-L.; Liu, X.; Li, H.; Zweier, J.L.; Mason, R.P. Involvement of Protein Radical, Protein Aggregation, and Effects on NO Metabolism in the Hypochlorite-Mediated Oxidation of Mitochondrial Cytochrome c. *Free Radical Biology and Medicine* **2004**, *37*, 1591–1603, doi:10.1016/j.freeradbiomed.2004.07.013.
146. Eley, D.W.; Eley, J.M.; Korecky, B.; Fliss, H. Impairment of Cardiac Contractility and Sarcoplasmic Reticulum Ca<sup>2+</sup> ATPase Activity by Hypochlorous Acid: Reversal by Dithiothreitol. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* **1991**, *69*, 1677–1685, doi:10.1139/y91-249.
147. Favero, T.G.; Colter, D.; Hooper, P.F.; Abramson, J.J. Hypochlorous Acid Inhibits Ca<sup>2+</sup>-ATPase from Skeletal Muscle Sarcoplasmic Reticulum. *Journal of Applied Physiology* **1998**, *84*, 425–430, doi:10.1152/jappl.1998.84.2.425.
148. Štrosová, M.; Škuciová, M.; Horáková, L. Oxidative Damage to Ca<sup>2+</sup>-ATPase Sarcoplasmic Reticulum by HOCl and Protective Effect of Some Antioxidants. *BioFactors* **2005**, *24*, 111–116, doi:10.1002/biof.5520240113.
149. Campbell, D.L.; Stamler, J.S.; Strauss, H.C. Redox Modulation of L-Type Calcium Channels in Ferret Ventricular Myocytes. Dual Mechanism Regulation by Nitric Oxide and S-Nitrosothiols. *J Gen Physiol* **1996**, *108*, 277–293, doi:10.1085/jgp.108.4.277.
150. Sun, J.; Xu, L.; Eu, J.P.; Stamler, J.S.; Meissner, G. Classes of Thiols That Influence the Activity of the Skeletal Muscle Calcium Release Channel \*. *Journal of Biological Chemistry* **2001**, *276*, 15625–15630, doi:10.1074/jbc.M100083200.
151. Favero, T.G.; Webb, J.; Papiez, M.; Fisher, E.; Trippichio, R.J.; Broide, M.; Abramson, J.J. Hypochlorous Acid Modifies Calcium Release Channel Function from Skeletal Muscle Sarcoplasmic Reticulum. *Journal of Applied Physiology* **2003**, *94*, 1387–1394, doi:10.1152/japplphysiol.00645.2002.
152. Antipenko, A.Y.; Kirchberger, M.A. Membrane Phosphorylation Protects the Cardiac Sarcoplasmic Reticulum Ca<sup>2+</sup>-ATPase against Chlorinated Oxidants in Vitro. *Cardiovascular Research* **1997**, *36*, 67–77, doi:10.1016/S0008-6363(97)00183-1.
153. Strosova, M.; Karlovska, J.; Spickett, C.M.; Grune, T.; Orszagova, Z.; Horakova, L. Oxidative Injury Induced by Hypochlorous Acid to Ca-ATPase from Sarcoplasmic Reticulum of Skeletal Muscle and Protective Effect of Trolox. *Gen Physiol Biophys* **2009**, *28*, 195–209, doi:10.4149/gpb\_2009\_02\_195.
154. Cook, N.L.; Viola, H.M.; Sharov, V.S.; Hool, L.C.; Schöneich, C.; Davies, M.J. Myeloperoxidase-Derived Oxidants Inhibit Sarco/Endoplasmic Reticulum Ca<sup>2+</sup>-ATPase

- Activity and Perturb Ca<sup>2+</sup> Homeostasis in Human Coronary Artery Endothelial Cells. *Free Radic Biol Med* **2012**, 52, 951–961, doi:10.1016/j.freeradbiomed.2011.12.001.
155. Bizat, N.; Hermel, J.-M.; Humbert, S.; Jacquard, C.; Créminon, C.; Escartin, C.; Saudou, F.; Krajewski, S.; Hantraye, P.; Brouillet, E. In Vivo Calpain/Caspase Cross-Talk during 3-Nitropropionic Acid-Induced Striatal Degeneration: Implication of a calpain-mediated cleavage of active caspase-3 \*. *Journal of Biological Chemistry* **2003**, 278, 43245–43253, doi:10.1074/jbc.M305057200.
  156. Reimertz, C.; Kögel, D.; Lankiewicz, S.; Poppe, M.; Prehn, J.H.M. Ca<sup>2+</sup>-Induced Inhibition of Apoptosis in Human SH-SY5Y Neuroblastoma Cells: Degradation of Apoptotic Protease Activating Factor-1 (APAF-1). *Journal of Neurochemistry* **2001**, 78, 1256–1266, doi:10.1046/j.1471-4159.2001.00503.x.
  157. Vile, G.F.; Rothwell, L.A.; Kettle, A.J. Hypochlorous Acid Activates the Tumor Suppressor Protein P53 in Cultured Human Skin Fibroblasts. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **1998**, 359, 51–56, doi:10.1006/abbi.1998.0881.
  158. Schoonbroodt, S.; Legrand-Poels, S.; Best-Belpomme, M.; Piette, J. Activation of the NF- $\kappa$ B Transcription Factor in a T-Lymphocytic Cell Line by Hypochlorous Acid. *Biochemical Journal* **1997**, 321, 777–785, doi:10.1042/bj3210777.
  159. Pi, J.; Zhang, Q.; Woods, C.G.; Wong, V.; Collins, S.; Andersen, M.E. Activation of Nrf2-Mediated Oxidative Stress Response in Macrophages by Hypochlorous Acid. *Toxicology and Applied Pharmacology* **2008**, 226, 236–243, doi:10.1016/j.taap.2007.09.016.
  160. Woods, C.G.; Fu, J.; Xue, P.; Hou, Y.; Pluta, L.J.; Yang, L.; Zhang, Q.; Thomas, R.S.; Andersen, M.E.; Pi, J. Dose-Dependent Transitions in Nrf2-Mediated Adaptive Response and Related Stress Responses to Hypochlorous Acid in Mouse Macrophages. *Toxicology and Applied Pharmacology* **2009**, 238, 27–36, doi:10.1016/j.taap.2009.04.007.
  161. Zhu, L.; Pi, J.; Wachi, S.; Andersen, M.E.; Wu, R.; Chen, Y. Identification of Nrf2-Dependent Airway Epithelial Adaptive Response to Proinflammatory Oxidant-Hypochlorous Acid Challenge by Transcription Profiling. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology* **2008**, 294, L469–L477, doi:10.1152/ajplung.00310.2007.
  162. Fourquet, S.; Guerois, R.; Biard, D.; Toledano, M.B. Activation of NRF2 by Nitrosative Agents and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Involves KEAP1 Disulfide Formation\*. *Journal of Biological Chemistry* **2010**, 285, 8463–8471, doi:10.1074/jbc.M109.051714.
  163. Rachakonda, G.; Xiong, Y.; Sekhar, K.R.; Stamer, S.L.; Liebler, D.C.; Freeman, M.L. Covalent Modification at Cys151 Dissociates the Electrophile Sensor Keap1 from the Ubiquitin Ligase CUL3. *Chem. Res. Toxicol.* **2008**, 21, 705–710, doi:10.1021/tx700302s.
  164. Midwinter, R.G.; Vissers, M.C.M.; Winterbourn, C.C. Hypochlorous Acid Stimulation of the Mitogen-Activated Protein Kinase Pathway Enhances Cell Survival. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **2001**, 394, 13–20, doi:10.1006/abbi.2001.2530.
  165. Thomas, E.L.; Grisham, M.B.; Melton, D.F.; Jefferson, M.M. Evidence for a Role of Taurine in the in Vitro Oxidative Toxicity of Neutrophils toward Erythrocytes. *Journal of Biological Chemistry* **1985**, 260, 3321–3329, doi:10.1016/S0021-9258(19)83623-2.
  166. Park, E.; Quinn, M.R.; Wright, C.E.; Schuller-Levis, G. Taurine Chloramine Inhibits the Synthesis of Nitric Oxide and the Release of Tumor Necrosis Factor in Activated RAW 264.7 Cells. *Journal of Leukocyte Biology* **1993**, 54, 119–124, doi:10.1002/jlb.54.2.119.
  167. Klamt, F.; Shacter, E. Taurine Chloramine, an Oxidant Derived from Neutrophils, Induces Apoptosis in Human B Lymphoma Cells through Mitochondrial Damage \*. *Journal of Biological Chemistry* **2005**, 280, 21346–21352, doi:10.1074/jbc.M501170200.
  168. Vissers, M.C.M.; Fantone, J.C. Inhibition of Hypochlorous Acid-Mediated Reactions by Desferrioxamine. Implications for the Mechanism of Cellular Injury by Neutrophils. *Free Radical Biology and Medicine* **1990**, 8, 331–337, doi:10.1016/0891-5849(90)90098-4.

169. Englert, R.P.; Shacter, E. Distinct Modes of Cell Death Induced by Different Reactive Oxygen Species: Amino acyl chloramines mediate hypochlorous acid-induced apoptosis \*. *Journal of Biological Chemistry* **2002**, *277*, 20518–20526, doi:10.1074/jbc.M200212200.
170. Kearns, S.; Dawson, R. Cytoprotective Effect of Taurine Against Hypochlorous Acid Toxicity to PC12 Cells. In *Taurine 4: Taurine and Excitable Tissues*; Della Corte, L., Huxtable, R.J., Sgaragli, G., Tipton, K.F., Eds.; Springer US: Boston, MA, 2002; pp. 563–570 ISBN 978-0-306-46838-4.
171. Wagner, B.A.; Reszka, K.J.; McCormick, M.L.; Britigan, B.E.; Evig, C.B.; Patrick Burns, C. Role of Thiocyanate, Bromide and Hypobromous Acid in Hydrogen Peroxide-Induced Apoptosis. *Cell Death and Disease* **2004**, *38*, 167–175, doi:10.1080/10715760310001643302.
172. Guo, C.; Sileikaite, I.; Davies, M.J.; Hawkins, C.L. Myeloperoxidase Modulates Hydrogen Peroxide Mediated Cellular Damage in Murine Macrophages. *Antioxidants* **2020**, *9*, doi:10.3390/antiox9121255.
173. Love, D.T.; Guo, C.; Nikelshparg, E.I.; Brazhe, N.A.; Sosnovtseva, O.; Hawkins, C.L. The Role of the Myeloperoxidase-Derived Oxidant Hypothiocyanous Acid (HOSCN) in the Induction of Mitochondrial Dysfunction in Macrophages. *Redox Biol* **2020**, *36*, 101602–101602, doi:10.1016/j.redox.2020.101602.
174. Lloyd, M.M.; van Reyk, D.M.; Davies, M.J.; Hawkins, C.L. Hypothiocyanous Acid Is a More Potent Inducer of Apoptosis and Protein Thiol Depletion in Murine Macrophage Cells than Hypochlorous Acid or Hypobromous Acid. *Biochemical Journal* **2008**, *414*, 271–280, doi:10.1042/BJ20080468.
175. Morgan, P.E.; Laura, R.P.; Maki, R.A.; Reynolds, W.F.; Davies, M.J. Thiocyanate Supplementation Decreases Atherosclerotic Plaque in Mice Expressing Human Myeloperoxidase. *Cell Death and Disease* **2015**, *49*, 743–749, doi:10.3109/10715762.2015.1019347.
176. Zietzer, A.; Niepmann, S.T.; Camara, B.; Lenart, M.A.; Jansen, F.; Becher, M.U.; Andrié, R.; Nickenig, G.; Tiyerili, V. Sodium Thiocyanate Treatment Attenuates Atherosclerotic Plaque Formation and Improves Endothelial Regeneration in Mice. *PLOS ONE* **2019**, *14*, e0214476, doi:10.1371/journal.pone.0214476.
177. Chandler, J.D.; Nichols, D.P.; Nick, J.A.; Hondal, R.J.; Day, B.J. Selective Metabolism of Hypothiocyanous Acid by Mammalian Thioredoxin Reductase Promotes Lung Innate Immunity and Antioxidant Defense. *J Biol Chem* **2013**, *288*, 18421–18428, doi:10.1074/jbc.M113.468090.
178. Hondal, R.J.; Ruggles, E.L. Differing Views of the Role of Selenium in Thioredoxin Reductase. *Amino Acids* **2011**, *41*, 73–89, doi:10.1007/s00726-010-0494-6.
179. Xulu, B.A.; Ashby, M.T. Small Molecular, Macromolecular, and Cellular Chloramines React with Thiocyanate To Give the Human Defense Factor Hypothiocyanite. *Biochemistry* **2010**, *49*, 2068–2074, doi:10.1021/bi902089w.
180. Dypbukt, J.M.; Bishop, C.; Brooks, W.M.; Thong, B.; Eriksson, H.; Kettle, A.J. A Sensitive and Selective Assay for Chloramine Production by Myeloperoxidase. *Free Radical Biology and Medicine* **2005**, *39*, 1468–1477, doi:10.1016/j.freeradbiomed.2005.07.008.
181. Weiss, S.J.; Klein, R.; Slivka, A.; Wei, M. Chlorination of Taurine by Human Neutrophils: Evidence for hypochlorous acid generation. *J Clin Invest* **1982**, *70*, 598–607, doi:10.1172/JCI110652.
182. Auchère, F.; Capeillère-Blandin, C. NADPH as a Co-Substrate for Studies of the Chlorinating Activity of Myeloperoxidase. *Biochem J* **1999**, *343 Pt 3*, 603–613.
183. Chesney, J.A.; Mahoney, J.R.; Eaton, J.W. A Spectrophotometric Assay for Chlorine-Containing Compounds. *Analytical Biochemistry* **1991**, *196*, 262–266, doi:10.1016/0003-2697(91)90463-4.

184. Chapman, Anna L.P.; Mocatta, Tessa J.; Shiva, S.; Seidel, A.; Chen, B.; Khalilova, I.; Paumann-Page, M.E.; Jameson, Guy N.L.; Winterbourn, Christine C.; Kettle, A.J. Ceruloplasmin Is an Endogenous Inhibitor of Myeloperoxidase\*. *Journal of Biological Chemistry* **2013**, 288, 6465–6477, doi:10.1074/jbc.M112.418970.
185. Setsukinai, K.; Urano, Y.; Kakinuma, K.; Majima, H.J.; Nagano, T. Development of Novel Fluorescence Probes That Can Reliably Detect Reactive Oxygen Species and Distinguish Specific Species \* 210. *Journal of Biological Chemistry* **2003**, 278, 3170–3175, doi:10.1074/jbc.M209264200.
186. Zhou, M.; Diwu, Z.; Panchuk-Voloshina, N.; Haugland, R.P. A Stable Nonfluorescent Derivative of Resorufin for the Fluorometric Determination of Trace Hydrogen Peroxide: Applications in Detecting the Activity of Phagocyte NADPH Oxidase and Other Oxidases. *Analytical Biochemistry* **1997**, 253, 162–168, doi:10.1006/abio.1997.2391.
187. Meng, Y.; High, K.; Antonello, J.; Washabaugh, M.W.; Zhao, Q. Enhanced Sensitivity and Precision in an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay with Fluorogenic Substrates Compared with Commonly Used Chromogenic Substrates. *Analytical Biochemistry* **2005**, 345, 227–236, doi:10.1016/j.ab.2005.07.026.
188. Seitz, W.R. Chemiluminescence from the Reaction between Hypochlorite and Luminol. *J. Phys. Chem.* **1975**, 79, 101–106, doi:10.1021/j100569a002.
189. Gross, S.; Gammon, S.T.; Moss, B.L.; Rauch, D.; Harding, J.; Heinecke, J.W.; Ratner, L.; Piwnica-Worms, D. Bioluminescence Imaging of Myeloperoxidase Activity in Vivo. *Nature Medicine* **2009**, 15, 455–461, doi:10.1038/nm.1886.
190. Villaverde, A.I.; Netherton, J.; Baker, M.A. From Past to Present: The Link Between Reactive Oxygen Species in Sperm and Male Infertility. *Antioxidants* **2019**, 8, doi:10.3390/antiox8120616.
191. Bedouhène, S.; Moulti-Mati, F.; Hurtado-Nedelec, M.; Dang, P.M.-C.; El-Benna, J. Luminol-Amplified Chemiluminescence Detects Mainly Superoxide Anion Produced by Human Neutrophils. *Am J Blood Res* **2017**, 7, 41–48.
192. Goiffon, R.J.; Martinez, S.C.; Piwnica-Worms, D. A Rapid Bioluminescence Assay for Measuring Myeloperoxidase Activity in Human Plasma. *Nature Communications* **2015**, 6, 6271, doi:10.1038/ncomms7271.
193. Song, X.; Shen, H.; Yin, X.; Wang, X.; Liu, J. Microflow-Injection Chemiluminescence of Luminol and Hypochlorite Enhanced by Phloxine B. *Luminescence* **2013**, 28, 16–22, doi:10.1002/bio.1388.
194. Ordeig, O.; Mas, R.; Gonzalo, J.; Del Campo, Fco.J.; Muñoz, F.J.; de Haro, C. Continuous Detection of Hypochlorous Acid/Hypochlorite for Water Quality Monitoring and Control. *Electroanalysis* **2005**, 17, 1641–1648, doi:10.1002/elan.200403194.
195. Kettle, A.J.; Winterbourn, C.C. [53] Assays for the Chlorination Activity of Myeloperoxidase. In *Methods in Enzymology*; Academic Press, 1994; Vol. 233, pp. 502–512 ISBN 0076-6879.
196. Jiang, Z.-Y.; Hunt, J.V.; Wolff, S.P. Ferrous Ion Oxidation in the Presence of Xylenol Orange for Detection of Lipid Hydroperoxide in Low Density Lipoprotein. *Analytical Biochemistry* **1992**, 202, 384–389, doi:10.1016/0003-2697(92)90122-N.
197. Kettle, A.J.; Albrett, A.M.; Chapman, A.L.; Dickerhof, N.; Forbes, L.V.; Khalilova, I.; Turner, R. Measuring Chlorine Bleach in Biology and Medicine. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* **2014**, 1840, 781–793, doi:10.1016/j.bbagen.2013.07.004.
198. Pulli, B.; Ali, M.; Forghani, R.; Schob, S.; Hsieh, K.L.C.; Wojtkiewicz, G.; Linnoila, J.J.; Chen, J.W. Measuring Myeloperoxidase Activity in Biological Samples. *PLOS ONE* **2013**, 8, e67976, doi:10.1371/journal.pone.0067976.
199. Xia, Y.; Zweier, J.L. Measurement of Myeloperoxidase in Leukocyte-Containing Tissues. *Analytical Biochemistry* **1997**, 245, 93–96, doi:10.1006/abio.1996.9940.

200. Hawkins, C.L.; Davies, M.J. Role of Myeloperoxidase and Oxidant Formation in the Extracellular Environment in Inflammation-Induced Tissue Damage. *Free Radical Biology and Medicine* **2021**, *172*, 633–651, doi:10.1016/j.freeradbiomed.2021.07.007.
201. Pase, L.; Layton, J.E.; Wittmann, C.; Ellett, F.; Nowell, C.J.; Reyes-Aldasoro, C.C.; Varma, S.; Rogers, K.L.; Hall, C.J.; Keightley, M.C.; et al. Neutrophil-Delivered Myeloperoxidase Dampens the Hydrogen Peroxide Burst after Tissue Wounding in Zebrafish. *Current Biology* **2012**, *22*, 1818–1824, doi:10.1016/j.cub.2012.07.060.
202. Chapman, A.L.P.; Senthilmohan, R.; Winterbourn, C.C.; Kettle, A.J. Comparison of Mono- and Dichlorinated Tyrosines with Carbonyls for Detection of Hypochlorous Acid Modified Proteins. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **2000**, *377*, 95–100, doi:10.1006/abbi.2000.1744.
203. Gaut, J.P.; Byun, J.; Tran, H.D.; Heinecke, J.W. Artifact-Free Quantification of Free 3-Chlorotyrosine, 3-Bromotyrosine, and 3-Nitrotyrosine in Human Plasma by Electron Capture–Negative Chemical Ionization Gas Chromatography Mass Spectrometry and Liquid Chromatography–Electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometry. *Analytical Biochemistry* **2002**, *300*, 252–259, doi:10.1006/abio.2001.5469.
204. Hazen, S.L.; Crowley, J.R.; Mueller, D.M.; Heinecke, J.W. Mass Spectrometric Quantification of 3-Chlorotyrosine in Human Tissues with Attomole Sensitivity: A Sensitive and Specific Marker for Myeloperoxidase-Catalyzed Chlorination at Sites of Inflammation. *Free Radical Biology and Medicine* **1997**, *23*, 909–916, doi:10.1016/S0891-5849(97)00084-1.
205. Hazell, L.J.; Arnold, L.; Flowers, D.; Waeg, G.; Malle, E.; Stocker, R. Presence of Hypochlorite-Modified Proteins in Human Atherosclerotic Lesions. *J Clin Invest* **1996**, *97*, 1535–1544, doi:10.1172/JCI118576.
206. Hazen, S.L.; Heinecke, J.W. 3-Chlorotyrosine, a Specific Marker of Myeloperoxidase-Catalyzed Oxidation, Is Markedly Elevated in Low Density Lipoprotein Isolated from Human Atherosclerotic Intima. *J Clin Invest* **1997**, *99*, 2075–2081, doi:10.1172/JCI119379.
207. Bergt, C.; Pennathur, S.; Fu, X.; Byun, J.; O’Brien, K.; McDonald, T.O.; Singh, P.; Anantharamaiah, G.M.; Chait, A.; Brunzell, J.; et al. The Myeloperoxidase Product Hypochlorous Acid Oxidizes HDL in the Human Artery Wall and Impairs ABCA1-Dependent Cholesterol Transport. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2004**, *101*, 13032–13037, doi:10.1073/pnas.0405292101.
208. Shao, B.; Pennathur, S.; Heinecke, J.W. Myeloperoxidase Targets Apolipoprotein A-I, the Major High Density Lipoprotein Protein, for Site-Specific Oxidation in Human Atherosclerotic Lesions \*. *Journal of Biological Chemistry* **2012**, *287*, 6375–6386, doi:10.1074/jbc.M111.337345.
209. Fu, S.; Wang, H.; Davies, M.; Dean, R. Reactions of Hypochlorous Acid with Tyrosine and Peptidyl-Tyrosyl Residues Give Dichlorinated and Aldehydic Products in Addition to 3-Chlorotyrosine\*. *Journal of Biological Chemistry* **2000**, *275*, 10851–10858, doi:10.1074/jbc.275.15.10851.
210. Mani, A.R.; Ippolito, S.; Moreno, J.C.; Visser, T.J.; Moore, K.P. The Metabolism and Dechlorination of Chlorotyrosine in Vivo\*. *Journal of Biological Chemistry* **2007**, *282*, 29114–29121, doi:10.1074/jbc.M704270200.
211. Curtis, M.P.; Hicks, A.J.; Neidigh, J.W. Kinetics of 3-Chlorotyrosine Formation and Loss Due to Hypochlorous Acid and Chloramines. *Chem. Res. Toxicol.* **2011**, *24*, 418–428, doi:10.1021/tx100380d.
212. Talib, J.; Maghzal, G.J.; Cheng, D.; Stocker, R. Detailed Protocol to Assess in Vivo and Ex Vivo Myeloperoxidase Activity in Mouse Models of Vascular Inflammation and Disease Using Hydroethidine. *Free Radical Biology and Medicine* **2016**, *97*, 124–135, doi:10.1016/j.freeradbiomed.2016.05.004.

213. Maghzal, G.J.; Cergol, K.M.; Shengule, S.R.; Suarna, C.; Newington, D.; Kettle, A.J.; Payne, R.J.; Stocker, R. Assessment of Myeloperoxidase Activity by the Conversion of Hydroethidine to 2-Chloroethidium \*. *Journal of Biological Chemistry* **2014**, *289*, 5580–5595, doi:10.1074/jbc.M113.539486.
214. Rausch, P.G.; Moore, T.G. Granule Enzymes of Polymorphonuclear Neutrophils: A Phylogenetic Comparison. *Blood* **1975**, *46*, 913–919, doi:10.1182/blood.V46.6.913.913.
215. Braverman, N.E.; Moser, A.B. Functions of Plasmalogen Lipids in Health and Disease. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease* **2012**, *1822*, 1442–1452, doi:10.1016/j.bbadis.2012.05.008.
216. Wildsmith, K.R.; Albert, C.J.; Anbukumar, D.S.; Ford, D.A. Metabolism of Myeloperoxidase-Derived 2-Chlorohexadecanal. *J Biol Chem* **2006**, *281*, 16849–16860, doi:10.1074/jbc.m602505200.
217. Ford, D.A. Lipid Oxidation by Hypochlorous Acid: Chlorinated Lipids in Atherosclerosis and Myocardial Ischemia. *Clin Lipidol* **2010**, *5*, 835–852, doi:10.2217/clp.10.68.
218. Hawkins, C.L.; Davies, M.J. Hypochlorite-Induced Damage to DNA, RNA, and Polynucleotides: Formation of Chloramines and Nitrogen-Centered Radicals. *Chem. Res. Toxicol.* **2002**, *15*, 83–92, doi:10.1021/tx015548d.
219. Takeshita, J.; Byun, J.; Nhan, T.Q.; Pritchard, D.K.; Pennathur, S.; Schwartz, S.M.; Chait, A.; Heinecke, J.W. Myeloperoxidase Generates 5-Chlorouracil in Human Atherosclerotic Tissue: A potential pathway for somatic mutagenesis by macrophages \*. *Journal of Biological Chemistry* **2006**, *281*, 3096–3104, doi:10.1074/jbc.M509236200.
220. Suquet, C.; Warren, J.J.; Seth, N.; Hurst, J.K. Comparative Study of HOCl-Inflicted Damage to Bacterial DNA Ex Vivo and within Cells. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **2010**, *493*, 135–142, doi:10.1016/j.abb.2009.10.006.
221. Harwood, D.T.; Kettle, A.J.; Winterbourn, C.C. Production of Glutathione Sulfonamide and Dehydroglutathione from GSH by Myeloperoxidase-Derived Oxidants and Detection Using a Novel LC–MS/MS Method. *Biochemical Journal* **2006**, *399*, 161–168, doi:10.1042/BJ20060978.
222. Cantin, A.M.; North, S.L.; Hubbard, R.C.; Crystal, R.G. Normal Alveolar Epithelial Lining Fluid Contains High Levels of Glutathione. *Journal of Applied Physiology* **1987**, *63*, 152–157, doi:10.1152/jappl.1987.63.1.152.
223. Harwood, D.T.; Darlow, B.A.; Cheah, F.-C.; McNeill, N.; Graham, P.; Winterbourn, C.C. Biomarkers of Neutrophil-Mediated Glutathione and Protein Oxidation in Tracheal Aspirates From Preterm Infants: Association With Bacterial Infection. *Pediatric Research* **2011**, *69*, 28–33, doi:10.1203/PDR.0b013e3181ff2378.
224. Kettle, A.J.; Turner, R.; Gangell, C.L.; Harwood, D.T.; Khalilova, I.S.; Chapman, A.L.; Winterbourn, C.C.; Sly, P.D. Oxidation Contributes to Low Glutathione in the Airways of Children with Cystic Fibrosis. *Eur Respir J* **2014**, *44*, 122, doi:10.1183/09031936.00170213.
225. Dickerhof, N.; Pearson, J.F.; Hoskin, T.S.; Berry, L.J.; Turner, R.; Sly, P.D.; Kettle, A.J. Oxidative Stress in Early Cystic Fibrosis Lung Disease Is Exacerbated by Airway Glutathione Deficiency. *Free Radical Biology and Medicine* **2017**, *113*, 236–243, doi:10.1016/j.freeradbiomed.2017.09.028.
226. Dickerhof, N.; Turner, R.; Khalilova, I.; Fantino, E.; Sly, P.D.; Kettle, A.J. Oxidized Glutathione and Uric Acid as Biomarkers of Early Cystic Fibrosis Lung Disease. *Journal of Cystic Fibrosis* **2017**, *16*, 214–221, doi:10.1016/j.jcf.2016.10.012.
227. Kumar, K.; Margerum, D.W. Kinetics and Mechanism of General-Acid-Assisted Oxidation of Bromide by Hypochlorite and Hypochlorous Acid. *Inorg. Chem.* **1987**, *26*, 2706–2711, doi:10.1021/ic00263a030.

228. Zhang, N.; Francis, K.P.; Prakash, A.; Ansaldi, D. Enhanced Detection of Myeloperoxidase Activity in Deep Tissues through Luminescent Excitation of Near-Infrared Nanoparticles. *Nature Medicine* **2013**, *19*, 500–505, doi:10.1038/nm.3110.
229. Chen, J.W.; Querol Sans, M.; Bogdanov, A.; Weissleder, R. Imaging of Myeloperoxidase in Mice by Using Novel Amplifiable Paramagnetic Substrates. *Radiology* **2006**, *240*, 473–481, doi:10.1148/radiol.2402050994.
230. Wang, C.; Keliher, E.; Zeller, M.W.G.; Wojtkiewicz, G.R.; Aguirre, A.D.; Buckbinder, L.; Kim, H.-Y.; Chen, J.; Maresca, K.; Ahmed, M.S.; et al. An Activatable PET Imaging Radioprobe Is a Dynamic Reporter of Myeloperoxidase Activity in Vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2019**, *116*, 11966–11971, doi:10.1073/pnas.1818434116.
231. Watson, J.; Jones, H.E.; Banks, J.; Whiting, P.; Salisbury, C.; Hamilton, W. Use of Multiple Inflammatory Marker Tests in Primary Care: Using Clinical Practice Research Datalink to Evaluate Accuracy. *Br J Gen Pract* **2019**, *69*, e462, doi:10.3399/bjgp19X704309.
232. Ximenes, V.F.; Maghzal, G.J.; Turner, R.; Kato, Y.; Winterbourn, C.C.; Kettle, A.J. Serotonin as a Physiological Substrate for Myeloperoxidase and Its Superoxide-Dependent Oxidation to Cytotoxic Tryptamine-4,5-Dione. *Biochemical Journal* **2009**, *425*, 285–293, doi:10.1042/BJ20090776.
233. Johnström, P.; Bergman, L.; Varnäs, K.; Malmquist, J.; Halldin, C.; Farde, L. Development of Rapid Multistep Carbon-11 Radiosynthesis of the Myeloperoxidase Inhibitor AZD3241 to Assess Brain Exposure by PET Microdosing. *Nuclear Medicine and Biology* **2015**, *42*, 555–560, doi:10.1016/j.nucmedbio.2015.02.001.
234. Hu, J.J.; Ye, S.; Yang, D. Fluorescent Probes for HOCl Imaging. *Israel Journal of Chemistry* **2017**, *57*, 251–258, doi:10.1002/ijch.201600113.
235. Yue, Y.; Huo, F.; Yin, C.; Escobedo, J.O.; Strongin, R.M. Recent Progress in Chromogenic and Fluorogenic Chemosensors for Hypochlorous Acid. *Analyst* **2016**, *141*, 1859–1873, doi:10.1039/C6AN00158K.
236. Zhang, Y.-R.; Liu, Y.; Feng, X.; Zhao, B.-X. Recent Progress in the Development of Fluorescent Probes for the Detection of Hypochlorous Acid. *Sensors and Actuators B: Chemical* **2017**, *240*, 18–36, doi:10.1016/j.snb.2016.08.066.
237. Ashoka, A.H.; Ali, F.; Tiwari, R.; Kumari, R.; Pramanik, S.K.; Das, A. Recent Advances in Fluorescent Probes for Detection of HOCl and HNO. *ACS Omega* **2020**, *5*, 1730–1742, doi:10.1021/acsomega.9b03420.
238. Teng, H.; Tian, J.; Sun, D.; Xiu, M.; Zhang, Y.; Qiang, X.; Tang, H.; Guo, Y. A Mitochondria-Specific Fluorescent Probe Based on Triazolopyridine Formation for Visualizing Endogenous Hypochlorous Acid in Living Cells and Zebrafish. *Sensors and Actuators B: Chemical* **2020**, *319*, 128288, doi:10.1016/j.snb.2020.128288.
239. Panizzi, P.; Nahrendorf, M.; Wildgruber, M.; Waterman, P.; Figueiredo, J.-L.; Aikawa, E.; McCarthy, J.; Weissleder, R.; Hilderbrand, S.A. Oxazine Conjugated Nanoparticle Detects in Vivo Hypochlorous Acid and Peroxynitrite Generation. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 15739–15744, doi:10.1021/ja903922u.
240. Li, M.-Y.; Li, K.; Liu, Y.-H.; Zhang, H.; Yu, K.-K.; Liu, X.; Yu, X.-Q. Mitochondria-Immobilized Fluorescent Probe for the Detection of Hypochlorite in Living Cells, Tissues, and Zebrafishes. *Anal. Chem.* **2020**, *92*, 3262–3269, doi:10.1021/acs.analchem.9b05102.
241. Lv, J.; Chen, Y.; Wang, F.; Wei, T.; Zhang, Z.; Qiang, J.; Chen, X. A Mitochondria-Targeted Fluorescent Probe Based on Fluorescein Derivative for Detection of Hypochlorite in Living Cells. *Dyes and Pigments* **2018**, *148*, 353–358, doi:10.1016/j.dyepig.2017.09.037.



242. Wang, B.; Yuan, F.; Wang, S.; Duan, R.; Ren, W.X.; Hou, J.-T. Detection of Atherosclerosis-Associated HOCl Using a Mitochondria-Targeted Fluorescent Probe. *Sensors and Actuators B: Chemical* **2021**, *348*, 130695, doi:10.1016/j.snb.2021.130695.
243. Xu, J.; Wang, C.; Ma, Q.; Zhang, H.; Tian, M.; Sun, J.; Wang, B.; Chen, Y. Novel Mitochondria-Targeting and Naphthalimide-Based Fluorescent Probe for Detecting HClO in Living Cells. *ACS Omega* **2021**, *6*, 14399–14409, doi:10.1021/acsomega.1c01271.
244. Zhou, J.; Li, L.; Shi, W.; Gao, X.; Li, X.; Ma, H. HOCl Can Appear in the Mitochondria of Macrophages during Bacterial Infection as Revealed by a Sensitive Mitochondrial-Targeting Fluorescent Probe. *Chem. Sci.* **2015**, *6*, 4884–4888, doi:10.1039/C5SC01562F.
245. Zhou, Y.; Li, J.-Y.; Chu, K.-H.; Liu, K.; Yao, C.; Li, J.-Y. Fluorescence Turn-on Detection of Hypochlorous Acid via HOCl-Promoted Dihydrofluorescein-Ether Oxidation and Its Application in Vivo. *Chem. Commun.* **2012**, *48*, 4677–4679, doi:10.1039/C2CC30265A.
246. Xu, Q.; Heo, C.H.; Kim, J.A.; Lee, H.S.; Hu, Y.; Kim, D.; Swamy, K.M.K.; Kim, G.; Nam, S.-J.; Kim, H.M.; et al. A Selective Imidazoline-2-Thione-Bearing Two-Photon Fluorescent Probe for Hypochlorous Acid in Mitochondria. *Anal. Chem.* **2016**, *88*, 6615–6620, doi:10.1021/acs.analchem.6b01738.
247. Gong, J.; Liu, C.; Cai, S.; He, S.; Zhao, L.; Zeng, X. Novel Near-Infrared Fluorescent Probe with a Large Stokes Shift for Sensing Hypochlorous Acid in Mitochondria. *Org. Biomol. Chem.* **2020**, *18*, 7656–7662, doi:10.1039/D0OB01563F.
248. Mao, G.-J.; Gao, G.-Q.; Liang, Z.-Z.; Wang, Y.-Y.; Su, L.; Wang, Z.-X.; Zhang, H.; Ma, Q.-J.; Zhang, G. A Mitochondria-Targetable Two-Photon Fluorescent Probe with a Far-Red to near-Infrared Emission for Sensing Hypochlorite in Biosystems. *Analytica Chimica Acta* **2019**, *1081*, 184–192, doi:10.1016/j.aca.2019.07.040.
249. Wang, Q.-M.; Jin, L.; Shen, Z.-Y.; Xu, J.-H.; Sheng, L.-Q.; Bai, H. Mitochondria-Targeting Turn-on Fluorescent Probe for HClO Detection and Imaging in Living Cells. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* **2020**, *228*, 117825, doi:10.1016/j.saa.2019.117825.
250. Wang, S.; Zhu, B.; Wang, B.; Cao, X.; Zhu, L.; Hou, J.-T.; Zeng, L. Revealing HOCl Burst from Endoplasmic Reticulum in Cisplatin-Treated Cells via a Ratiometric Fluorescent Probe. *Chinese Chemical Letters* **2021**, *32*, 1795–1798, doi:10.1016/j.ccl.2020.12.039.
251. Pak, Y.L.; Park, S.J.; Song, G.; Yim, Y.; Kang, H.; Kim, H.M.; Bouffard, J.; Yoon, J. Endoplasmic Reticulum-Targeted Ratiometric N-Heterocyclic Carbene Borane Probe for Two-Photon Microscopic Imaging of Hypochlorous Acid. *Anal. Chem.* **2018**, *90*, 12937–12943, doi:10.1021/acs.analchem.8b03565.
252. Yuan, L.; Wang, L.; Agrawalla, B.K.; Park, S.-J.; Zhu, H.; Sivaraman, B.; Peng, J.; Xu, Q.-H.; Chang, Y.-T. Development of Targetable Two-Photon Fluorescent Probes to Image Hypochlorous Acid in Mitochondria and Lysosome in Live Cell and Inflamed Mouse Model. *J. Am. Chem. Soc.* **2015**, *137*, 5930–5938, doi:10.1021/jacs.5b00042.
253. Jiao, X.; Liu, C.; Wang, Q.; Huang, K.; He, S.; Zhao, L.; Zeng, X. Fluorescence Probe for Hypochlorous Acid in Water and Its Applications for Highly Lysosome-Targetable Live Cell Imaging. *Analytica Chimica Acta* **2017**, *969*, 49–56, doi:10.1016/j.aca.2017.03.020.
254. Qu, Z.; Ding, J.; Zhao, M.; Li, P. Development of a Selenide-Based Fluorescent Probe for Imaging Hypochlorous Acid in Lysosomes. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* **2015**, *299*, 1–8, doi:10.1016/j.jphotochem.2014.10.015.
255. Ren, M.; Nie, J.; Deng, B.; Zhou, K.; Wang, J.-Y.; Lin, W. A Fluorescent Probe for Ratiometric Imaging of Exogenous and Intracellular Formed Hypochlorous Acid in Lysosomes. *New J. Chem.* **2017**, *41*, 5259–5262, doi:10.1039/C7NJ00949F.

256. Zhang, Z.; Fan, J.; Cheng, G.; Ghazali, S.; Du, J.; Peng, X. Fluorescence Completely Separated Ratiometric Probe for HClO in Lysosomes. *Sensors and Actuators B: Chemical* **2017**, *246*, 293–299, doi:10.1016/j.snb.2017.02.081.
257. Ren, M.; Deng, B.; Zhou, K.; Kong, X.; Wang, J.-Y.; Xu, G.; Lin, W. A Lysosome-Targeted and Ratiometric Fluorescent Probe for Imaging Exogenous and Endogenous Hypochlorous Acid in Living Cells. *J. Mater. Chem. B* **2016**, *4*, 4739–4745, doi:10.1039/C6TB01085G.
258. Zhang, B.; Yang, X.; Zhang, R.; Liu, Y.; Ren, X.; Xian, M.; Ye, Y.; Zhao, Y. Lysosomal-Targeted Two-Photon Fluorescent Probe to Sense Hypochlorous Acid in Live Cells. *Anal. Chem.* **2017**, *89*, 10384–10390, doi:10.1021/acs.analchem.7b02361.
259. Ali, F.; Aute, S.; Sreedharan, S.; Anila, H.A.; Saeed, H.K.; Smythe, C.G.; Thomas, J.A.; Das, A. Tracking HOCl Concentrations across Cellular Organelles in Real Time Using a Super Resolution Microscopy Probe. *Chem. Commun.* **2018**, *54*, 1849–1852, doi:10.1039/C7CC09433G.
260. Wu, H.; Pang, L.-F.; Wei, N.; Guo, X.-F.; Wang, H. Nucleus-Targeted N-Doped Carbon Dots via DNA-Binding for Imaging of Hypochlorous in Cells and Zebrafish. *Sensors and Actuators B: Chemical* **2021**, *333*, 129626, doi:10.1016/j.snb.2021.129626.
261. Kostyuk, A.I.; Panova, A.S.; Kokova, A.D.; Kotova, D.A.; Maltsev, D.I.; Podgorny, O.V.; Belousov, V.V.; Bilan, D.S. In Vivo Imaging with Genetically Encoded Redox Biosensors. *International Journal of Molecular Sciences* **2020**, *21*, doi:10.3390/ijms21218164.
262. 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**, *59*, 223–239, doi:10.1002/jcp.1030590302.
263. Shimomura, O.; Johnson, F.H. Chemical Nature of Bioluminescence Systems in Coelenterates. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1975**, *72*, 1546–1549, doi:10.1073/pnas.72.4.1546.
264. Morise, H.; Shimomura, O.; Johnson, F.H.; Winant, J. Intermolecular Energy Transfer in the Bioluminescent System of Aequorea. *Biochemistry* **1974**, *13*, 2656–2662, doi:10.1021/bi00709a028.
265. Johnson, F.H.; Shimomura, O.; Saiga, Y.; Gershman, L.C.; Reynolds, G.T.; Waters, J.R. Quantum Efficiency of Cypridina Luminescence, with a Note on That of Aequorea. *Journal of Cellular and Comparative Physiology* **1962**, *60*, 85–103, doi:10.1002/jcp.1030600111.
266. Morin, J.G.; Hastings, J.W. Energy Transfer in a Bioluminescent System. *J Cell Physiol* **1971**, *77*, 313–318, doi:10.1002/jcp.1040770305.
267. Cody, C.W.; Prasher, D.C.; Westler, W.M.; Prendergast, F.G.; Ward, W.W. Chemical Structure of the Hexapeptide Chromophore of the Aequorea Green-Fluorescent Protein. *Biochemistry* **1993**, *32*, 1212–1218, doi:10.1021/bi00056a003.
268. Prasher, D.C.; Eckenrode, V.K.; Ward, W.W.; Prendergast, F.G.; Cormier, M.J. Primary Structure of the Aequorea Victoria Green-Fluorescent Protein. *Gene* **1992**, *111*, 229–233, doi:10.1016/0378-1119(92)90691-h.
269. Adams, S.R.; Harootunian, A.T.; Buechler, Y.J.; Taylor, S.S.; Tsien, R.Y. Fluorescence Ratio Imaging of Cyclic AMP in Single Cells. *Nature* **1991**, *349*, 694–697, doi:10.1038/349694a0.
270. Bacsikai Brian J.; Hochner Binyamin; Mahaut-Smith Martyn; Adams Stephen R.; Kaang Bong-Kiun; Kandel Eric R.; Tsien Roger Y. Spatially Resolved Dynamics of cAMP and Protein Kinase A Subunits in Aplysia Sensory Neurons. *Science* **1993**, *260*, 222–226, doi:10.1126/science.7682336.

271. Fairchild, C.D.; Glazer, A.N. Oligomeric Structure, Enzyme Kinetics, and Substrate Specificity of the Phycocyanin Alpha Subunit Phycocyanobilin Lyase. *Journal of Biological Chemistry* **1994**, *269*, 8686–8694, doi:10.1016/S0021-9258(17)37022-9.
272. Chalfie Martin; Tu Yuan; Euskirchen Ghia; Ward William W.; Prasher Douglas C. Green Fluorescent Protein as a Marker for Gene Expression. *Science* **1994**, *263*, 802–805, doi:10.1126/science.8303295.
273. Inouye, S.; Tsuji, F.I. Aequorea Green Fluorescent Protein. *FEBS Letters* **1994**, *341*, 277–280, doi:10.1016/0014-5793(94)80472-9.
274. Perozzo, M.A.; Ward, K.B.; Thompson, R.B.; Ward, W.W. X-Ray Diffraction and Time-Resolved Fluorescence Analyses of Aequorea Green Fluorescent Protein Crystals. *J Biol Chem* **1988**, *263*, 7713–7716.
275. Ormö Mats; Cubitt Andrew B.; Kallio Karen; Gross Larry A.; Tsien Roger Y.; Remington S. James Crystal Structure of the Aequorea Victoria Green Fluorescent Protein. *Science* **1996**, *273*, 1392–1395, doi:10.1126/science.273.5280.1392.
276. Yang, F.; Moss, L.G.; Phillips, G.N. The Molecular Structure of Green Fluorescent Protein. *Nature Biotechnology* **1996**, *14*, 1246–1251, doi:10.1038/nbt1096-1246.
277. Takaba, K.; Tai, Y.; Eki, H.; Dao, H.-A.; Hanazono, Y.; Hasegawa, K.; Miki, K.; Takeda, K. Subatomic Resolution X-Ray Structures of Green Fluorescent Protein. *IUCrJ* **2019**, *6*, 387–400, doi:10.1107/S205225251900246X.
278. Tsien, R.Y. The Green Fluorescent Protein. *Annu. Rev. Biochem.* **1998**, *67*, 509–544, doi:10.1146/annurev.biochem.67.1.509.
279. Cubitt, A.B.; Woollenweber, L.A.; Heim, R. Understanding Structure-Function Relationships in the Aequorea Victoria Green Fluorescent Protein. *Methods Cell Biol* **1999**, *58*, 19–30, doi:10.1016/s0091-679x(08)61946-9.
280. Ward, W.W.; Bokman, S.H. Reversible Denaturation of Aequorea Green-Fluorescent Protein: Physical Separation and Characterization of the Renatured Protein. *Biochemistry* **1982**, *21*, 4535–4540, doi:10.1021/bi00262a003.
281. Bokman, S.H.; Ward, W.W. Renaturation of Aequorea Green-Fluorescent Protein. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **1981**, *101*, 1372–1380, doi:10.1016/0006-291X(81)91599-0.
282. Fukuda, H.; Arai, M.; Kuwajima, K. Folding of Green Fluorescent Protein and the Cycle3 Mutant. *Biochemistry* **2000**, *39*, 12025–12032, doi:10.1021/bi0005431.
283. Huang, J.; Craggs, T.D.; Christodoulou, J.; Jackson, S.E. Stable Intermediate States and High Energy Barriers in the Unfolding of GFP. *Journal of Molecular Biology* **2007**, *370*, 356–371, doi:10.1016/j.jmb.2007.04.039.
284. Jackson, S.E. How Do Small Single-Domain Proteins Fold? *Folding and Design* **1998**, *3*, R81–R91, doi:10.1016/S1359-0278(98)00033-9.
285. Barondeau, D.P.; Putnam, C.D.; Kassmann, C.J.; Tainer, J.A.; Getzoff, E.D. Mechanism and Energetics of Green Fluorescent Protein Chromophore Synthesis Revealed by Trapped Intermediate Structures. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2003**, *100*, 12111–12116, doi:10.1073/pnas.2133463100.
286. Cubitt, A.B.; Heim, R.; Adams, S.R.; Boyd, A.E.; Gross, L.A.; Tsien, R.Y. Understanding, Improving and Using Green Fluorescent Proteins. *Trends in Biochemical Sciences* **1995**, *20*, 448–455, doi:10.1016/S0968-0004(00)89099-4.
287. 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. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **2005**, *332*, 657–663, doi:10.1016/j.bbrc.2005.04.166.
288. Barondeau, D.P.; Tainer, J.A.; Getzoff, E.D. Structural Evidence for an Enolate Intermediate in GFP Fluorophore Biosynthesis. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 3166–3168, doi:10.1021/ja0552693.

289. Rosenow, M.A.; Huffman, H.A.; Phail, M.E.; Wachter, R.M. The Crystal Structure of the Y66L Variant of Green Fluorescent Protein Supports a Cyclization–Oxidation–Dehydration Mechanism for Chromophore Maturation., *Biochemistry* **2004**, *43*, 4464–4472, doi:10.1021/bi0361315.
290. Wood, T.I.; Barondeau, D.P.; Hitomi, C.; Kassmann, C.J.; Tainer, J.A.; Getzoff, E.D. Defining the Role of Arginine 96 in Green Fluorescent Protein Fluorophore Biosynthesis., *Biochemistry* **2005**, *44*, 16211–16220, doi:10.1021/bi051388j.
291. Sniegowski, J.A.; Lappe, J.W.; Patel, H.N.; Huffman, H.A.; Wachter, R.M. Base Catalysis of Chromophore Formation in Arg96 and Glu222 Variants of Green Fluorescent Protein \*. *Journal of Biological Chemistry* **2005**, *280*, 26248–26255, doi:10.1074/jbc.M412327200.
292. Zhang, L.; Patel, H.N.; Lappe, J.W.; Wachter, R.M. Reaction Progress of Chromophore Biogenesis in Green Fluorescent Protein. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 4766–4772, doi:10.1021/ja0580439.
293. Baedeker, M.; Schulz, G.E. Autocatalytic Peptide Cyclization during Chain Folding of Histidine Ammonia-Lyase. *Structure* **2002**, *10*, 61–67, doi:10.1016/S0969-2126(01)00692-X.
294. Heim, R.; Prasher, D.C.; Tsien, R.Y. Wavelength Mutations and Posttranslational Autoxidation of Green Fluorescent Protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1994**, *91*, 12501–12504, doi:10.1073/pnas.91.26.12501.
295. Reid, B.G.; Flynn, G.C. Chromophore Formation in Green Fluorescent Protein. *Biochemistry* **1997**, *36*, 6786–6791, doi:10.1021/bi970281w.
296. Wachter, R.M. Chromogenic Cross-Link Formation in Green Fluorescent Protein. *Acc. Chem. Res.* **2007**, *40*, 120–127, doi:10.1021/ar040086r.
297. Inouye, S.; Tsuji, F.I. Evidence for Redox Forms of the Aequorea Green Fluorescent Protein. *FEBS Letters* **1994**, *351*, 211–214, doi:10.1016/0014-5793(94)00859-0.
298. Niwa Haruki; Inouye Satoshi; Hirano Takashi; Matsuno Tatsuki; Kojima Satoshi; Kubota Masayuki; Ohashi Mamoru; Tsuji Frederick I. Chemical Nature of the Light Emitter of the Aequorea Green Fluorescent Protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **1996**, *93*, 13617–13622, doi:10.1073/pnas.93.24.13617.
299. Barondeau, D.P.; Kassmann, C.J.; Tainer, J.A.; Getzoff, E.D. The Case of the Missing Ring: Radical Cleavage of a Carbon–Carbon Bond and Implications for GFP Chromophore Biosynthesis. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 3118–3126, doi:10.1021/ja063983u.
300. Pouwels, L.J.; Zhang, L.; Chan, N.H.; Dorrestein, P.C.; Wachter, R.M. Kinetic Isotope Effect Studies on the de Novo Rate of Chromophore Formation in Fast- and Slow-Maturing GFP Variants. *Biochemistry* **2008**, *47*, 10111–10122, doi:10.1021/bi8007164.
301. Barondeau, D.P.; Kassmann, C.J.; Tainer, J.A.; Getzoff, E.D. Understanding GFP Posttranslational Chemistry: Structures of Designed Variants That Achieve Backbone Fragmentation, Hydrolysis, and Decarboxylation. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 4685–4693, doi:10.1021/ja056635l.
302. Barondeau, D.P.; Kassmann, C.J.; Tainer, J.A.; Getzoff, E.D. Understanding GFP Chromophore Biosynthesis: Controlling Backbone Cyclization and Modifying Post-Translational Chemistry., *Biochemistry* **2005**, *44*, 1960–1970, doi:10.1021/bi0479205.
303. Baffour-Awuah, N.Y.; Fedeles, F.; Zimmer, M. Structural Features Responsible for GFPuv and S147P-GFP's Improved Fluorescence. *Chemical Physics* **2005**, *310*, 25–31, doi:10.1016/j.chemphys.2004.09.031.
304. Andrews, B.T.; Schoenfish, A.R.; Roy, M.; Waldo, G.; Jennings, P.A. The Rough Energy Landscape of Superfolder GFP Is Linked to the Chromophore. *J Mol Biol* **2007**, *373*, 476–490, doi:10.1016/j.jmb.2007.07.071.

305. Bell, A.F.; He, X.; Wachter, R.M.; Tonge, P.J. Probing the Ground State Structure of the Green Fluorescent Protein Chromophore Using Raman Spectroscopy. *Biochemistry* **2000**, *39*, 4423–4431, doi:10.1021/bi992675o.
306. Schellenberg, P.; Johnson, E.; Esposito, A.P.; Reid, P.J.; Parson, W.W. Resonance Raman Scattering by the Green Fluorescent Protein and an Analogue of Its Chromophore. *J. Phys. Chem. B* **2001**, *105*, 5316–5322, doi:10.1021/jp0046243.
307. He, X.; Bell, A.F.; Tonge, P.J. Isotopic Labeling and Normal-Mode Analysis of a Model Green Fluorescent Protein Chromophore. *J. Phys. Chem. B* **2002**, *106*, 6056–6066, doi:10.1021/jp0145560.
308. Yakhnin, A.V.; Vinokurov, L.M.; Surin, A.K.; Alakhov, Y.B. Green Fluorescent Protein Purification by Organic Extraction. *Protein Expression and Purification* **1998**, *14*, 382–386, doi:10.1006/prep.1998.0981.
309. Ward, W.W.; Cody, C.W.; Hart, R.C.; Cormier, M.J. Spectrophotometric identity of the energy transfer chromophores in renilla and aequorea green-fluorescent proteins. *Photochemistry and Photobiology* **1980**, *31*, 611–615, doi:10.1111/j.1751-1097.1980.tb03755.x.
310. Ward, W.W. Biochemical and Physical Properties of Green Fluorescent Protein. In *Green Fluorescent Protein*; John Wiley & Sons, Ltd, 2005; pp. 39–65 ISBN 978-0-471-73949-4.
311. Ward, W.W.; Prentice, H.J.; Roth, A.F.; Cody, C.W.; Reeves, S.C. Spectral perturbations of the aequorea green-fluorescent protein. *Photochemistry and Photobiology* **1982**, *35*, 803–808, doi:10.1111/j.1751-1097.1982.tb02651.x.
312. Agmon, N. Proton Pathways in Green Fluorescence Protein. *Biophysical Journal* **2005**, *88*, 2452–2461, doi:10.1529/biophysj.104.055541.
313. Scharnagl, C.; Raupp-Kossmann, R.; Fischer, S.F. Molecular Basis for PH Sensitivity and Proton Transfer in Green Fluorescent Protein: Protonation and Conformational Substates from Electrostatic Calculations. *Biophysical Journal* **1999**, *77*, 1839–1857, doi:10.1016/S0006-3495(99)77028-1.
314. Bizzarri, R.; Nifosi, R.; Abbruzzetti, S.; Rocchia, W.; Guidi, S.; Arosio, D.; Garau, G.; Campanini, B.; Grandi, E.; Ricci, F.; et al. Green Fluorescent Protein Ground States: The Influence of a Second Protonation Site near the Chromophore,. *Biochemistry* **2007**, *46*, 5494–5504, doi:10.1021/bi602646r.
315. Nienhaus, K.; Renzi, F.; Vallone, B.; Wiedenmann, J.; Nienhaus, G.U. Chromophore-Protein Interactions in the Anthozoan Green Fluorescent Protein AsFP499. *Biophysical Journal* **2006**, *91*, 4210–4220, doi:10.1529/biophysj.106.087411.
316. Shimomura, O. Structure of the Chromophore of Aequorea Green Fluorescent Protein. *FEBS Letters* **1979**, *104*, 220–222, doi:10.1016/0014-5793(79)80818-2.
317. Maddalo, S.L.; Zimmer, M. The Role of the Protein Matrix in Green Fluorescent Protein Fluorescence. *Photochemistry and Photobiology* **2006**, *82*, 367–372, doi:10.1562/2005-04-11-RA-485.
318. Weber Wolfgang; Helms Volkhard; McCammon J. Andrew; Langhoff Peter W. Shedding Light on the Dark and Weakly Fluorescent States of Green Fluorescent Proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **1999**, *96*, 6177–6182, doi:10.1073/pnas.96.11.6177.
319. Usman, A.; Mohammed, O.F.; Nibbering, E.T.J.; Dong, J.; Solntsev, K.M.; Tolbert, L.M. Excited-State Structure Determination of the Green Fluorescent Protein Chromophore. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 11214–11215, doi:10.1021/ja0520520.
320. Litvinenko, K.L.; Webber, N.M.; Meech, S.R. Internal Conversion in the Chromophore of the Green Fluorescent Protein: Temperature Dependence and Isoviscosity Analysis. *J. Phys. Chem. A* **2003**, *107*, 2616–2623, doi:10.1021/jp027376e.
321. Kojima, S.; Ohkawa, H.; Hirano, T.; Maki, S.; Niwa, H.; Ohashi, M.; Inouye, S.; Tsuji, F.I. Fluorescent Properties of Model Chromophores of Tyrosine-66 Substituted Mutants of

- Aequorea Green Fluorescent Protein (GFP). *Tetrahedron Letters* **1998**, *39*, 5239–5242, doi:10.1016/S0040-4039(98)01031-4.
322. Chen, K.-Y.; Cheng, Y.-M.; Lai, C.-H.; Hsu, C.-C.; Ho, M.-L.; Lee, G.-H.; Chou, P.-T. Ortho Green Fluorescence Protein Synthetic Chromophore; Excited-State Intramolecular Proton Transfer via a Seven-Membered-Ring Hydrogen-Bonding System. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 4534–4535, doi:10.1021/ja070880i.
323. Wu, L.; Burgess, K. Syntheses of Highly Fluorescent GFP-Chromophore Analogues. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 4089–4096, doi:10.1021/ja710388h.
324. Ouellet, J. RNA Fluorescence with Light-Up Aptamers. *Frontiers in Chemistry* **2016**, *4*.
325. Megley, C.M.; Dickson, L.A.; Maddalo, S.L.; Chandler, G.J.; Zimmer, M. Photophysics and Dihedral Freedom of the Chromophore in Yellow, Blue, and Green Fluorescent Protein. *J. Phys. Chem. B* **2009**, *113*, 302–308, doi:10.1021/jp806285s.
326. Chatteraj M; King B A; Bublitiz G U; Boxer S G Ultra-Fast Excited State Dynamics in Green Fluorescent Protein: Multiple States and Proton Transfer. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **1996**, *93*, 8362–8367, doi:10.1073/pnas.93.16.8362.
327. Brejc, K.; Sixma, T.K.; Kitts, P.A.; Kain, S.R.; Tsien, R.Y.; Ormö, M.; Remington, S.J. Structural Basis for Dual Excitation and Photoisomerization of the Aequorea Victoria Green Fluorescent Protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1997**, *94*, 2306–2311, doi:10.1073/pnas.94.6.2306.
328. Lossau, H.; Kummer, A.; Heinecke, R.; Pöllinger-Dammer, F.; Kompa, C.; Bieser, G.; Jonsson, T.; Silva, C.M.; Yang, M.M.; Youvan, D.C.; et al. Time-Resolved Spectroscopy of Wild-Type and Mutant Green Fluorescent Proteins Reveals Excited State Deprotonation Consistent with Fluorophore-Protein Interactions. *Chemical Physics* **1996**, *213*, 1–16, doi:10.1016/S0301-0104(96)00340-0.
329. Arnaut, L.G.; Formosinho, S.J. Excited-State Proton Transfer Reactions I. Fundamentals and Intermolecular Reactions. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* **1993**, *75*, 1–20, doi:10.1016/1010-6030(93)80157-5.
330. van Thor, J.J.; Zanetti, G.; Ronayne, K.L.; Towrie, M. Structural Events in the Photocycle of Green Fluorescent Protein. *J. Phys. Chem. B* **2005**, *109*, 16099–16108, doi:10.1021/jp051315+.
331. Palm, G.J.; Zdanov, A.; Gaitanaris, G.A.; Stauber, R.; Pavlakis, G.N.; Wlodawer, A. The Structural Basis for Spectral Variations in Green Fluorescent Protein. *Nat Struct Biol* **1997**, *4*, 361–365, doi:10.1038/nsb0597-361.
332. Yokoe, H.; Meyer, T. Spatial Dynamics of GFP-Tagged Proteins Investigated by Local Fluorescence Enhancement. *Nature Biotechnology* **1996**, *14*, 1252–1256, doi:10.1038/nbt1096-1252.
333. Bell, A.F.; Stoner-Ma, D.; Wachter, R.M.; Tonge, P.J. Light-Driven Decarboxylation of Wild-Type Green Fluorescent Protein. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 6919–6926, doi:10.1021/ja034588w.
334. van Thor, J.J.; Gensch, T.; Hellingwerf, K.J.; Johnson, L.N. Phototransformation of Green Fluorescent Protein with UV and Visible Light Leads to Decarboxylation of Glutamate 222. *Nat Struct Biol* **2002**, *9*, 37–41, doi:10.1038/nsb739.
335. Heim, R.; Cubitt, A.B.; Tsien, R.Y. Improved Green Fluorescence. *Nature* **1995**, *373*, 663–664, doi:10.1038/373663b0.
336. Delagrave, S.; Hawtin, R.E.; Silva, C.M.; Yang, M.M.; Youvan, D.C. Red-Shifted Excitation Mutants of the Green Fluorescent Protein. *Biotechnology (N Y)* **1995**, *13*, 151–154, doi:10.1038/nbt0295-151.
337. Cormack, B.P.; Valdivia, R.H.; Falkow, S. FACS-Optimized Mutants of the Green Fluorescent Protein (GFP). *Gene* **1996**, *173*, 33–38, doi:10.1016/0378-1119(95)00685-0.

338. Ehrig, T.; O’Kane, D.J.; Prendergast, F.G. Green-Fluorescent Protein Mutants with Altered Fluorescence Excitation Spectra. *FEBS Letters* **1995**, *367*, 163–166, doi:10.1016/0014-5793(95)00557-P.
339. Patterson George H.; Lippincott-Schwartz Jennifer A Photoactivatable GFP for Selective Photolabeling of Proteins and Cells. *Science* **2002**, *297*, 1873–1877, doi:10.1126/science.1074952.
340. Merola, F.; Levy, B.; Demachy, I.; Pasquier, H. Photophysics and Spectroscopy of Fluorophores in the Green Fluorescent Protein Family. In *Advanced Fluorescence Reporters in Chemistry and Biology I: Fundamentals and Molecular Design*; Demchenko, A.P., Ed.; Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg, 2010; pp. 347–383 ISBN 978-3-642-04702-2.
341. Jung, G.; Wiehler, J.; Zumbusch, A. The Photophysics of Green Fluorescent Protein: Influence of the Key Amino Acids at Positions 65, 203, and 222. *Biophysical Journal* **2005**, *88*, 1932–1947, doi:10.1529/biophysj.104.044412.
342. Shu, X.; Leiderman, P.; Gepshtein, R.; Smith, N.R.; Kallio, K.; Huppert, D.; Remington, S.J. An Alternative Excited-State Proton Transfer Pathway in Green Fluorescent Protein Variant S205V. *Protein Sci* **2007**, *16*, 2703–2710, doi:10.1110/ps.073112007.
343. Tsien, R.Y. Constructing and Exploiting the Fluorescent Protein Paintbox (Nobel Lecture). *Angewandte Chemie International Edition* **2009**, *48*, 5612–5626, doi:10.1002/anie.200901916.
344. Heim, R.; Tsien, R.Y. Engineering Green Fluorescent Protein for Improved Brightness, Longer Wavelengths and Fluorescence Resonance Energy Transfer. *Current Biology* **1996**, *6*, 178–182, doi:10.1016/S0960-9822(02)00450-5.
345. Tomosugi, W.; Matsuda, T.; Tani, T.; Nemoto, T.; Kotera, I.; Saito, K.; Horikawa, K.; Nagai, T. An Ultramarine Fluorescent Protein with Increased Photostability and PH Insensitivity. *Nature Methods* **2009**, *6*, 351–353, doi:10.1038/nmeth.1317.
346. Yang, T.-T.; Sinai, P.; Green, G.; Kitts, P.A.; Chen, Y.-T.; Lybarger, L.; Chervenak, R.; Patterson, G.H.; Piston, D.W.; Kain, S.R. Improved Fluorescence and Dual Color Detection with Enhanced Blue and Green Variants of the Green Fluorescent Protein \*. *Journal of Biological Chemistry* **1998**, *273*, 8212–8216, doi:10.1074/jbc.273.14.8212.
347. Rizzuto, R.; Brini, M.; Giorgi, F.D.; Rossi, R.; Heim, R.; Tsien, R.Y.; Pozzan, T. Double Labelling of Subcellular Structures with Organelle-Targeted GFP Mutants in Vivo. *Current Biology* **1996**, *6*, 183–188, doi:10.1016/S0960-9822(02)00451-7.
348. Patterson, G.H.; Piston, D.W.; Barisas, B.G. Förster Distances between Green Fluorescent Protein Pairs. *Analytical Biochemistry* **2000**, *284*, 438–440, doi:10.1006/abio.2000.4708.
349. Patterson, G.; Day, R.N.; Piston, D. Fluorescent Protein Spectra. *Journal of Cell Science* **2001**, *114*, 837–838, doi:10.1242/jcs.114.5.837.
350. Mena, M.A.; Treynor, T.P.; Mayo, S.L.; Daugherty, P.S. Blue Fluorescent Proteins with Enhanced Brightness and Photostability from a Structurally Targeted Library. *Nature Biotechnology* **2006**, *24*, 1569–1571, doi:10.1038/nbt1264.
351. Ai, H.; Shaner, N.C.; Cheng, Z.; Tsien, R.Y.; Campbell, R.E. Exploration of New Chromophore Structures Leads to the Identification of Improved Blue Fluorescent Proteins. *Biochemistry* **2007**, *46*, 5904–5910, doi:10.1021/bi700199g.
352. Rizzo, M.A.; Springer, G.H.; Granada, B.; Piston, D.W. An Improved Cyan Fluorescent Protein Variant Useful for FRET. *Nature Biotechnology* **2004**, *22*, 445–449, doi:10.1038/nbt945.
353. Koushik, S.V.; Chen, H.; Thaler, C.; Puhl, H.L., 3rd; Vogel, S.S. Cerulean, Venus, and VenusY67C FRET Reference Standards. *Biophys J* **2006**, *91*, L99–L101, doi:10.1529/biophysj.106.096206.

354. Erard, M.; Fredj, A.; Pasquier, H.; Beltolngar, D.-B.; Bousmah, Y.; Derrien, V.; Vincent, P.; Merola, F. Minimum Set of Mutations Needed to Optimize Cyan Fluorescent Proteins for Live Cell Imaging. *Mol. BioSyst.* **2013**, *9*, 258–267, doi:10.1039/C2MB25303H.
355. Nguyen, A.W.; Daugherty, P.S. Evolutionary Optimization of Fluorescent Proteins for Intracellular FRET. *Nature Biotechnology* **2005**, *23*, 355–360, doi:10.1038/nbt1066.
356. Markwardt, M.L.; Kremers, G.-J.; Kraft, C.A.; Ray, K.; Cranfill, P.J.C.; Wilson, K.A.; Day, R.N.; Wachter, R.M.; Davidson, M.W.; Rizzo, M.A. An Improved Cerulean Fluorescent Protein with Enhanced Brightness and Reduced Reversible Photoswitching. *PLOS ONE* **2011**, *6*, e17896, doi:10.1371/journal.pone.0017896.
357. Goedhart, J.; von Stetten, D.; Noirclerc-Savoye, M.; Lelimosin, M.; Joosen, L.; Hink, M.A.; van Weeren, L.; Gadella, T.W.J.; Royant, A. Structure-Guided Evolution of Cyan Fluorescent Proteins towards a Quantum Yield of 93%. *Nature Communications* **2012**, *3*, 751, doi:10.1038/ncomms1738.
358. Wachter, R.; Elsliger, M.; Kallio, K.; Hanson, G.; Remington, S. Structural Basis of Spectral Shifts in the Yellow-Emission Variants of Green Fluorescent Protein. *Structure* **1998**, *6*, 1267–1277, doi:10.1016/s0969-2126(98)00127-0.
359. Griesbeck, O.; Baird, G.S.; Campbell, R.E.; Zacharias, D.A.; Tsien, R.Y. Reducing the Environmental Sensitivity of Yellow Fluorescent Protein: Mechanism and applications \*. *Journal of Biological Chemistry* **2001**, *276*, 29188–29194, doi:10.1074/jbc.M102815200.
360. Zacharias David A.; Violin Jonathan D.; Newton Alexandra C.; Tsien Roger Y. Partitioning of Lipid-Modified Monomeric GFPs into Membrane Microdomains of Live Cells. *Science* **2002**, *296*, 913–916, doi:10.1126/science.1068539.
361. Wiens, M.D.; Hoffmann, F.; Chen, Y.; Campbell, R.E. Enhancing Fluorescent Protein Photostability through Robot-Assisted Photobleaching. *Integrative Biology* **2018**, *10*, 419–428, doi:10.1039/c8ib00063h.
362. Nagai, T.; Ibata, K.; Park, E.S.; Kubota, M.; Mikoshiba, K.; Miyawaki, A. A Variant of Yellow Fluorescent Protein with Fast and Efficient Maturation for Cell-Biological Applications. *Nature Biotechnology* **2002**, *20*, 87–90, doi:10.1038/nbt0102-87.
363. Kremers, G.-J.; Goedhart, J.; van Munster, E.B.; Gadella, T.W.J. Cyan and Yellow Super Fluorescent Proteins with Improved Brightness, Protein Folding, and FRET Förster Radius. *Biochemistry* **2006**, *45*, 6570–6580, doi:10.1021/bi0516273.
364. Lee Jihwan; Liu Zhuohe; Suzuki Peter H.; Ahrens John F.; Lai Shujuan; Lu Xiaoyu; Guan Sihui; St-Pierre François Versatile Phenotype-Activated Cell Sorting. *Science Advances* **6**, eabb7438, doi:10.1126/sciadv.abb7438.
365. De Meulenaere, E.; Nguyen Bich, N.; de Wergifosse, M.; Van Hecke, K.; Van Meervelt, L.; Vanderleyden, J.; Champagne, B.; Clays, K. Improving the Second-Order Nonlinear Optical Response of Fluorescent Proteins: The Symmetry Argument. *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 4061–4069, doi:10.1021/ja400098b.
366. Matz, M.V.; Fradkov, A.F.; Labas, Y.A.; Savitsky, A.P.; Zaraisky, A.G.; Markelov, M.L.; Lukyanov, S.A. Fluorescent Proteins from Nonbioluminescent Anthozoa Species. *Nature Biotechnology* **1999**, *17*, 969–973, doi:10.1038/13657.
367. Gross Larry A.; Baird Geoffrey S.; Hoffman Ross C.; Baldrige Kim K.; Tsien Roger Y. The Structure of the Chromophore within DsRed, a Red Fluorescent Protein from Coral. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2000**, *97*, 11990–11995, doi:10.1073/pnas.97.22.11990.
368. Strack, R.L.; Strongin, D.E.; Mets, L.; Glick, B.S.; Keenan, R.J. Chromophore Formation in DsRed Occurs by a Branched Pathway. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 8496–8505, doi:10.1021/ja1030084.
369. Nishizawa, K.; Kita, Y.; Kitayama, M.; Ishimoto, M. A Red Fluorescent Protein, DsRed2, as a Visual Reporter for Transient Expression and Stable Transformation in Soybean. *Plant Cell Reports* **2006**, *25*, 1355–1361, doi:10.1007/s00299-006-0210-x.



370. Strack, R.L.; Strongin, D.E.; Bhattacharyya, D.; Tao, W.; Berman, A.; Broxmeyer, H.E.; Keenan, R.J.; Glick, B.S. A Noncytotoxic DsRed Variant for Whole-Cell Labeling. *Nature Methods* **2008**, *5*, 955–957, doi:10.1038/nmeth.1264.
371. 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 U S A* **2000**, *97*, 11984–11989, doi:10.1073/pnas.97.22.11984.
372. Wang, X.; Song, K.; Li, Y.; Tang, L.; Deng, X. Single-Molecule Imaging and Computational Microscopy Approaches Clarify the Mechanism of the Dimerization and Membrane Interactions of Green Fluorescent Protein. *International Journal of Molecular Sciences* **2019**, *20*, doi:10.3390/ijms20061410.
373. Campbell Robert E.; Tour Oded; Palmer Amy E.; Steinbach Paul A.; Baird Geoffrey S.; Zacharias David A.; Tsien Roger Y. A Monomeric Red Fluorescent Protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2002**, *99*, 7877–7882, doi:10.1073/pnas.082243699.
374. Shaner, N.C.; Campbell, R.E.; Steinbach, P.A.; Giepmans, B.N.G.; Palmer, A.E.; Tsien, R.Y. Improved Monomeric Red, Orange and Yellow Fluorescent Proteins Derived from *Discosoma Sp.* Red Fluorescent Protein. *Nature Biotechnology* **2004**, *22*, 1567–1572, doi:10.1038/nbt1037.
375. Shaner, N.C.; Lin, M.Z.; McKeown, M.R.; Steinbach, P.A.; Hazelwood, K.L.; Davidson, M.W.; Tsien, R.Y. Improving the Photostability of Bright Monomeric Orange and Red Fluorescent Proteins. *Nature Methods* **2008**, *5*, 545–551, doi:10.1038/nmeth.1209.
376. Wang, L.; Jackson, W.C.; Steinbach, P.A.; Tsien, R.Y. Evolution of New Nonantibody Proteins via Iterative Somatic Hypermutation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2004**, *101*, 16745–16749, doi:10.1073/pnas.0407752101.
377. Masuda, H.; Takenaka, Y.; Yamaguchi, A.; Nishikawa, S.; Mizuno, H. A Novel Yellowish-Green Fluorescent Protein from the Marine Copepod, *Chiridius Poppei*, and Its Use as a Reporter Protein in HeLa Cells. *Gene* **2006**, *372*, 18–25, doi:10.1016/j.gene.2005.11.031.
378. Deheyn, D.D.; Kubokawa, K.; McCarthy, J.K.; Murakami, A.; Porrachia, M.; Rouse, G.W.; Holland, N.D. Endogenous Green Fluorescent Protein (GFP) in *Amphioxus*. *The Biological Bulletin* **2007**, *213*, 95–100, doi:10.2307/25066625.
379. Yampolsky, I.V.; Remington, S.J.; Martynov, V.I.; Potapov, V.K.; Lukyanov, S.; Lukyanov, K.A. Synthesis and Properties of the Chromophore of the AsFP595 Chromoprotein from *Anemonia Sulcata*. *Biochemistry* **2005**, *44*, 5788–5793, doi:10.1021/bi0476432.
380. Remington, S.J.; Wachter, R.M.; Yarbrough, D.K.; Branchaud, B.; Anderson, D.C.; Kallio, K.; Lukyanov, K.A. ZFP538, a Yellow-Fluorescent Protein from *Zoanthus*, Contains a Novel Three-Ring Chromophore. *Biochemistry* **2005**, *44*, 202–212, doi:10.1021/bi048383r.
381. Kikuchi, A.; Fukumura, E.; Karasawa, S.; Mizuno, H.; Miyawaki, A.; Shiro, Y. Structural Characterization of a Thiazoline-Containing Chromophore in an Orange Fluorescent Protein, Monomeric Kusabira Orange. *Biochemistry* **2008**, *47*, 11573–11580, doi:10.1021/bi800727v.
382. Mizuno, H.; Mal, T.K.; Tong, K.I.; Ando, R.; Furuta, T.; Ikura, M.; Miyawaki, A. Photo-Induced Peptide Cleavage in the Green-to-Red Conversion of a Fluorescent Protein. *Molecular Cell* **2003**, *12*, 1051–1058, doi:10.1016/S1097-2765(03)00393-9.
383. Chu, J.; Haynes, R.D.; Corbel, S.Y.; Li, P.; González-González, E.; Burg, J.S.; Ataie, N.J.; Lam, A.J.; Cranfill, P.J.; Baird, M.A.; et al. Non-Invasive Intravital Imaging of Cellular Differentiation with a Bright Red-Excitable Fluorescent Protein. *Nature Methods* **2014**, *11*, 572–578, doi:10.1038/nmeth.2888.

384. Li, Z.; Zhang, Z.; Bi, L.; Cui, Z.; Deng, J.; Wang, D.; Zhang, X.-E. Mutagenesis of MNeptune Red-Shifts Emission Spectrum to 681–685 Nm. *PLOS ONE* **2016**, *11*, e0148749, doi:10.1371/journal.pone.0148749.
385. Shcherbo, D.; Shemiakina, I.I.; Ryabova, A.V.; Luker, K.E.; Schmidt, B.T.; Souslova, E.A.; Gorodnicheva, T.V.; Strukova, L.; Shidlovskiy, K.M.; Britanova, O.V.; et al. Near-Infrared Fluorescent Proteins. *Nature Methods* **2010**, *7*, 827–829, doi:10.1038/nmeth.1501.
386. Ren, H.; Yang, B.; Ma, C.; Hu, Y.S.; Wang, P.G.; Wang, L. Cysteine Sulfoxidation Increases the Photostability of Red Fluorescent Proteins. *ACS Chem. Biol.* **2016**, *11*, 2679–2684, doi:10.1021/acschembio.6b00579.
387. Sarkisyan, K.S.; Goryashchenko, A.S.; Lidsky, P.V.; Gorbachev, D.A.; Bozhanova, N.G.; Gorokhovatsky, A.Yu.; Pereverzeva, A.R.; Ryumina, A.P.; Zherdeva, V.V.; Savitsky, A.P.; et al. Green Fluorescent Protein with Anionic Tryptophan-Based Chromophore and Long Fluorescence Lifetime. *Biophysical Journal* **2015**, *109*, 380–389, doi:10.1016/j.bpj.2015.06.018.
388. Kogure, T.; Karasawa, S.; Araki, T.; Saito, K.; Kinjo, M.; Miyawaki, A. A Fluorescent Variant of a Protein from the Stony Coral *Montipora* Facilitates Dual-Color Single-Laser Fluorescence Cross-Correlation Spectroscopy. *Nature Biotechnology* **2006**, *24*, 577–581, doi:10.1038/nbt1207.
389. Subach, O.M.; Vlaskina, A.V.; Agapova, Y.K.; Dorovatovskii, P.V.; Nikolaeva, A.Y.; Ivashkina, O.I.; Popov, V.O.; Piatkevich, K.D.; Khrenova, M.G.; Smirnova, T.A.; et al. LSSmScarlet, DCyRFP2s, DCyOFP2s and CRISPRed2s, Genetically Encoded Red Fluorescent Proteins with a Large Stokes Shift. *International Journal of Molecular Sciences* **2021**, *22*, doi:10.3390/ijms222312887.
390. Shcherbakova, D.M.; Hink, M.A.; Joosen, L.; Gadella, T.W.J.; Verkhusha, V.V. An Orange Fluorescent Protein with a Large Stokes Shift for Single-Excitation Multicolor FCCS and FRET Imaging. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 7913–7923, doi:10.1021/ja3018972.
391. Piatkevich Kiryl D.; Hulit James; Subach Oksana M.; Wu Bin; Abdulla Arian; Segall Jeffrey E.; Verkhusha Vladislav V. Monomeric Red Fluorescent Proteins with a Large Stokes Shift. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2010**, *107*, 5369–5374, doi:10.1073/pnas.0914365107.
392. Shen, Y.; Chen, Y.; Wu, J.; Shaner, N.C.; Campbell, R.E. Engineering of MCherry Variants with Long Stokes Shift, Red-Shifted Fluorescence, and Low Cytotoxicity. *PLOS ONE* **2017**, *12*, e0171257, doi:10.1371/journal.pone.0171257.
393. Yang, J.; Wang, L.; Yang, F.; Luo, H.; Xu, L.; Lu, J.; Zeng, S.; Zhang, Z. MBeRFP, an Improved Large Stokes Shift Red Fluorescent Protein. *PLOS ONE* **2013**, *8*, e64849, doi:10.1371/journal.pone.0064849.
394. Shemiakina, I.I.; Ermakova, G.V.; Cranfill, P.J.; Baird, M.A.; Evans, R.A.; Souslova, E.A.; Staroverov, D.B.; Gorokhovatsky, A.Y.; Putintseva, E.V.; Gorodnicheva, T.V.; et al. A Monomeric Red Fluorescent Protein with Low Cytotoxicity. *Nature Communications* **2012**, *3*, 1204, doi:10.1038/ncomms2208.
395. Manna, P.; Hung, S.-T.; Mukherjee, S.; Friis, P.; Simpson, D.M.; Lo, M.N.; Palmer, A.E.; Jimenez, R. Directed Evolution of Excited State Lifetime and Brightness in FusionRed Using a Microfluidic Sorter. *Integrative Biology* **2018**, *10*, 516–526, doi:10.1039/c8ib00103k.
396. Mukherjee, S.; Hung, S.-T.; Douglas, N.; Manna, P.; Thomas, C.; Ekrem, A.; Palmer, A.E.; Jimenez, R. Engineering of a Brighter Variant of the FusionRed Fluorescent Protein Using Lifetime Flow Cytometry and Structure-Guided Mutations. *Biochemistry* **2020**, *59*, 3669–3682, doi:10.1021/acs.biochem.0c00484.

397. Bajar, B.T.; Wang, E.S.; Lam, A.J.; Kim, B.B.; Jacobs, C.L.; Howe, E.S.; Davidson, M.W.; Lin, M.Z.; Chu, J. Improving Brightness and Photostability of Green and Red Fluorescent Proteins for Live Cell Imaging and FRET Reporting. *Scientific Reports* **2016**, *6*, 20889, doi:10.1038/srep20889.
398. Shaner, N.C.; Lambert, G.G.; Chammas, A.; Ni, Y.; Cranfill, P.J.; Baird, M.A.; Sell, B.R.; Allen, J.R.; Day, R.N.; Israelsson, M.; et al. A Bright Monomeric Green Fluorescent Protein Derived from Branchiostoma Lanceolatum. *Nature Methods* **2013**, *10*, 407–409, doi:10.1038/nmeth.2413.
399. Lambert, G.G.; Depernet, H.; Gotthard, G.; Schultz, D.T.; Navizet, I.; Lambert, T.; Adams, S.R.; Torreblanca-Zanca, A.; Chu, M.; Bindels, D.S.; et al. Aequorea's Secrets Revealed: New Fluorescent Proteins with Unique Properties for Bioimaging and Biosensing. *PLOS Biology* **2020**, *18*, e3000936, doi:10.1371/journal.pbio.3000936.
400. Kneen, M.; Farinas, J.; Li, Y.; Verkman, A.S. Green Fluorescent Protein as a Noninvasive Intracellular PH Indicator. *Biophysical Journal* **1998**, *74*, 1591–1599, doi:10.1016/S0006-3495(98)77870-1.
401. Miesenböck, G.; De Angelis, D.A.; Rothman, J.E. Visualizing Secretion and Synaptic Transmission with PH-Sensitive Green Fluorescent Proteins. *Nature* **1998**, *394*, 192–195, doi:10.1038/28190.
402. Sankaranarayanan, S.; De Angelis, D.; Rothman, J.E.; Ryan, T.A. The Use of PHluorins for Optical Measurements of Presynaptic Activity. *Biophys J* **2000**, *79*, 2199–2208, doi:10.1016/S0006-3495(00)76468-X.
403. Johnson, D.E.; Ai, H.-W.; Wong, P.; Young, J.D.; Campbell, R.E.; Casey, J.R. Red Fluorescent Protein PH Biosensor to Detect Concentrative Nucleoside Transport. *J Biol Chem* **2009**, *284*, 20499–20511, doi:10.1074/jbc.M109.019042.
404. Li, Y.; Tsien, R.W. PHTomato, a Red, Genetically Encoded Indicator That Enables Multiplex Interrogation of Synaptic Activity. *Nat Neurosci* **2012**, *15*, 1047–1053, doi:10.1038/nn.3126.
405. Mahon, M.J. PHluorin2: An Enhanced, Ratiometric, PH-Sensitive Green Fluorescent Protein. *Adv Biosci Biotechnol* **2011**, *2*, 132–137, doi:10.4236/abb.2011.23021.
406. Tantama, M.; Hung, Y.P.; Yellen, G. Imaging Intracellular PH in Live Cells with a Genetically Encoded Red Fluorescent Protein Sensor. *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 10034–10037, doi:10.1021/ja202902d.
407. Violot, S.; Carpentier, P.; Blanchoin, L.; Bourgeois, D. Reverse PH-Dependence of Chromophore Protonation Explains the Large Stokes Shift of the Red Fluorescent Protein MKeima. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 10356–10357, doi:10.1021/ja903695n.
408. Schulte, A.; Lorenzen, I.; Böttcher, M.; Plieth, C. A Novel Fluorescent PH Probe for Expression in Plants. *Plant Methods* **2006**, *2*, 7, doi:10.1186/1746-4811-2-7.
409. Bizzarri, R.; Arcangeli, C.; Arosio, D.; Ricci, F.; Faraci, P.; Cardarelli, F.; Beltram, F. Development of a Novel GFP-Based Ratiometric Excitation and Emission PH Indicator for Intracellular Studies. *Biophysical Journal* **2006**, *90*, 3300–3314, doi:10.1529/biophysj.105.074708.
410. Awaji, T.; Hirasawa, A.; Shirakawa, H.; Tsujimoto, G.; Miyazaki, S. Novel Green Fluorescent Protein-Based Ratiometric Indicators for Monitoring PH in Defined Intracellular Microdomains. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **2001**, *289*, 457–462, doi:10.1006/bbrc.2001.6004.
411. Chandy, G.; Grabe, M.; Moore, H.-P.H.; Machen, T.E. Proton Leak and CFTR in Regulation of Golgi PH in Respiratory Epithelial Cells. *American Journal of Physiology-Cell Physiology* **2001**, *281*, C908–C921, doi:10.1152/ajpcell.2001.281.3.C908.
412. Gjetting, K.S.K.; Ytting, C.K.; Schulz, A.; Fuglsang, A.T. Live Imaging of Intra- and Extracellular PH in Plants Using PHusion, a Novel Genetically Encoded Biosensor. *J Exp Bot* **2012**, *63*, 3207–3218, doi:10.1093/jxb/ers040.

413. Wachter, R.M.; Yarbrough, D.; Kallio, K.; Remington, S.J. Crystallographic and Energetic Analysis of Binding of Selected Anions to the Yellow Variants of Green Fluorescent Protein11Edited by D. C. Rees. *Journal of Molecular Biology* **2000**, *301*, 157–171, doi:10.1006/jmbi.2000.3905.
414. Jayaraman, S.; Haggie, P.; Wachter, R.M.; Remington, S.J.; Verkman, A.S. Mechanism and Cellular Applications of a Green Fluorescent Protein-Based Halide Sensor \*. *Journal of Biological Chemistry* **2000**, *275*, 6047–6050, doi:10.1074/jbc.275.9.6047.
415. Galiotta, L.J.V.; Haggie, P.M.; Verkman, A.S. Green Fluorescent Protein-Based Halide Indicators with Improved Chloride and Iodide Affinities. *FEBS Letters* **2001**, *499*, 220–224, doi:10.1016/S0014-5793(01)02561-3.
416. Markova, O.; Mukhtarov, M.; Real, E.; Jacob, Y.; Bregestovski, P. Genetically Encoded Chloride Indicator with Improved Sensitivity. *Journal of Neuroscience Methods* **2008**, *170*, 67–76, doi:10.1016/j.jneumeth.2007.12.016.
417. Zhong, S.; Navaratnam, D.; Santos-Sacchi, J. A Genetically-Encoded YFP Sensor with Enhanced Chloride Sensitivity, Photostability and Reduced PH Interference Demonstrates Augmented Transmembrane Chloride Movement by Gerbil Prestin (SLC26a5). *PLOS ONE* **2014**, *9*, e99095, doi:10.1371/journal.pone.0099095.
418. Lidsky, P.V.; Lukyanov, K.A.; Misra, T.; Handke, B.; Mishin, A.S.; Lehner, C.F. A Genetically Encoded Fluorescent Probe for Imaging of Oxygenation Gradients in Living *Drosophila*. *Development* **2018**, *145*, dev156257, doi:10.1242/dev.156257.
419. Yanushevich, Y.G.; Staroverov, D.B.; Savitsky, A.P.; Fradkov, A.F.; Gurskaya, N.G.; Bulina, M.E.; Lukyanov, K.A.; Lukyanov, S.A. A Strategy for the Generation of Non-Aggregating Mutants of Anthozoa Fluorescent Proteins. *FEBS Letters* **2002**, *511*, 11–14, doi:10.1016/S0014-5793(01)03263-X.
420. Terskikh Alexey; Fradkov Arkady; Ermakova Galina; Zarausky Andrey; Tan Patrick; Kajava Andrey V.; Zhao Xiaoning; Lukyanov Sergey; Matz Mikhail; Kim Stuart; et al. “Fluorescent Timer”: Protein That Changes Color with Time. *Science* **2000**, *290*, 1585–1588, doi:10.1126/science.290.5496.1585.
421. Verkhusha, V.V.; Chudakov, D.M.; Gurskaya, N.G.; Lukyanov, S.; Lukyanov, K.A. Common Pathway for the Red Chromophore Formation in Fluorescent Proteins and Chromoproteins. *Chemistry & Biology* **2004**, *11*, 845–854, doi:10.1016/j.chembiol.2004.04.007.
422. Elowitz, M.B.; Surette, M.G.; Wolf, P.-E.; Stock, J.; Leibler, S. Photoactivation Turns Green Fluorescent Protein Red. *Current Biology* **1997**, *7*, 809–812, doi:10.1016/S0960-9822(06)00342-3.
423. Takahashi, E.; Takano, T.; Numata, A.; Hayashi, N.; Okano, S.; Nakajima, O.; Nomura, Y.; Sato, M. Genetic Oxygen Sensor. In Proceedings of the Oxygen Transport to Tissue XXVI; Okunieff, P., Williams, J., Chen, Y., Eds.; Springer US: Boston, MA, 2005; pp. 39–44.
424. Takahashi, E.; Sato, M. Imaging of Oxygen Gradients in Monolayer Cultured Cells Using Green Fluorescent Protein. *American Journal of Physiology-Cell Physiology* **2010**, *299*, C1318–C1323, doi:10.1152/ajpcell.00254.2010.
425. Takahashi, E.; Takano, T.; Nomura, Y.; Okano, S.; Nakajima, O.; Sato, M. In Vivo Oxygen Imaging Using Green Fluorescent Protein. *American Journal of Physiology-Cell Physiology* **2006**, *291*, C781–C787, doi:10.1152/ajpcell.00067.2006.
426. Barondeau, D.P.; Kassmann, C.J.; Tainer, J.A.; Getzoff, E.D. Structural Chemistry of a Green Fluorescent Protein Zn Biosensor. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 3522–3524, doi:10.1021/ja0176954.
427. Watanabe, T.M.; Imada, K.; Yoshizawa, K.; Nishiyama, M.; Kato, C.; Abe, F.; Morikawa, T.J.; Kinoshita, M.; Fujita, H.; Yanagida, T. Glycine Insertion Makes Yellow Fluorescent

- Protein Sensitive to Hydrostatic Pressure. *PLOS ONE* **2013**, *8*, e73212, doi:10.1371/journal.pone.0073212.
428. Richmond, T.A.; Takahashi, T.T.; Shimkhada, R.; Bernsdorf, J. Engineered Metal Binding Sites on Green Fluorescence Protein. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **2000**, *268*, 462–465, doi:10.1006/bbrc.1999.1244.
429. Yu, X.; Strub, M.-P.; Barnard, T.J.; Noinaj, N.; Piszczek, G.; Buchanan, S.K.; Taraska, J.W. An Engineered Palette of Metal Ion Quenchable Fluorescent Proteins. *PLOS ONE* **2014**, *9*, e95808, doi:10.1371/journal.pone.0095808.
430. Tang Shen; Wong Hing-Cheung; Wang Zhong-Min; Huang Yun; Zou Jin; Zhuo You; Pennati Andrea; Gadda Giovanni; Delbono Osvaldo; Yang Jenny J. Design and Application of a Class of Sensors to Monitor Ca<sup>2+</sup> Dynamics in High Ca<sup>2+</sup> Concentration Cellular Compartments. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2011**, *108*, 16265–16270, doi:10.1073/pnas.1103015108.
431. Reddish, F.N.; Miller, C.L.; Deng, X.; Dong, B.; Patel, A.A.; Ghane, M.A.; Mosca, B.; McBean, C.; Wu, S.; Solntsev, K.M.; et al. Rapid Subcellular Calcium Responses and Dynamics by Calcium Sensor G-CatchER+. *iScience* **2021**, *24*, 102129, doi:10.1016/j.isci.2021.102129.
432. Deng, X.; Yao, X.-Q.; Berglund, K.; Dong, B.; Ouedraogo, D.; Ghane, M.A.; Zhuo, Y.; McBean, C.; Wei, Z.Z.; Gozem, S.; et al. Tuning Protein Dynamics to Sense Rapid Endoplasmic-Reticulum Calcium Dynamics. *Angewandte Chemie International Edition* **2021**, *60*, 23289–23298, doi:10.1002/anie.202108443.
433. Zhuo, Y.; Solntsev, K.M.; Reddish, F.; Tang, S.; Yang, J.J. Effect of Ca<sup>2+</sup> on the Steady-State and Time-Resolved Emission Properties of the Genetically Encoded Fluorescent Sensor CatchER. *J. Phys. Chem. B* **2015**, *119*, 2103–2111, doi:10.1021/jp501707n.
434. Østergaard, H.; Henriksen, A.; Hansen, F.G.; Winther, J.R. Shedding Light on Disulfide Bond Formation: Engineering a Redox Switch in Green Fluorescent Protein. *EMBO J* **2001**, *20*, 5853–5862, doi:10.1093/emboj/20.21.5853.
435. Hanson, G.T.; Aggeler, R.; Oglesbee, D.; Cannon, M.; Capaldi, R.A.; Tsien, R.Y.; Remington, S.J. Investigating Mitochondrial Redox Potential with Redox-Sensitive Green Fluorescent Protein Indicators \*. *Journal of Biological Chemistry* **2004**, *279*, 13044–13053, doi:10.1074/jbc.M312846200.
436. Schwarzländer, M.; Fricker, M.D.; Müller, C.; Marty, L.; Brach, T.; Novak, J.; Sweetlove, L.J.; Hell, R.; Meyer, A.J. Confocal Imaging of Glutathione Redox Potential in Living Plant Cells. *Journal of Microscopy* **2008**, *231*, 299–316, doi:10.1111/j.1365-2818.2008.02030.x.
437. Østergaard, H.; Tachibana, C.; Winther, J.R. Monitoring Disulfide Bond Formation in the Eukaryotic Cytosol. *J Cell Biol* **2004**, *166*, 337–345, doi:10.1083/jcb.200402120.
438. Meyer, A.J.; Brach, T.; Marty, L.; Kreye, S.; Rouhier, N.; Jacquot, J.-P.; Hell, R. Redox-Sensitive GFP in Arabidopsis Thaliana Is a Quantitative Biosensor for the Redox Potential of the Cellular Glutathione Redox Buffer. *The Plant Journal* **2007**, *52*, 973–986, doi:10.1111/j.1365-313X.2007.03280.x.
439. Cannon, M.B.; Remington, S.J. Re-Engineering Redox-Sensitive Green Fluorescent Protein for Improved Response Rate. *Protein Sci* **2006**, *15*, 45–57, doi:10.1110/ps.051734306.
440. Hansen, R.E.; Østergaard, H.; Winther, J.R. Increasing the Reactivity of an Artificial Dithiol–Disulfide Pair through Modification of the Electrostatic Milieu. *Biochemistry* **2005**, *44*, 5899–5906, doi:10.1021/bi0500372.
441. Björnberg, O.; Østergaard, H.; Winther, J.R. Mechanistic Insight Provided by Glutaredoxin within a Fusion to Redox-Sensitive Yellow Fluorescent Protein. *Biochemistry* **2006**, *45*, 2362–2371, doi:10.1021/bi0522495.

442. Gutscher, M.; Pauleau, A.-L.; Marty, L.; Brach, T.; Wabnitz, G.H.; Samstag, Y.; Meyer, A.J.; Dick, T.P. Real-Time Imaging of the Intracellular Glutathione Redox Potential. *Nature Methods* **2008**, *5*, 553–559, doi:10.1038/nmeth.1212.
443. Bhaskar, A.; Chawla, M.; Mehta, M.; Parikh, P.; Chandra, P.; Bhave, D.; Kumar, D.; Carroll, K.S.; Singh, A. Reengineering Redox Sensitive GFP to Measure Mycothiol Redox Potential of Mycobacterium Tuberculosis during Infection. *PLOS Pathogens* **2014**, *10*, e1003902, doi:10.1371/journal.ppat.1003902.
444. Loi, V.V.; Harms, M.; Müller, M.; Huyen, N.T.T.; Hamilton, C.J.; Hochgräfe, F.; Pané-Farré, J.; Antelmann, H. Real-Time Imaging of the Bacillithiol Redox Potential in the Human Pathogen Staphylococcus Aureus Using a Genetically Encoded Bacilliredoxin-Fused Redox Biosensor. *Antioxidants & Redox Signaling* **2017**, *26*, 835–848, doi:10.1089/ars.2016.6733.
445. Ebersoll, S.; Bogacz, M.; Günter, L.M.; Dick, T.P.; Krauth-Siegel, R.L. A Tryparedoxin-Coupled Biosensor Reveals a Mitochondrial Trypanothione Metabolism in Trypanosomes. *eLife* **2020**, *9*, e53227, doi:10.7554/eLife.53227.
446. Gutscher, M.; Sobotta, M.C.; Wabnitz, G.H.; Ballikaya, S.; Meyer, A.J.; Samstag, Y.; Dick, T.P. Proximity-Based Protein Thiol Oxidation by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Scavenging Peroxidases. *J Biol Chem* **2009**, *284*, 31532–31540, doi:10.1074/jbc.M109.059246.
447. Morgan, B.; Van Laer, K.; Owusu, T.N.E.; Ezeriņa, D.; Pastor-Flores, D.; Amponsah, P.S.; Tursch, A.; Dick, T.P. Real-Time Monitoring of Basal H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Levels with Peroxiredoxin-Based Probes. *Nature Chemical Biology* **2016**, *12*, 437–443, doi:10.1038/nchembio.2067.
448. Sugiura, K.; Nagai, T.; Nakano, M.; Ichinose, H.; Nakabayashi, T.; Ohta, N.; Hisabori, T. Redox Sensor Proteins for Highly Sensitive Direct Imaging of Intracellular Redox State. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **2015**, *457*, 242–248, doi:10.1016/j.bbrc.2014.12.095.
449. Shokhina, A.G.; Kostyuk, A.I.; Ermakova, Y.G.; Panova, A.S.; Staroverov, D.B.; Egorov, E.S.; Baranov, M.S.; van Belle, G.J.; Katschinski, D.M.; Belousov, V.V.; et al. Red Fluorescent Redox-Sensitive Biosensor Grx1-RoCherry. *Redox Biology* **2019**, *21*, 101071, doi:10.1016/j.redox.2018.101071.
450. Dooley, C.T.; Dore, T.M.; Hanson, G.T.; Jackson, W.C.; Remington, S.J.; Tsien, R.Y. Imaging Dynamic Redox Changes in Mammalian Cells with Green Fluorescent Protein Indicators \*. *Journal of Biological Chemistry* **2004**, *279*, 22284–22293, doi:10.1074/jbc.M312847200.
451. Austin Cary D.; Wen Xiaohui; Gazzard Lewis; Nelson Christopher; Scheller Richard H.; Scales Suzie J. Oxidizing Potential of Endosomes and Lysosomes Limits Intracellular Cleavage of Disulfide-Based Antibody–Drug Conjugates. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2005**, *102*, 17987–17992, doi:10.1073/pnas.0509035102.
452. Birk, J.; Meyer, M.; Aller, I.; Hansen, H.G.; Odermatt, A.; Dick, T.P.; Meyer, A.J.; Appenzeller-Herzog, C. Endoplasmic Reticulum: Reduced and Oxidized Glutathione Revisited. *Journal of Cell Science* **2013**, *126*, 1604–1617, doi:10.1242/jcs.117218.
453. 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**, *47*, 8678–8688, doi:10.1021/bi800498g.
454. Aller, I.; Rouhier, N.; Meyer, A. Development of RoGFP2-Derived Redox Probes for Measurement of the Glutathione Redox Potential in the Cytosol of Severely Glutathione-Deficient Rml1 Seedlings. *Frontiers in Plant Science* **2013**, *4*.
455. Arias-Barreiro, C.R.; Okazaki, K.; Koutsaftis, A.; Inayat-Hussain, S.H.; Tani, A.; Katsuhara, M.; Kimbara, K.; Mori, I.C. A Bacterial Biosensor for Oxidative Stress Using the Constitutively Expressed Redox-Sensitive Protein RoGFP2. *Sensors* **2010**, *10*, doi:10.3390/s100706290.

456. van der Heijden, J.; Vogt, S.L.; Reynolds, L.A.; Peña-Díaz, J.; Tupin, A.; Aussel, L.; Finlay, B.B. Exploring the Redox Balance inside Gram-Negative Bacteria with Redox-Sensitive GFP. *Free Radical Biology and Medicine* **2016**, *91*, 34–44, doi:10.1016/j.freeradbiomed.2015.11.029.
457. van der Heijden, J.; Bosman, E.S.; Reynolds, L.A.; Finlay, B.B. Direct Measurement of Oxidative and Nitrosative Stress Dynamics in Salmonella inside Macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2015**, *112*, 560–565, doi:10.1073/pnas.1414569112.
458. Ayer, A.; Sanwald, J.; Pillay, B.A.; Meyer, A.J.; Perrone, G.G.; Dawes, I.W. Distinct Redox Regulation in Sub-Cellular Compartments in Response to Various Stress Conditions in *Saccharomyces Cerevisiae*. *PLOS ONE* **2013**, *8*, e65240, doi:10.1371/journal.pone.0065240.
459. Meyer, A.J.; Dick, T.P. Fluorescent Protein-Based Redox Probes. *Antioxidants & Redox Signaling* **2010**, *13*, 621–650, doi:10.1089/ars.2009.2948.
460. Müller, A.; Schneider, J.F.; Degrossoli, A.; Lupilova, N.; Dick, T.P.; Leichert, L.I. Systematic in Vitro Assessment of Responses of RoGFP2-Based Probes to Physiologically Relevant Oxidant Species. *Free Radical Biology and Medicine* **2017**, *106*, 329–338, doi:10.1016/j.freeradbiomed.2017.02.044.
461. Schendzielorz, G.; Dippong, M.; Grünberger, A.; Kohlheyer, D.; Yoshida, A.; Binder, S.; Nishiyama, C.; Nishiyama, M.; Bott, M.; Eggeling, L. Taking Control over Control: Use of Product Sensing in Single Cells to Remove Flux Control at Key Enzymes in Biosynthesis Pathways. *ACS Synth. Biol.* **2014**, *3*, 21–29, doi:10.1021/sb400059y.
462. Binder, S.; Schendzielorz, G.; Stäbler, N.; Krumbach, K.; Hoffmann, K.; Bott, M.; Eggeling, L. A High-Throughput Approach to Identify Genomic Variants of Bacterial Metabolite Producers at the Single-Cell Level. *Genome Biology* **2012**, *13*, R40, doi:10.1186/gb-2012-13-5-r40.
463. Mustafi, N.; Grünberger, A.; Kohlheyer, D.; Bott, M.; Frunzke, J. The Development and Application of a Single-Cell Biosensor for the Detection of l-Methionine and Branched-Chain Amino Acids. *Metabolic Engineering* **2012**, *14*, 449–457, doi:10.1016/j.ymben.2012.02.002.
464. Siedler, S.; Stahlhut, S.G.; Malla, S.; Maury, J.; Neves, A.R. Novel Biosensors Based on Flavonoid-Responsive Transcriptional Regulators Introduced into *Escherichia Coli*. *Metabolic Engineering* **2014**, *21*, 2–8, doi:10.1016/j.ymben.2013.10.011.
465. Ellis, J.M.; Wolfgang, M.J. A Genetically Encoded Metabolite Sensor for Malonyl-CoA. *Chemistry & Biology* **2012**, *19*, 1333–1339, doi:10.1016/j.chembiol.2012.08.018.
466. Xu, P.; Wang, W.; Li, L.; Bhan, N.; Zhang, F.; Koffas, M.A.G. Design and Kinetic Analysis of a Hybrid Promoter–Regulator System for Malonyl-CoA Sensing in *Escherichia Coli*. *ACS Chem. Biol.* **2014**, *9*, 451–458, doi:10.1021/cb400623m.
467. Uchiyama Taku; Miyazaki Kentaro Product-Induced Gene Expression, a Product-Responsive Reporter Assay Used To Screen Metagenomic Libraries for Enzyme-Encoding Genes. *Applied and Environmental Microbiology* **2010**, *76*, 7029–7035, doi:10.1128/AEM.00464-10.
468. Weber, W.; Link, N.; Fussenegger, M. A Genetic Redox Sensor for Mammalian Cells. *Metabolic Engineering* **2006**, *8*, 273–280, doi:10.1016/j.ymben.2005.12.004.
469. Warawan, E.; Supaluk, P.; Chartchalerm, I.-N.; Virapong, P. Development of Bacterial Cell-Based System for Intracellular Antioxidant Activity Screening Assay Using Green Fluorescence Protein (GFP) Reporter. *African Journal of Biotechnology* **2012**, *11*, 6934–6945.
470. Siedler, S.; Schendzielorz, G.; Binder, S.; Eggeling, L.; Bringer, S.; Bott, M. SoxR as a Single-Cell Biosensor for NADPH-Consuming Enzymes in *Escherichia Coli*. *ACS Synth. Biol.* **2014**, *3*, 41–47, doi:10.1021/sb400110j.

471. Kardashliev, T.; Weingartner, A.; Romero, E.; Schwaneberg, U.; Fraaije, M.; Panke, S.; Held, M. Whole-Cell Screening of Oxidative Enzymes Using Genetically Encoded Sensors. *Chem. Sci.* **2021**, *12*, 14766–14772, doi:10.1039/D1SC02578C.
472. Soudier, P.; Duigou, T.; Voyvodic, P.L.; Zúñiga, A.; Bazi-Kabbaj, K.; Kushwaha, M.; Bonnet, J.; Faulon, J.-L. PeroxiHUB: A Modular Cell-Free Biosensing Platform Using H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> as Signal Integrator. *bioRxiv* **2022**, 2022.03.16.484621, doi:10.1101/2022.03.16.484621.
473. Brahimi-Horn, M.C.; Pouyssegur, J. HIF at a Glance. *Journal of Cell Science* **2009**, *122*, 1055–1057, doi:10.1242/jcs.035022.
474. Boast, K.; Binley, K.; Iqbal, S.; Price, T.; Spearman, H.; Kingsman, S.; Kingsman, A.; Naylor, S. Characterization of Physiologically Regulated Vectors for the Treatment of Ischemic Disease. *Human Gene Therapy* **1999**, *10*, 2197–2208, doi:10.1089/10430349950017185.
475. Shibata, T.; Giaccia, A.J.; Brown, J.M. Development of a Hypoxia-Responsive Vector for Tumor-Specific Gene Therapy. *Gene Therapy* **2000**, *7*, 493–498, doi:10.1038/sj.gt.3301124.
476. Fomicheva, E.V.; Turner, I.I.; Edwards, T.G.; Hoff, J.; Arden, E.; D’Alec, L.G.; Metzger, J.M. Double Oxygen-Sensing Vector System for Robust Hypoxia/Ischemia-Regulated Gene Induction in Cardiac Muscle In Vitro and In Vivo. *Molecular Therapy* **2008**, *16*, 1594–1601, doi:10.1038/mt.2008.136.
477. Takeuchi, Y.; Inubushi, M.; Jin, Y.-N.; Murai, C.; Tsuji, A.B.; Hata, H.; Kitagawa, Y.; Saga, T. Detailed Assessment of Gene Activation Levels by Multiple Hypoxia-Responsive Elements under Various Hypoxic Conditions. *Annals of Nuclear Medicine* **2014**, *28*, 1011–1019, doi:10.1007/s12149-014-0901-2.
478. Cai, H.; Mu, Z.; Jiang, Z.; Wang, Y.; Yang, G.-Y.; Zhang, Z. Hypoxia-Controlled Matrix Metalloproteinase-9 Hyperexpression Promotes Behavioral Recovery after Ischemia. *Neuroscience Bulletin* **2015**, *31*, 550–560, doi:10.1007/s12264-015-1533-1.
479. Semenza, G.L.; Jiang, B.-H.; Leung, S.W.; Passantino, R.; Concordet, J.-P.; Maire, P.; Giallongo, A. Hypoxia Response Elements in the Aldolase A, Enolase 1, and Lactate Dehydrogenase A Gene Promoters Contain Essential Binding Sites for Hypoxia-Inducible Factor 1 \*. *Journal of Biological Chemistry* **1996**, *271*, 32529–32537, doi:10.1074/jbc.271.51.32529.
480. Post, D.; Van Meir, E. Generation of Bidirectional Hypoxia/HIF-Responsive Expression Vectors to Target Gene Expression to Hypoxic Cells. *Gene Therapy* **2001**, *8*, 1801–1807, doi:10.1038/sj.gt.3301605.
481. Zhou, W.; Dosey, T.L.; Biechele, T.; Moon, R.T.; Horwitz, M.S.; Ruohola-Baker, H. Assessment of Hypoxia Inducible Factor Levels in Cancer Cell Lines upon Hypoxic Induction Using a Novel Reporter Construct. *PLOS ONE* **2011**, *6*, e27460, doi:10.1371/journal.pone.0027460.
482. Serganova, I.; Doubrovin, M.; Vider, J.; Ponomarev, V.; Soghomonyan, S.; Beresten, T.; Ageyeva, L.; Serganov, A.; Cai, S.; Balatoni, J.; et al. Molecular Imaging of Temporal Dynamics and Spatial Heterogeneity of Hypoxia-Inducible Factor-1 Signal Transduction Activity in Tumors in Living Mice. *Cancer Research* **2004**, *64*, 6101–6108, doi:10.1158/0008-5472.CAN-04-0842.
483. Cao, Y.; Li, C.-Y.; Moeller, B.J.; Yu, D.; Zhao, Y.; Dreher, M.R.; Shan, S.; Dewhirst, M.W. Observation of Incipient Tumor Angiogenesis That Is Independent of Hypoxia and Hypoxia Inducible Factor-1 Activation. *Cancer Research* **2005**, *65*, 5498–5505, doi:10.1158/0008-5472.CAN-04-4553.
484. Wen, B.; Burgman, P.; Zanzonico, P.; O’Donoghue, J.; Cai, S.; Finn, R.; Serganova, I.; Blasberg, R.; Gelovani, J.; Li, G.C.; et al. A Preclinical Model for Noninvasive Imaging of Hypoxia-Induced Gene Expression; Comparison with an Exogenous Marker of Tumor



- Hypoxia. *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging* **2004**, *31*, 1530–1538, doi:10.1007/s00259-004-1673-z.
485. Moeller, B.J.; Cao, Y.; Li, C.Y.; Dewhirst, M.W. Radiation Activates HIF-1 to Regulate Vascular Radiosensitivity in Tumors: Role of Reoxygenation, Free Radicals, and Stress Granules. *Cancer Cell* **2004**, *5*, 429–441, doi:10.1016/S1535-6108(04)00115-1.
486. Doran, D.M.; Kulkarni-Datar, K.; Cool, D.R.; Brown, T.L. Hypoxia Activates Constitutive Luciferase Reporter Constructs. *Biochimie* **2011**, *93*, 361–368, doi:10.1016/j.biochi.2010.10.009.
487. D'Angelo, G.; Duplan, E.; Boyer, N.; Vigne, P.; Frelin, C. Hypoxia Up-Regulates Prolyl Hydroxylase Activity: A feedback mechanism that limits hif-1 responses during reoxygenation \*. *Journal of Biological Chemistry* **2003**, *278*, 38183–38187, doi:10.1074/jbc.M302244200.
488. D'Angelo, G.; Duplan, E.; Vigne, P.; Frelin, C. Cyclosporin A Prevents the Hypoxic Adaptation by Activating Hypoxia-Inducible Factor-1 $\alpha$  Pro-564 Hydroxylation \*. *Journal of Biological Chemistry* **2003**, *278*, 15406–15411, doi:10.1074/jbc.M211293200.
489. Le Anne; Stine Zachary E.; Nguyen Christopher; Afzal Junaid; Sun Peng; Hamaker Max; Siegel Nicholas M.; Gouw Arvin M.; Kang Byung-hak; Yu Shu-Han; et al. Tumorigenicity of Hypoxic Respiring Cancer Cells Revealed by a Hypoxia–Cell Cycle Dual Reporter. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2014**, *111*, 12486–12491, doi:10.1073/pnas.1402012111.
490. Harada, H.; Kizaka-Kondoh, S.; Itasaka, S.; Shibuya, K.; Morinibu, A.; Shinomiya, K.; Hiraoka, M. The Combination of Hypoxia-Response Enhancers and an Oxygen-Dependent Proteolytic Motif Enables Real-Time Imaging of Absolute HIF-1 Activity in Tumor Xenografts. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **2007**, *360*, 791–796, doi:10.1016/j.bbrc.2007.06.149.
491. Wang, Y.; Wang, H.; Li, J.; Entenberg, D.; Xue, A.; Wang, W.; Condeelis, J. Direct Visualization of the Phenotype of Hypoxic Tumor Cells at Single Cell Resolution in Vivo Using a New Hypoxia Probe. *null* **2016**, *5*, e1187803, doi:10.1080/21659087.2016.1187803.
492. Danhier, P.; Krishnamachary, B.; Bharti, S.; Kakkad, S.; Mironchik, Y.; Bhujwala, Z.M. Combining Optical Reporter Proteins with Different Half-Lives to Detect Temporal Evolution of Hypoxia and Reoxygenation in Tumors. *Neoplasia* **2015**, *17*, 871–881, doi:10.1016/j.neo.2015.11.007.
493. Erapanedi, R.; Belousov, V.V.; Schäfers, M.; Kiefer, F. A Novel Family of Fluorescent Hypoxia Sensors Reveal Strong Heterogeneity in Tumor Hypoxia at the Cellular Level. *The EMBO Journal* **2016**, *35*, 102–113, doi:10.15252/embj.201592775.
494. Forster, Th. Energiewanderung Und Fluoreszenz. *Naturwissenschaften* **1946**, *33*, 166–175, doi:10.1007/BF00585226.
495. Shrestha, D.; Jenei, A.; Nagy, P.; Vereb, G.; Szöllösi, J. Understanding FRET as a Research Tool for Cellular Studies. *International Journal of Molecular Sciences* **2015**, *16*, doi:10.3390/ijms16046718.
496. Mitra, R.D.; Silva, C.M.; Youvan, D.C. Fluorescence Resonance Energy Transfer between Blue-Emitting and Red-Shifted Excitation Derivatives of the Green Fluorescent Protein. *Gene* **1996**, *173*, 13–17, doi:10.1016/0378-1119(95)00768-7.
497. Romoser, V.A.; Hinkle, P.M.; Persechini, A. Detection in Living Cells of Ca<sup>2+</sup>-Dependent Changes in the Fluorescence Emission of an Indicator Composed of Two Green Fluorescent Protein Variants Linked by a Calmodulin-Binding Sequence: A new class of fluorescent indicators \*. *Journal of Biological Chemistry* **1997**, *272*, 13270–13274, doi:10.1074/jbc.272.20.13270.

498. Miyawaki, A.; Llopis, J.; Heim, R.; McCaffery, J.M.; Adams, J.A.; Ikura, M.; Tsien, R.Y. Fluorescent Indicators for Ca<sup>2+</sup>-based on Green Fluorescent Proteins and Calmodulin. *Nature* **1997**, *388*, 882–887, doi:10.1038/42264.
499. Lindenburg, L.; Merckx, M. Engineering Genetically Encoded FRET Sensors. *Sensors* **2014**, *14*, doi:10.3390/s140711691.
500. Florian Sizaire FRET-Based Biosensors: Genetically Encoded Tools to Track Kinase Activity in Living Cells. In *Protein Phosphorylation*; Marc Tramier ED1 - Claude Prigent, Ed.; IntechOpen: Rijeka, 2017; p. Ch. 9 ISBN 978-953-51-3626-2.
501. Cost, A.-L.; Ringer, P.; Chrostek-Grashoff, A.; Grashoff, C. How to Measure Molecular Forces in Cells: A Guide to Evaluating Genetically-Encoded FRET-Based Tension Sensors. *Cell Mol Bioeng* **2015**, *8*, 96–105, doi:10.1007/s12195-014-0368-1.
502. Cost, A.-L.; Khalaji, S.; Grashoff, C. Genetically Encoded FRET-Based Tension Sensors. *Current Protocols in Cell Biology* **2019**, *83*, e85, doi:10.1002/cpcb.85.
503. Bando, Y.; Grimm, C.; Cornejo, V.H.; Yuste, R. Genetic Voltage Indicators. *BMC Biology* **2019**, *17*, 71, doi:10.1186/s12915-019-0682-0.
504. Boersma, A.J.; Zuhorn, I.S.; Poolman, B. A Sensor for Quantification of Macromolecular Crowding in Living Cells. *Nature Methods* **2015**, *12*, 227–229, doi:10.1038/nmeth.3257.
505. Kolossov, V.L.; Leslie, M.T.; Chatterjee, A.; Sheehan, B.M.; Kenis, P.J.A.; Gaskins, H.R. Förster Resonance Energy Transfer-Based Sensor Targeting Endoplasmic Reticulum Reveals Highly Oxidative Environment. *Exp Biol Med (Maywood)* **2012**, *237*, 652–662, doi:10.1258/ebm.2012.011436.
506. Enyedi, B.; Zana, M.; Donkó, Á.; Geiszt, M. Spatial and Temporal Analysis of NADPH Oxidase-Generated Hydrogen Peroxide Signals by Novel Fluorescent Reporter Proteins. *Antioxidants & Redox Signaling* **2013**, *19*, 523–534, doi:10.1089/ars.2012.4594.
507. Yano, T.; Oku, M.; Akeyama, N.; Itoyama, A.; Yurimoto, H.; Kuge, S.; Fujiki, Y.; Sakai, Y. A Novel Fluorescent Sensor Protein for Visualization of Redox States in the Cytoplasm and in Peroxisomes. *Mol Cell Biol* **2010**, *30*, 3758–3766, doi:10.1128/MCB.00121-10.
508. Sugiura, K.; Yokochi, Y.; Fu, N.; Fukaya, Y.; Yoshida, K.; Mihara, S.; Hisabori, T. The Thioredoxin (Trx) Redox State Sensor Protein Can Visualize Trx Activities in the Light/Dark Response in Chloroplasts. *Journal of Biological Chemistry* **2019**, *294*, 12091–12098, doi:10.1074/jbc.RA119.007616.
509. Zhao, F.-L.; Zhang, C.; Zhang, C.; Tang, Y.; Ye, B.-C. A Genetically Encoded Biosensor for in Vitro and in Vivo Detection of NADP<sup>+</sup>. *Biosensors and Bioelectronics* **2016**, *77*, 901–906, doi:10.1016/j.bios.2015.10.063.
510. Nomata, J.; Hisabori, T. Development of Heme Protein Based Oxygen Sensing Indicators. *Scientific Reports* **2018**, *8*, 11849, doi:10.1038/s41598-018-30329-5.
511. Rozhin Penjweini; Alessio Andreoni; Tilman Rosales; Jeonghan Kim; Michael D. Brenner; Dan L. Sackett; Jay H. Chung; Jay R. Knutson Intracellular Oxygen Mapping Using a Myoglobin-MCherry Probe with Fluorescence Lifetime Imaging. *Journal of Biomedical Optics* **2018**, *23*, 1–14, doi:10.1117/1.JBO.23.10.107001.
512. Ai, H.; Henderson, J.N.; Remington, S.J.; Campbell, R.E. Directed Evolution of a Monomeric, Bright and Photostable Version of Clavularia Cyan Fluorescent Protein: Structural Characterization and Applications in Fluorescence Imaging. *Biochemical Journal* **2006**, *400*, 531–540, doi:10.1042/BJ20060874.
513. Lam, A.J.; St-Pierre, F.; Gong, Y.; Marshall, J.D.; Cranfill, P.J.; Baird, M.A.; McKeown, M.R.; Wiedenmann, J.; Davidson, M.W.; Schnitzer, M.J.; et al. Improving FRET Dynamic Range with Bright Green and Red Fluorescent Proteins. *Nature Methods* **2012**, *9*, 1005–1012, doi:10.1038/nmeth.2171.
514. Ouyang, M.; Huang, H.; Shaner, N.C.; Remacle, A.G.; Shiryaev, S.A.; Strongin, A.Y.; Tsien, R.Y.; Wang, Y. Simultaneous Visualization of Protumorigenic Src and MT1-MMP

- Activities with Fluorescence Resonance Energy Transfer. *Cancer Research* **2010**, *70*, 2204–2212, doi:10.1158/0008-5472.CAN-09-3698.
515. Su, T.; Pan, S.; Luo, Q.; Zhang, Z. Monitoring of Dual Bio-Molecular Events Using FRET Biosensors Based on MTagBFP/SfGFP and MVENUS/MKOok Fluorescent Protein Pairs. *Biosensors and Bioelectronics* **2013**, *46*, 97–101, doi:10.1016/j.bios.2013.02.024.
  516. Ai, H.; Hazelwood, K.L.; Davidson, M.W.; Campbell, R.E. Fluorescent Protein FRET Pairs for Ratiometric Imaging of Dual Biosensors. *Nature Methods* **2008**, *5*, 401–403, doi:10.1038/nmeth.1207.
  517. Niino, Y.; Hotta, K.; Oka, K. Simultaneous Live Cell Imaging Using Dual FRET Sensors with a Single Excitation Light. *PLOS ONE* **2009**, *4*, e6036, doi:10.1371/journal.pone.0006036.
  518. Bajar, B.T.; Wang, E.S.; Zhang, S.; Lin, M.Z.; Chu, J. A Guide to Fluorescent Protein FRET Pairs. *Sensors (Basel)* **2016**, *16*, 1488, doi:10.3390/s16091488.
  519. Day, R.N.; Davidson, M.W. Fluorescent Proteins for FRET Microscopy: Monitoring Protein Interactions in Living Cells. *BioEssays* **2012**, *34*, 341–350, doi:10.1002/bies.201100098.
  520. McGinty, J.; Stuckey, D.W.; Soloviev, V.Y.; Laine, R.; Wylezinska-Arridge, M.; Wells, D.J.; Arridge, S.R.; French, P.M.W.; Hajnal, J.V.; Sardini, A. In Vivo Fluorescence Lifetime Tomography of a FRET Probe Expressed in Mouse. *Biomed. Opt. Express* **2011**, *2*, 1907–1917, doi:10.1364/BOE.2.001907.
  521. Ganesan Sundar; Ameer-beg Simon M.; Ng Tony T. C.; Vojnovic Borivoj; Wouters Fred S. A Dark Yellow Fluorescent Protein (YFP)-Based Resonance Energy-Accepting Chromoprotein (REACH) for Förster Resonance Energy Transfer with GFP. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2006**, *103*, 4089–4094, doi:10.1073/pnas.0509922103.
  522. Murakoshi, H.; Lee, S.-J.; Yasuda, R. Highly Sensitive and Quantitative FRET–FLIM Imaging in Single Dendritic Spines Using Improved Non-Radiative YFP. *Brain Cell Biology* **2008**, *36*, 31–42, doi:10.1007/s11068-008-9024-9.
  523. Murakoshi, H.; Shibata, A.C.E.; Nakahata, Y.; Nabekura, J. A Dark Green Fluorescent Protein as an Acceptor for Measurement of Förster Resonance Energy Transfer. *Scientific Reports* **2015**, *5*, 15334, doi:10.1038/srep15334.
  524. Grant, D.M.; Zhang, W.; McGhee, E.J.; Bunney, T.D.; Talbot, C.B.; Kumar, S.; Munro, I.; Dunsby, C.; Neil, M.A.A.; Katan, M.; et al. Multiplexed FRET to Image Multiple Signaling Events in Live Cells. *Biophysical Journal* **2008**, *95*, L69–L71, doi:10.1529/biophysj.108.139204.
  525. Vegh, R.B.; Bravaya, K.B.; Bloch, D.A.; Bommarius, A.S.; Tolbert, L.M.; Verkhovsky, M.; Krylov, A.I.; Solntsev, K.M. Chromophore Photoreduction in Red Fluorescent Proteins Is Responsible for Bleaching and Phototoxicity. *J. Phys. Chem. B* **2014**, *118*, 4527–4534, doi:10.1021/jp500919a.
  526. Kirber, M.T.; Chen, K.; Keaney, J.F. YFP Photoconversion Revisited: Confirmation of the CFP-like Species. *Nature Methods* **2007**, *4*, 767–768, doi:10.1038/nmeth1007-767.
  527. Subach, F.V.; Zhang, L.; Gadella, T.W.J.; Gurskaya, N.G.; Lukyanov, K.A.; Verkhusha, V.V. Red Fluorescent Protein with Reversibly Photoswitchable Absorbance for Photochromic FRET. *Chemistry & Biology* **2010**, *17*, 745–755, doi:10.1016/j.chembiol.2010.05.022.
  528. Don Paul, C.; Kiss, C.; Traore, D.A.K.; Gong, L.; Wilce, M.C.J.; Devenish, R.J.; Bradbury, A.; Prescott, M. Phanta: A Non-Fluorescent Photochromic Acceptor for PcFRET. *PLOS ONE* **2013**, *8*, e75835, doi:10.1371/journal.pone.0075835.
  529. Cameron, W.D.; Bui, C.V.; Hutchinson, A.; Loppnau, P.; Gräslund, S.; Rocheleau, J.V. Apollo-NADP+: A Spectrally Tunable Family of Genetically Encoded Sensors for NADP+. *Nature Methods* **2016**, *13*, 352–358, doi:10.1038/nmeth.3764.

530. Ha, T.; Enderle, Th.; Chemla, D.S.; Selvin, P.R.; Weiss, S. Single Molecule Dynamics Studied by Polarization Modulation. *Phys. Rev. Lett.* **1996**, *77*, 3979–3982, doi:10.1103/PhysRevLett.77.3979.
531. Borst, J.W.; Hink, M.A.; van Hoek, A.; Visser, A.J.W.G. Effects of Refractive Index and Viscosity on Fluorescence and Anisotropy Decays of Enhanced Cyan and Yellow Fluorescent Proteins. *Journal of Fluorescence* **2005**, *15*, 153–160, doi:10.1007/s10895-005-2523-5.
532. Albrecht, A.C. Polarizations and Assignments of Transitions: The Method of Photoselection. *Journal of Molecular Spectroscopy* **1961**, *6*, 84–108, doi:10.1016/0022-2852(61)90234-X.
533. Snell, N.E.; Rao, V.P.; Seckinger, K.M.; Liang, J.; Leser, J.; Mancini, A.E.; Rizzo, M.A. Homotransfer FRET Reporters for Live Cell Imaging. *Biosensors* **2018**, *8*, doi:10.3390/bios8040089.
534. Warren, S.C.; Margineanu, A.; Katan, M.; Dunsby, C.; French, P.M.W. Homo-FRET Based Biosensors and Their Application to Multiplexed Imaging of Signalling Events in Live Cells. *International Journal of Molecular Sciences* **2015**, *16*, doi:10.3390/ijms160714695.
535. Bader, A.N.; Hofman, E.G.; Voortman, J.; van Bergen en Henegouwen, P.M.P.; Gerritsen, H.C. Homo-FRET Imaging Enables Quantification of Protein Cluster Sizes with Subcellular Resolution. *Biophysical Journal* **2009**, *97*, 2613–2622, doi:10.1016/j.bpj.2009.07.059.
536. Vishwasrao, H.D.; Trifilieff, P.; Kandel, E.R. In Vivo Imaging of the Actin Polymerization State with Two-Photon Fluorescence Anisotropy. *Biophysical Journal* **2012**, *102*, 1204–1214, doi:10.1016/j.bpj.2012.01.031.
537. Ross, B.L.; Tenner, B.; Markwardt, M.L.; Zviman, A.; Shi, G.; Kerr, J.P.; Snell, N.E.; McFarland, J.J.; Mauban, J.R.; Ward, C.W.; et al. Single-Color, Ratiometric Biosensors for Detecting Signaling Activities in Live Cells. *eLife* **2018**, *7*, e35458, doi:10.7554/eLife.35458.
538. Kim, S.-Y.; Arai, Y.; Tani, T.; Takatsuka, H.; Saito, Y.; Kawashima, T.; Kawakami, S.; Miyawaki, A.; Nagai, T. Simultaneous Imaging of Multiple Cellular Events Using High-Accuracy Fluorescence Polarization Microscopy. *Microscopy* **2017**, *66*, 110–119, doi:10.1093/jmicro/dfw110.
539. Mattheyses, A.L.; Kampmann, M.; Atkinson, C.E.; Simon, S.M. Fluorescence Anisotropy Reveals Order and Disorder of Protein Domains in the Nuclear Pore Complex. *Biophysical Journal* **2010**, *99*, 1706–1717, doi:10.1016/j.bpj.2010.06.075.
540. Inoué Shinya; Shimomura Osamu; Goda Makoto; Shribak Mykhailo; Tran P. T. Fluorescence Polarization of Green Fluorescence Protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2002**, *99*, 4272–4277, doi:10.1073/pnas.062065199.
541. Piston, D.W.; Kremers, G.-J. Fluorescent Protein FRET: The Good, the Bad and the Ugly. *Trends in Biochemical Sciences* **2007**, *32*, 407–414, doi:10.1016/j.tibs.2007.08.003.
542. Vinkenborg, J.L.; Evers, T.H.; Reulen, S.W.A.; Meijer, E.W.; Merkx, M. Enhanced Sensitivity of FRET-Based Protease Sensors by Redesign of the GFP Dimerization Interface. *ChemBioChem* **2007**, *8*, 1119–1121, doi:10.1002/cbic.200700109.
543. van Dongen, E.M.W.M.; Evers, T.H.; Dekkers, L.M.; Meijer, E.W.; Klomp, L.W.J.; Merkx, M. Variation of Linker Length in Ratiometric Fluorescent Sensor Proteins Allows Rational Tuning of Zn(II) Affinity in the Picomolar to Femtomolar Range. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 3494–3495, doi:10.1021/ja069105d.
544. van der Velden, L.M.; Golynskiy, M.V.; Bijsmans, I.T.G.W.; van Mil, S.W.C.; Klomp, L.W.J.; Merkx, M.; van de Graaf, S.F.J. Monitoring Bile Acid Transport in Single Living Cells Using a Genetically Encoded Förster Resonance Energy Transfer Sensor. *Hepatology* **2013**, *57*, 740–752, doi:10.1002/hep.26012.

545. Lindenburg, L.H.; Hessels, A.M.; Ebberink, E.H.T.M.; Arts, R.; Merkx, M. Robust Red FRET Sensors Using Self-Associating Fluorescent Domains. *ACS Chem. Biol.* **2013**, *8*, 2133–2139, doi:10.1021/cb400427b.
546. Grünberg, R.; Burnier, J.V.; Ferrar, T.; Beltran-Sastre, V.; Stricher, F.; van der Sloot, A.M.; Garcia-Olivas, R.; Mallabiabarrena, A.; Sanjuan, X.; Zimmermann, T.; et al. Engineering of Weak Helper Interactions for High-Efficiency FRET Probes. *Nature Methods* **2013**, *10*, 1021–1027, doi:10.1038/nmeth.2625.
547. Betolngar, D.-B.; Erard, M.; Pasquier, H.; Bousmah, Y.; Diop-Sy, A.; Guiot, E.; Vincent, P.; Mérola, F. PH Sensitivity of FRET Reporters Based on Cyan and Yellow Fluorescent Proteins. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2015**, *407*, 4183–4193, doi:10.1007/s00216-015-8636-z.
548. De Angelis Dino A.; Miesenböck Gero; Zemelman Boris V.; Rothman James E. PRIM: Proximity Imaging of Green Fluorescent Protein-Tagged Polypeptides. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **1998**, *95*, 12312–12316, doi:10.1073/pnas.95.21.12312.
549. Kiyonaka, S.; Kajimoto, T.; Sakaguchi, R.; Shinmi, D.; Omatsu-Kanbe, M.; Matsuura, H.; Imamura, H.; Yoshizaki, T.; Hamachi, I.; Morii, T.; et al. Genetically Encoded Fluorescent Thermosensors Visualize Subcellular Thermoregulation in Living Cells. *Nature Methods* **2013**, *10*, 1232–1238, doi:10.1038/nmeth.2690.
550. Hurme, R.; Berndt, K.D.; Normark, S.J.; Rhen, M. A Proteinaceous Gene Regulatory Thermometer in Salmonella. *Cell* **1997**, *90*, 55–64, doi:10.1016/S0092-8674(00)80313-X.
551. Patschan, S.; Li, H.; Brodsky, S.; Sullivan, D.; De Angelis, D.A.; Patschan, D.; Goligorsky, M.S. Probing Lipid Rafts with Proximity Imaging: Actions of Proatherogenic Stimuli. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* **2006**, *290*, H2210–H2219, doi:10.1152/ajpheart.01112.2005.
552. Iwai Sosuke; Uyeda Taro Q. P. Visualizing Myosin–Actin Interaction with a Genetically-Encoded Fluorescent Strain Sensor. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2008**, *105*, 16882–16887, doi:10.1073/pnas.0805513105.
553. Siegel, M.S.; Isacoff, E.Y. A Genetically Encoded Optical Probe of Membrane Voltage. *Neuron* **1997**, *19*, 735–741, doi:10.1016/S0896-6273(00)80955-1.
554. Ataka, K.; Pieribone, V.A. A Genetically Targetable Fluorescent Probe of Channel Gating with Rapid Kinetics. *Biophysical Journal* **2002**, *82*, 509–516, doi:10.1016/S0006-3495(02)75415-5.
555. Abedi, M.R.; Caponigro, G.; Kamb, A. Green Fluorescent Protein as a Scaffold for Intracellular Presentation of Peptides. *Nucleic Acids Research* **1998**, *26*, 623–630, doi:10.1093/nar/26.2.623.
556. Padlan, E.A. Anatomy of the Antibody Molecule. *Molecular Immunology* **1994**, *31*, 169–217, doi:10.1016/0161-5890(94)90001-9.
557. Doi, N.; Yanagawa, H. Design of Generic Biosensors Based on Green Fluorescent Proteins with Allosteric Sites by Directed Evolution. *FEBS Letters* **1999**, *453*, 305–307, doi:10.1016/S0014-5793(99)00732-2.
558. Brennan C A; Christianson K; La Fleur M A; Mandeck W A Molecular Sensor System Based on Genetically Engineered Alkaline Phosphatase. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **1995**, *92*, 5783–5787, doi:10.1073/pnas.92.13.5783.
559. Benito, A.; Feliu, J.X.; Villaverde, A.  $\beta$ -Galactosidase Enzymatic Activity as a Molecular Probe to Detect Specific Antibodies \*. *Journal of Biological Chemistry* **1996**, *271*, 21251–21256, doi:10.1074/jbc.271.35.21251.
560. Baird Geoffrey S.; Zacharias David A.; Tsien Roger Y. Circular Permutation and Receptor Insertion within Green Fluorescent Proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **1999**, *96*, 11241–11246, doi:10.1073/pnas.96.20.11241.
561. Matsuda, S.; Harada, K.; Ito, M.; Takizawa, M.; Wongso, D.; Tsuboi, T.; Kitaguchi, T. Generation of a cGMP Indicator with an Expanded Dynamic Range by Optimization of

- Amino Acid Linkers between a Fluorescent Protein and PDE5 $\alpha$ . *ACS Sens.* **2017**, *2*, 46–51, doi:10.1021/acssensors.6b00582.
562. Kitaguchi, T.; Oya, M.; Wada, Y.; Tsuboi, T.; Miyawaki, A. Extracellular Calcium Influx Activates Adenylate Cyclase 1 and Potentiates Insulin Secretion in MIN6 Cells. *Biochemical Journal* **2013**, *450*, 365–373, doi:10.1042/BJ20121022.
563. Odaka, H.; Arai, S.; Inoue, T.; Kitaguchi, T. Genetically-Encoded Yellow Fluorescent CAMP Indicator with an Expanded Dynamic Range for Dual-Color Imaging. *PLOS ONE* **2014**, *9*, e100252, doi:10.1371/journal.pone.0100252.
564. Harada, K.; Ito, M.; Wang, X.; Tanaka, M.; Wongso, D.; Konno, A.; Hirai, H.; Hirase, H.; Tsuboi, T.; Kitaguchi, T. Red Fluorescent Protein-Based CAMP Indicator Applicable to Optogenetics and in Vivo Imaging. *Scientific Reports* **2017**, *7*, 7351, doi:10.1038/s41598-017-07820-6.
565. Shen, Y.; Wu, S.-Y.; Rancic, V.; Aggarwal, A.; Qian, Y.; Miyashita, S.-I.; Ballanyi, K.; Campbell, R.E.; Dong, M. Genetically Encoded Fluorescent Indicators for Imaging Intracellular Potassium Ion Concentration. *Communications Biology* **2019**, *2*, 18, doi:10.1038/s42003-018-0269-2.
566. Wu, J.; Abdelfattah, A.S.; Zhou, H.; Ruangkittisakul, A.; Qian, Y.; Ballanyi, K.; Campbell, R.E. Genetically Encoded Glutamate Indicators with Altered Color and Topology. *ACS Chem. Biol.* **2018**, *13*, 1832–1837, doi:10.1021/acscchembio.7b01085.
567. Kostyuk, A.I.; Demidovich, A.D.; Kotova, D.A.; Belousov, V.V.; Bilan, D.S. Circularly Permuted Fluorescent Protein-Based Indicators: History, Principles, and Classification. *International Journal of Molecular Sciences* **2019**, *20*, doi:10.3390/ijms20174200.
568. Lindqvist, Y.; Schneider, G. Circular Permutations of Natural Protein Sequences: Structural Evidence. *Current Opinion in Structural Biology* **1997**, *7*, 422–427, doi:10.1016/S0959-440X(97)80061-9.
569. Lehman, I.R.; Bessman, M.J.; Simms, E.S.; Kornberg, A. Enzymatic Synthesis of Deoxyribonucleic Acid. I. Preparation of Substrates and Partial Purification of an Enzyme from Escherichia Coli. *J Biol Chem* **1958**, *233*, 163–170.
570. Goldenberg, D.P.; Creighton, T.E. Circular and Circularly Permuted Forms of Bovine Pancreatic Trypsin Inhibitor. *Journal of Molecular Biology* **1983**, *165*, 407–413, doi:10.1016/S0022-2836(83)80265-4.
571. Luger Karolin; Hommel Ulrich; Herold Marzell; Hofsteenge Jan; Kirschner Kasper Correct Folding of Circularly Permuted Variants of a B $\alpha$  Barrel Enzyme in Vivo. *Science* **1989**, *243*, 206–210, doi:10.1126/science.2643160.
572. Zhang, P.; Schachman, H.K. In Vivo Formation of Allosteric Aspartate Transcarbamoylase Containing Circularly Permuted Catalytic Polypeptide Chains: Implications for Protein Folding and Assembly. *Protein Science* **1996**, *5*, 1290–1300, doi:10.1002/pro.5560050708.
573. Viguera, A.R.; Serrano, L.; Wilmanns, M. Different Folding Transition States May Result in the Same Native Structure. *Nature Structural Biology* **1996**, *3*, 874–880, doi:10.1038/nsb1096-874.
574. Otzen, D.E.; Fersht, A.R. Folding of Circular and Permuted Chymotrypsin Inhibitor 2: Retention of the Folding Nucleus. *Biochemistry* **1998**, *37*, 8139–8146, doi:10.1021/bi980250g.
575. Hennecke, J.; Sebbel, P.; Glockshuber, R. Random Circular Permutation of DsbA Reveals Segments That Are Essential for Protein Folding and Stability | Edited by R. Huber. *Journal of Molecular Biology* **1999**, *286*, 1197–1215, doi:10.1006/jmbi.1998.2531.
576. Topell, S.; Hennecke, J.; Glockshuber, R. Circularly Permuted Variants of the Green Fluorescent Protein. *FEBS Letters* **1999**, *457*, 283–289, doi:10.1016/S0014-5793(99)01044-3.

577. Nakai, J.; Ohkura, M.; Imoto, K. A High Signal-to-Noise Ca<sup>2+</sup> Probe Composed of a Single Green Fluorescent Protein. *Nature Biotechnology* **2001**, *19*, 137–141, doi:10.1038/84397.
578. Nagai Takeharu; Sawano Asako; Park Eun Sun; Miyawaki Atsushi Circularly Permuted Green Fluorescent Proteins Engineered to Sense Ca<sup>2+</sup>. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2001**, *98*, 3197–3202, doi:10.1073/pnas.051636098.
579. Sakai, R.; Repunte-Canonigo, V.; Raj, C.D.; Knöpfel, T. Design and Characterization of a DNA-Encoded, Voltage-Sensitive Fluorescent Protein. *European Journal of Neuroscience* **2001**, *13*, 2314–2318, doi:10.1046/j.0953-816x.2001.01617.x.
580. Dimitrov, D.; He, Y.; Mutoh, H.; Baker, B.J.; Cohen, L.; Akemann, W.; Knöpfel, T. Engineering and Characterization of an Enhanced Fluorescent Protein Voltage Sensor. *PLOS ONE* **2007**, *2*, e440, doi:10.1371/journal.pone.0000440.
581. Lundby, A.; Mutoh, H.; Dimitrov, D.; Akemann, W.; Knöpfel, T. Engineering of a Genetically Encodable Fluorescent Voltage Sensor Exploiting Fast Ci-VSP Voltage-Sensing Movements. *PLOS ONE* **2008**, *3*, e2514, doi:10.1371/journal.pone.0002514.
582. Gautam, S.; Perron, A.; Mutoh, H.; Knöpfel, T. Exploration of Fluorescent Protein Voltage Probes Based on Circularly Permuted Fluorescent Proteins. *Frontiers in Neuroengineering* **2009**, *2*.
583. Barnett, L.; Platasa, J.; Popovic, M.; Pieribone, V.A.; Hughes, T. A Fluorescent, Genetically-Encoded Voltage Probe Capable of Resolving Action Potentials. *PLOS ONE* **2012**, *7*, e43454, doi:10.1371/journal.pone.0043454.
584. St-Pierre, F.; Marshall, J.D.; Yang, Y.; Gong, Y.; Schnitzer, M.J.; Lin, M.Z. High-Fidelity Optical Reporting of Neuronal Electrical Activity with an Ultrafast Fluorescent Voltage Sensor. *Nature Neuroscience* **2014**, *17*, 884–889, doi:10.1038/nn.3709.
585. Li, Q.; Wanderling, S.; Paduch, M.; Medovoy, D.; Singharoy, A.; McGreevy, R.; Villalba-Galea, C.A.; Hulse, R.E.; Roux, B.; Schulten, K.; et al. Structural Mechanism of Voltage-Dependent Gating in an Isolated Voltage-Sensing Domain. *Nature Structural & Molecular Biology* **2014**, *21*, 244–252, doi:10.1038/nsmb.2768.
586. Lee, E.E.L.; Bezanilla, F. Biophysical Characterization of Genetically Encoded Voltage Sensor ASAP1: Dynamic Range Improvement. *Biophysical Journal* **2017**, *113*, 2178–2181, doi:10.1016/j.bpj.2017.10.018.
587. Yang, H.H.; St-Pierre, F.; Sun, X.; Ding, X.; Lin, M.Z.; Clandinin, T.R. Subcellular Imaging of Voltage and Calcium Signals Reveals Neural Processing In Vivo. *Cell* **2016**, *166*, 245–257, doi:10.1016/j.cell.2016.05.031.
588. Chamberland, S.; Yang, H.H.; Pan, M.M.; Evans, S.W.; Guan, S.; Chavarha, M.; Yang, Y.; Salesse, C.; Wu, H.; Wu, J.C.; et al. Fast Two-Photon Imaging of Subcellular Voltage Dynamics in Neuronal Tissue with Genetically Encoded Indicators. *eLife* **2017**, *6*, e25690, doi:10.7554/eLife.25690.
589. Villette, V.; Chavarha, M.; Dimov, I.K.; Bradley, J.; Pradhan, L.; Mathieu, B.; Evans, S.W.; Chamberland, S.; Shi, D.; Yang, R.; et al. Ultrafast Two-Photon Imaging of a High-Gain Voltage Indicator in Awake Behaving Mice. *Cell* **2019**, *179*, 1590-1608.e23, doi:10.1016/j.cell.2019.11.004.
590. Zhang, Y.; Shannonhouse, J.; Gomez, R.; Son, H.; Ishida, H.; Evans, S.; Chavarha, M.; Shi, D.; Zhang, G.; Lin, M.Z.; et al. Imaging Sensory Transmission and Neuronal Plasticity in Primary Sensory Neurons with Genetically-Encoded Voltage Indicator, ASAP4.4-Kv. *bioRxiv* **2021**, 2021.05.21.445202, doi:10.1101/2021.05.21.445202.
591. Belousov, V.V.; Fradkov, A.F.; Lukyanov, K.A.; Staroverov, D.B.; Shakhbazov, K.S.; Terskikh, A.V.; Lukyanov, S. Genetically Encoded Fluorescent Indicator for Intracellular Hydrogen Peroxide. *Nature Methods* **2006**, *3*, 281–286, doi:10.1038/nmeth866.
592. Markvicheva, K.N.; Bilan, D.S.; Mishina, N.M.; Gorokhovatsky, A.Yu.; Vinokurov, L.M.; Lukyanov, S.; Belousov, V.V. A Genetically Encoded Sensor for H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> with

- Expanded Dynamic Range. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2011**, *19*, 1079–1084, doi:10.1016/j.bmc.2010.07.014.
593. Bilan, D.S.; Pase, L.; Joosen, L.; Gorokhovatsky, A.Yu.; Ermakova, Y.G.; Gadella, T.W.J.; Grabher, C.; Schultz, C.; Lukyanov, S.; Belousov, V.V. HyPer-3: A Genetically Encoded H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Probe with Improved Performance for Ratiometric and Fluorescence Lifetime Imaging. *ACS Chem. Biol.* **2013**, *8*, 535–542, doi:10.1021/cb300625g.
594. Pak, V.V.; Ezeriņa, D.; Lyublinskaya, O.G.; Pedre, B.; Tyurin-Kuzmin, P.A.; Mishina, N.M.; Thauvin, M.; Young, D.; Wahni, K.; Martínez Gache, S.A.; et al. Ultrasensitive Genetically Encoded Indicator for Hydrogen Peroxide Identifies Roles for the Oxidant in Cell Migration and Mitochondrial Function. *Cell Metabolism* **2020**, *31*, 642–653.e6, doi:10.1016/j.cmet.2020.02.003.
595. Ermakova, Y.G.; Bilan, D.S.; Matlashov, M.E.; Mishina, N.M.; Markvicheva, K.N.; Subach, O.M.; Subach, F.V.; Bogeski, I.; Hoth, M.; Enikolopov, G.; et al. Red Fluorescent Genetically Encoded Indicator for Intracellular Hydrogen Peroxide. *Nature Communications* **2014**, *5*, 5222, doi:10.1038/ncomms6222.
596. Melo, E.P.; Lopes, C.; Gollwitzer, P.; Lortz, S.; Lenzen, S.; Mehmeti, I.; Kaminski, C.F.; Ron, D.; Avezov, E. TriPer, an Optical Probe Tuned to the Endoplasmic Reticulum Tracks Changes in Luminal H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. *BMC Biology* **2017**, *15*, 24, doi:10.1186/s12915-017-0367-5.
597. Simen Zhao, B.; Liang, Y.; Song, Y.; Zheng, C.; Hao, Z.; Chen, P.R. A Highly Selective Fluorescent Probe for Visualization of Organic Hydroperoxides in Living Cells. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 17065–17067, doi:10.1021/ja1071114.
598. Tarrago, L.; Péterfi, Z.; Lee, B.C.; Michel, T.; Gladyshev, V.N. Monitoring Methionine Sulfoxide with Stereospecific Mechanism-Based Fluorescent Sensors. *Nature Chemical Biology* **2015**, *11*, 332–338, doi:10.1038/nchembio.1787.
599. Fan, Y.; Chen, Z.; Ai, H. Monitoring Redox Dynamics in Living Cells with a Redox-Sensitive Red Fluorescent Protein. *Anal. Chem.* **2015**, *87*, 2802–2810, doi:10.1021/ac5041988.
600. Cambronne Xiaolu A.; Stewart Melissa L.; Kim DongHo; Jones-Brunette Amber M.; Morgan Rory K.; Farrens David L.; Cohen Michael S.; Goodman Richard H. Biosensor Reveals Multiple Sources for Mitochondrial NAD<sup>+</sup>. *Science* **2016**, *352*, 1474–1477, doi:10.1126/science.aad5168.
601. Zhao, Y.; Hu, Q.; Cheng, F.; Su, N.; Wang, A.; Zou, Y.; Hu, H.; Chen, X.; Zhou, H.-M.; Huang, X.; et al. SoNar, a Highly Responsive NAD<sup>+</sup>/NADH Sensor, Allows High-Throughput Metabolic Screening of Anti-Tumor Agents. *Cell Metabolism* **2015**, *21*, 777–789, doi:10.1016/j.cmet.2015.04.009.
602. Bilan, D.S.; Matlashov, M.E.; Gorokhovatsky, A.Yu.; Schultz, C.; Enikolopov, G.; Belousov, V.V. Genetically Encoded Fluorescent Indicator for Imaging NAD<sup>+</sup>/NADH Ratio Changes in Different Cellular Compartments. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* **2014**, *1840*, 951–957, doi:10.1016/j.bbagen.2013.11.018.
603. Zhao, Y.; Jin, J.; Hu, Q.; Zhou, H.-M.; Yi, J.; Yu, Z.; Xu, L.; Wang, X.; Yang, Y.; Loscalzo, J. Genetically Encoded Fluorescent Sensors for Intracellular NADH Detection. *Cell Metabolism* **2011**, *14*, 555–566, doi:10.1016/j.cmet.2011.09.004.
604. Hung, Y.P.; Albeck, J.G.; Tantama, M.; Yellen, G. Imaging Cytosolic NADH-NAD<sup>+</sup> Redox State with a Genetically Encoded Fluorescent Biosensor. *Cell Metabolism* **2011**, *14*, 545–554, doi:10.1016/j.cmet.2011.08.012.
605. Tao, R.; Zhao, Y.; Chu, H.; Wang, A.; Zhu, J.; Chen, X.; Zou, Y.; Shi, M.; Liu, R.; Su, N.; et al. Genetically Encoded Fluorescent Sensors Reveal Dynamic Regulation of NADPH Metabolism. *Nature Methods* **2017**, *14*, 720–728, doi:10.1038/nmeth.4306.
606. Ji, Q.; Zhao, B.S.; He, C. A Highly Sensitive and Genetically Encoded Fluorescent Reporter for Ratiometric Monitoring of Quinones in Living Cells. *Chem. Commun.* **2013**, *49*, 8027–8029, doi:10.1039/C3CC44534H.



607. Wang, J.; Karpus, J.; Zhao, B.S.; Luo, Z.; Chen, P.R.; He, C. A Selective Fluorescent Probe for Carbon Monoxide Imaging in Living Cells. *Angewandte Chemie International Edition* **2012**, *51*, 9652–9656, doi:10.1002/anie.201203684.
608. Shui, B.; Wang, Q.; Lee, F.; Byrnes, L.J.; Chudakov, D.M.; Lukyanov, S.A.; Sondermann, H.; Kotlikoff, M.I. Circular Permutation of Red Fluorescent Proteins. *PLOS ONE* **2011**, *6*, e20505, doi:10.1371/journal.pone.0020505.
609. Hu, H.; Wei, Y.; Wang, D.; Su, N.; Chen, X.; Zhao, Y.; Liu, G.; Yang, Y. Glucose Monitoring in Living Cells with Single Fluorescent Protein-Based Sensors. *RSC Adv.* **2018**, *8*, 2485–2489, doi:10.1039/C7RA11347A.
610. Abdelfattah, A.S.; Farhi, S.L.; Zhao, Y.; Brinks, D.; Zou, P.; Ruangkittisakul, A.; Platasa, J.; Pieribone, V.A.; Ballanyi, K.; Cohen, A.E.; et al. A Bright and Fast Red Fluorescent Protein Voltage Indicator That Reports Neuronal Activity in Organotypic Brain Slices. *J. Neurosci.* **2016**, *36*, 2458, doi:10.1523/JNEUROSCI.3484-15.2016.
611. Hu, H.; Gu, Y.; Xu, L.; Zou, Y.; Wang, A.; Tao, R.; Chen, X.; Zhao, Y.; Yang, Y. A Genetically Encoded Toolkit for Tracking Live-Cell Histidine Dynamics in Space and Time. *Scientific Reports* **2017**, *7*, 43479, doi:10.1038/srep43479.
612. Alicea, I.; Marvin, J.S.; Miklos, A.E.; Ellington, A.D.; Looger, L.L.; Schreiter, E.R. Structure of the Escherichia Coli Phosphonate Binding Protein PhnD and Rationally Optimized Phosphonate Biosensors. *Journal of Molecular Biology* **2011**, *414*, 356–369, doi:10.1016/j.jmb.2011.09.047.
613. Jing, M.; Zhang, P.; Wang, G.; Feng, J.; Mesik, L.; Zeng, J.; Jiang, H.; Wang, S.; Looby, J.C.; Guagliardo, N.A.; et al. A Genetically Encoded Fluorescent Acetylcholine Indicator for in Vitro and in Vivo Studies. *Nature Biotechnology* **2018**, *36*, 726–737, doi:10.1038/nbt.4184.
614. Cho, J.-H.; Swanson, C.J.; Chen, J.; Li, A.; Lippert, L.G.; Boye, S.E.; Rose, K.; Sivaramakrishnan, S.; Chuong, C.-M.; Chow, R.H. The GCaMP-R Family of Genetically Encoded Ratiometric Calcium Indicators. *ACS Chem. Biol.* **2017**, *12*, 1066–1074, doi:10.1021/acscchembio.6b00883.
615. Ast, C.; Foret, J.; Oltrogge, L.M.; De Michele, R.; Kleist, T.J.; Ho, C.-H.; Frommer, W.B. Ratiometric Matryoshka Biosensors from a Nested Cassette of Green- and Orange-Emitting Fluorescent Proteins. *Nature Communications* **2017**, *8*, 431, doi:10.1038/s41467-017-00400-2.
616. Linzner, N.; Loi, V.V.; Fritsch, V.N.; Tung, Q.N.; Stenzel, S.; Wirtz, M.; Hell, R.; Hamilton, C.J.; Tedin, K.; Fulde, M.; et al. Staphylococcus Aureus Uses the Bacilliredoxin (BrxAB)/Bacillithiol Disulfide Reductase (YpdA) Redox Pathway to Defend Against Oxidative Stress Under Infections. *Frontiers in Microbiology* **2019**, *10*.
617. Becker, J.; Giebelmann, G.; Hoffmann, S.L.; Wittmann, C. Corynebacterium Glutamicum for Sustainable Bioproduction: From Metabolic Physiology to Systems Metabolic Engineering. In *Synthetic Biology – Metabolic Engineering*; Zhao, H., Zeng, A.-P., Eds.; Springer International Publishing: Cham, 2018; pp. 217–263 ISBN 978-3-319-55318-4.
618. Frunzke Julia; Bramkamp Marc; Schweitzer Jens-Eric; Bott Michael Population Heterogeneity in Corynebacterium Glutamicum ATCC 13032 Caused by Prophage CGP3. *Journal of Bacteriology* **2008**, *190*, 5111–5119, doi:10.1128/JB.00310-08.
619. Tung, Q.N.; Loi, V.V.; Busche, T.; Nerlich, A.; Mieth, M.; Milse, J.; Kalinowski, J.; Hocke, A.C.; Antelmann, H. Stable Integration of the Mrx1-RoGFP2 Biosensor to Monitor Dynamic Changes of the Mycothiol Redox Potential in Corynebacterium Glutamicum. *Redox Biology* **2019**, *20*, 514–525, doi:10.1016/j.redox.2018.11.012.
620. Degrossoli, A.; Müller, A.; Xie, K.; Schneider, J.F.; Bader, V.; Winklhofer, K.F.; Meyer, A.J.; Leichert, L.I. Neutrophil-Generated HOCl Leads to Non-Specific Thiol Oxidation in Phagocytized Bacteria. *eLife* **2018**, *7*, e32288, doi:10.7554/eLife.32288.

621. Xie, K.; Varatnitskaya, M.; Maghnouj, A.; Bader, V.; Winklhofer, K.F.; Hahn, S.; Leichert, L.I. Activation Leads to a Significant Shift in the Intracellular Redox Homeostasis of Neutrophil-like Cells. *Redox Biology* **2020**, *28*, 101344, doi:10.1016/j.redox.2019.101344.
622. Midwinter, R.G.; Cheah, F.-C.; Moskovitz, J.; Vissers, M.C.; Winterbourn, C.C. IkappaB Is a Sensitive Target for Oxidation by Cell-Permeable Chloramines: Inhibition of NF-KappaB Activity by Glycine Chloramine through Methionine Oxidation. *Biochem J* **2006**, *396*, 71–78, doi:10.1042/BJ20052026.
623. Lushchak, V.I. Glutathione Homeostasis and Functions: Potential Targets for Medical Interventions. *Journal of Amino Acids* **2012**, *2012*, 736837, doi:10.1155/2012/736837.
624. Gray, M.J.; Wholey, W.-Y.; Parker, B.W.; Kim, M.; Jakob, U. NemR Is a Bleach-Sensing Transcription Factor. *J Biol Chem* **2013**, *288*, 13789–13798, doi:10.1074/jbc.M113.454421.
625. Liu, X.; Zheng, A.; Luan, D.; Wang, X.; Kong, F.; Tong, L.; Xu, K.; Tang, B. High-Quantum-Yield Mitochondria-Targeting Near-Infrared Fluorescent Probe for Imaging Native Hypobromous Acid in Living Cells and in Vivo. *Anal. Chem.* **2017**, *89*, 1787–1792, doi:10.1021/acs.analchem.6b04094.
626. Lane, A.E.; Tan, J.T.M.; Hawkins, C.L.; Heather, A.K.; Davies, M.J. The Myeloperoxidase-Derived Oxidant HOSCN Inhibits Protein Tyrosine Phosphatases and Modulates Cell Signalling via the Mitogen-Activated Protein Kinase (MAPK) Pathway in Macrophages. *Biochem J* **2010**, *430*, 161–169, doi:10.1042/BJ20100082.
627. Uppu, R.M. Synthesis of Peroxynitrite Using Isoamyl Nitrite and Hydrogen Peroxide in a Homogeneous Solvent System. *Analytical Biochemistry* **2006**, *354*, 165–168, doi:10.1016/j.ab.2005.11.003.
628. Kabsch, W. XDS. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **2010**, *66*, 125–132, doi:10.1107/S0907444909047337.
629. McCoy, A.J.; Grosse-Kunstleve, R.W.; Adams, P.D.; Winn, M.D.; Storoni, L.C.; Read, R.J. Phaser Crystallographic Software. *J Appl Crystallogr* **2007**, *40*, 658–674, doi:10.1107/S0021889807021206.
630. Adams, P.D.; Afonine, P.V.; Bunkóczi, G.; Chen, V.B.; Davis, I.W.; Echols, N.; Headd, J.J.; Hung, L.-W.; Kapral, G.J.; Grosse-Kunstleve, R.W.; et al. PHENIX: A Comprehensive Python-Based System for Macromolecular Structure Solution. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **2010**, *66*, 213–221, doi:10.1107/S0907444909052925.
631. Emsley, P.; Cowtan, K. Coot: Model-Building Tools for Molecular Graphics. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **2004**, *60*, 2126–2132, doi:10.1107/S0907444904019158.
632. Afonine, P.V.; Grosse-Kunstleve, R.W.; Echols, N.; Headd, J.J.; Moriarty, N.W.; Mustyakimov, M.; Terwilliger, T.C.; Urzhumtsev, A.; Zwart, P.H.; Adams, P.D. Towards Automated Crystallographic Structure Refinement with Phenix.Refine. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **2012**, *68*, 352–367, doi:10.1107/S0907444912001308.
633. Imlay, J.A. Cellular Defenses against Superoxide and Hydrogen Peroxide. *Annu. Rev. Biochem.* **2008**, *77*, 755–776, doi:10.1146/annurev.biochem.77.061606.161055.
634. Chi, B.K.; Gronau, K.; Mäder, U.; Hessling, B.; Becher, D.; Antelmann, H. S-Bacillithiolation Protects against Hypochlorite Stress in *Bacillus Subtilis* as Revealed by Transcriptomics and Redox Proteomics. *Mol Cell Proteomics* **2011**, *10*, M111.009506, doi:10.1074/mcp.M111.009506.
635. Wang Siyun; Deng Kaiping; Zaremba Sam; Deng Xiangyu; Lin Chiahui; Wang Qian; Tortorello Mary Lou; Zhang Wei Transcriptomic Response of *Escherichia Coli* O157:H7 to Oxidative Stress. *Applied and Environmental Microbiology* **2009**, *75*, 6110–6123, doi:10.1128/AEM.00914-09.
636. Wang Siyun; Phillippy Adam M.; Deng Kaiping; Rui Xiaoqian; Li Zengxin; Tortorello Mary Lou; Zhang Wei Transcriptomic Responses of *Salmonella Enterica* Serovars

- Enteritidis and Typhimurium to Chlorine-Based Oxidative Stress. *Applied and Environmental Microbiology* **2010**, *76*, 5013–5024, doi:10.1128/AEM.00823-10.
637. Panasencko, O.M.; Gorudko, I.V.; Sokolov, A.V. Hypochlorous Acid as a Precursor of Free Radicals in Living Systems. *Biochemistry (Mosc)* **2013**, *78*, 1466–1489, doi:10.1134/S0006297913130075.
638. Lee, J.-W.; Helmann, J.D. The PerR Transcription Factor Senses H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> by Metal-Catalysed Histidine Oxidation. *Nature* **2006**, *440*, 363–367, doi:10.1038/nature04537.
639. Maalej, S.; Dammak, I.; Dukan, S. The Impairment of Superoxide Dismutase Coordinates the Derepression of the PerR Regulon in the Response of *Staphylococcus Aureus* to HOCl Stress. *Microbiology*, 2006, *152*, 855–861.
640. Seth, D.; Hausladen, A.; Stamler, J.S. Anaerobic Transcription by OxyR: A Novel Paradigm for Nitrosative Stress. *Antioxidants & Redox Signaling* **2020**, *32*, 803–816, doi:10.1089/ars.2019.7921.
641. Storz, G.; Tartaglia, L.A.; Ames, B.N. Transcriptional Regulator of Oxidative Stress-Inducible Genes: Direct Activation by Oxidation. *Science* **1990**, *248*, 189–194, doi:10.1126/science.2183352.
642. Hou, N.; Yan, Z.; Fan, K.; Li, H.; Zhao, R.; Xia, Y.; Xun, L.; Liu, H. OxyR Senses Sulfane Sulfur and Activates the Genes for Its Removal in *Escherichia Coli*. *Redox Biology* **2019**, *26*, 101293, doi:10.1016/j.redox.2019.101293.
643. Fuangthong, M.; Helmann, J.D. The OhrR Repressor Senses Organic Hydroperoxides by Reversible Formation of a Cysteine-Sulfenic Acid Derivative. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2002**, *99*, 6690–6695, doi:10.1073/pnas.102483199.
644. Antelmann, H.; Helmann, J.D. Thiol-Based Redox Switches and Gene Regulation. *Antioxidants & Redox Signaling* **2011**, *14*, 1049–1063, doi:10.1089/ars.2010.3400.
645. Spiro, S.; D'Autréaux, B. Non-Heme Iron Sensors of Reactive Oxygen and Nitrogen Species. *Antioxidants & Redox Signaling* **2012**, *17*, 1264–1276, doi:10.1089/ars.2012.4533.
646. Hidalgo, E.; Demple, B. An Iron-Sulfur Center Essential for Transcriptional Activation by the Redox-Sensing SoxR Protein. *The EMBO Journal* **1994**, *13*, 138–146, doi:10.1002/j.1460-2075.1994.tb06243.x.
647. Gebendorfer, K.M.; Drazic, A.; Le, Y.; Gundlach, J.; Bepperling, A.; Kastenmüller, A.; Ganzinger, K.A.; Braun, N.; Franzmann, T.M.; Winter, J. Identification of a Hypochlorite-Specific Transcription Factor from *Escherichia Coli*\*. *Journal of Biological Chemistry* **2012**, *287*, 6892–6903, doi:10.1074/jbc.M111.287219.
648. Palm, G.J.; Khanh Chi, B.; Waack, P.; Gronau, K.; Becher, D.; Albrecht, D.; Hinrichs, W.; Read, R.J.; Antelmann, H. Structural Insights into the Redox-Switch Mechanism of the MarR/DUF24-Type Regulator HypR. *Nucleic Acids Research* **2012**, *40*, 4178–4192, doi:10.1093/nar/gkr1316.
649. Parker, B.W.; Schwessinger, E.A.; Jakob, U.; Gray, M.J. The RclR Protein Is a Reactive Chlorine-Specific Transcription Factor in *Escherichia Coli*\*. *Journal of Biological Chemistry* **2013**, *288*, 32574–32584, doi:10.1074/jbc.M113.503516.
650. Loi, V.V.; Busche, T.; Tedin, K.; Bernhardt, J.; Wollenhaupt, J.; Huyen, N.T.T.; Weise, C.; Kalinowski, J.; Wahl, M.C.; Fulde, M.; et al. Redox-Sensing Under Hypochlorite Stress and Infection Conditions by the Rrf2-Family Repressor HypR in *Staphylococcus Aureus*. *Antioxidants & Redox Signaling* **2018**, *29*, 615–636, doi:10.1089/ars.2017.7354.
651. Tung, Q.N.; Busche, T.; Van Loi, V.; Kalinowski, J.; Antelmann, H. The Redox-Sensing MarR-Type Repressor HypS Controls Hypochlorite and Antimicrobial Resistance in *Mycobacterium Smegmatis*. *Free Radical Biology and Medicine* **2020**, *147*, 252–261, doi:10.1016/j.freeradbiomed.2019.12.032.
652. El Hajj Sara; Henry Camille; Andrieu Camille; Vergnes Alexandra; Loiseau Laurent; Brasseur Gaël; Barré Romain; Aussel Laurent; Ezraty Benjamin; Galperin Michael Y.

- HprSR Is a Reactive Chlorine Species-Sensing, Two-Component System in *Escherichia Coli*. *Journal of Bacteriology* **2022**, *204*, e00449-21, doi:10.1128/jb.00449-21.
653. Newberry, K.J.; Fuangthong, M.; Panmanee, W.; Mongkolsuk, S.; Brennan, R.G. Structural Mechanism of Organic Hydroperoxide Induction of the Transcription Regulator OhrR. *Molecular Cell* **2007**, *28*, 652–664, doi:10.1016/j.molcel.2007.09.016.
654. Drazic, A.; Miura, H.; Peschek, J.; Le, Y.; Bach, N.C.; Kriehuber, T.; Winter, J. Methionine Oxidation Activates a Transcription Factor in Response to Oxidative Stress. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2013**, *110*, 9493–9498, doi:10.1073/pnas.1300578110.
655. Sjöberg, B.; Foley, S.; Cardey, B.; Fromm, M.; Enescu, M. Methionine Oxidation by Hydrogen Peroxide in Peptides and Proteins: A Theoretical and Raman Spectroscopy Study. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* **2018**, *188*, 95–99, doi:10.1016/j.jphotobiol.2018.09.009.
656. Padmaja, S.; Squadrito, G.L.; Lemercier, J.-N.; Cueto, R.; Pryor, W.A. Rapid Oxidation of DL-Selenomethionine by Peroxynitrite. *Free Radical Biology and Medicine* **1996**, *21*, 317–322, doi:10.1016/0891-5849(96)00132-3.
657. Jo, I.; Kim, D.; No, T.; Hong, S.; Ahn, J.; Ryu, S.; Ha, N.-C. Structural Basis for HOCl Recognition and Regulation Mechanisms of HypT, a Hypochlorite-Specific Transcriptional Regulator. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2019**, *116*, 3740–3745, doi:10.1073/pnas.1811509116.
658. Urano, H.; Yoshida, M.; Ogawa, A.; Yamamoto, K.; Ishihama, A.; Ogasawara, H. Cross-Regulation between Two Common Ancestral Response Regulators, HprR and CusR, in *Escherichia Coli*. *Microbiology*, 2017, *163*, 243–252.
659. Umezawa Yoshimasa; Shimada Tomohiro; Kori Ayako; Yamada Kayoko; Ishihama Akira The Uncharacterized Transcription Factor YdhM Is the Regulator of the NemA Gene, Encoding N-Ethylmaleimide Reductase. *Journal of Bacteriology* **2008**, *190*, 5890–5897, doi:10.1128/JB.00459-08.
660. Lee, C.; Shin, J.; Park, C. Novel Regulatory System NemRA–GloA for Electrophile Reduction in *Escherichia Coli* K-12. *Molecular Microbiology* **2013**, *88*, 395–412, doi:10.1111/mmi.12192.
661. Gray, M.J.; Wholey, W.-Y.; Wagner, N.O.; Cremers, C.M.; Mueller-Schickert, A.; Hock, N.T.; Krieger, A.G.; Smith, E.M.; Bender, R.A.; Bardwell, J.C.A.; et al. Polyphosphate Is a Primordial Chaperone. *Molecular Cell* **2014**, *53*, 689–699, doi:10.1016/j.molcel.2014.01.012.
662. Booth, I.R.; Ferguson, G.P.; Miller, S.; Li, C.; Gunasekera, B.; Kinghorn, S. Bacterial Production of Methylglyoxal: A Survival Strategy or Death by Misadventure? *Biochemical Society Transactions* **2003**, *31*, 1406–1408, doi:10.1042/bst0311406.
663. Gray, M.J.; Li, Y.; Leichert, L.I.-O.; Xu, Z.; Jakob, U. Does the Transcription Factor NemR Use a Regulatory Sulfenamide Bond to Sense Bleach? *Antioxid Redox Signal* **2015**, *23*, 747–754, doi:10.1089/ars.2015.6346.
664. Bianchi-Smiraglia, A.; Rana, M.S.; Foley, C.E.; Paul, L.M.; Lipchick, B.C.; Moparthy, S.; Moparthy, K.; Fink, E.E.; Bagati, A.; Hurley, E.; et al. Internally Ratiometric Fluorescent Sensors for Evaluation of Intracellular GTP Levels and Distribution. *Nature Methods* **2017**, *14*, 1003–1009, doi:10.1038/nmeth.4404.
665. Ravotto, L.; Duffet, L.; Zhou, X.; Weber, B.; Patriarchi, T. A Bright and Colorful Future for G-Protein Coupled Receptor Sensors. *Frontiers in Cellular Neuroscience* **2020**, *14*.
666. Zgliczyński, J.M.; Stelmaszyńska, T.; Domański, J.; Ostrowski, W. Chloramines as Intermediates of Oxidation Reaction of Amino Acids by Myeloperoxidase. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Enzymology* **1971**, *235*, 419–424, doi:10.1016/0005-2744(71)90281-6.

667. Learn, D.B.; Fried, V.A.; Thomas, E.L. Taurine and Hypotaurine Content of Human Leukocytes. *Journal of Leukocyte Biology* **1990**, *48*, 174–182, doi:10.1002/jlb.48.2.174.
668. Giorgio, M.; Trinei, M.; Migliaccio, E.; Pelicci, P.G. Hydrogen Peroxide: A Metabolic by-Product or a Common Mediator of Ageing Signals? *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **2007**, *8*, 722–728, doi:10.1038/nrm2240.
669. Schürmann, N.; Forrer, P.; Casse, O.; Li, J.; Felmy, B.; Burgener, A.-V.; Ehrenfeuchter, N.; Hardt, W.-D.; Recher, M.; Hess, C.; et al. Myeloperoxidase Targets Oxidative Host Attacks to Salmonella and Prevents Collateral Tissue Damage. *Nature Microbiology* **2017**, *2*, 16268, doi:10.1038/nmicrobiol.2016.268.
670. Thomas, E.L.; Grisham, M.B.; Margaret Jefferson, M. [41] Cytotoxicity of Chloramines. In *Methods in Enzymology*; Academic Press, 1986; Vol. 132, pp. 585–593 ISBN 0076-6879.
671. Grisham, M.B.; Jefferson, M.M.; Thomas, E.L. Role of Monochloramine in the Oxidation of Erythrocyte Hemoglobin by Stimulated Neutrophils. *Journal of Biological Chemistry* **1984**, *259*, 6757–6765, doi:10.1016/S0021-9258(17)39793-4.
672. Winter, J.; Ilbert, M.; Graf, P.C.F.; Özcelik, D.; Jakob, U. Bleach Activates a Redox-Regulated Chaperone by Oxidative Protein Unfolding. *Cell* **2008**, *135*, 691–701, doi:10.1016/j.cell.2008.09.024.
673. Pattison, D.I.; Hawkins, C.L.; Davies, M.J. What Are the Plasma Targets of the Oxidant Hypochlorous Acid? A Kinetic Modeling Approach. *Chem. Res. Toxicol.* **2009**, *22*, 807–817, doi:10.1021/tx800372d.
674. Storkey, C.; Davies, M.J.; Pattison, D.I. Reevaluation of the Rate Constants for the Reaction of Hypochlorous Acid (HOCl) with Cysteine, Methionine, and Peptide Derivatives Using a New Competition Kinetic Approach. *Free Radical Biology and Medicine* **2014**, *73*, 60–66, doi:10.1016/j.freeradbiomed.2014.04.024.
675. Hall, C.N.; Garthwaite, J. What Is the Real Physiological NO Concentration in Vivo? *Nitric Oxide* **2009**, *21*, 92–103, doi:10.1016/j.niox.2009.07.002.
676. Malinski, T.; Bailey, F.; Zhang, Z.G.; Chopp, M. Nitric Oxide Measured by a Porphyrinic Micro Sensor in Rat Brain after Transient Middle Cerebral Artery Occlusion. *J Cereb Blood Flow Metab* **1993**, *13*, 355–358, doi:10.1038/jcbfm.1993.48.
677. Yang, J.; Ji, R.; Cheng, Y.; Sun, J.-Z.; Jennings, L.K.; Zhang, C. L-Arginine Chlorination Results in the Formation of a Nonselective Nitric-Oxide Synthase Inhibitor. *J Pharmacol Exp Ther* **2006**, *318*, 1044, doi:10.1124/jpet.106.104422.
678. Miyawaki, A.; Nagai, T.; Mizuno, H. Engineering Fluorescent Proteins. In *Microscopy Techniques: -/-*; Rietdorf, J., Ed.; Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg, 2005; pp. 1–15 ISBN 978-3-540-31545-2.
679. Ermakova, Y.G.; Pak, V.V.; Bogdanova, Y.A.; Kotlobay, A.A.; Yampolsky, I.V.; Shokhina, A.G.; Panova, A.S.; Marygin, R.A.; Staroverov, D.B.; Bilan, D.S.; et al. SypHer3s: A Genetically Encoded Fluorescent Ratiometric Probe with Enhanced Brightness and an Improved Dynamic Range. *Chem. Commun.* **2018**, *54*, 2898–2901, doi:10.1039/C7CC08740C.
680. Chen, Y.; Song, X.; Ye, S.; Miao, L.; Zhu, Y.; Zhang, R.-G.; Ji, G. Structural Insight into Enhanced Calcium Indicator GCaMP3 and GCaMPJ to Promote Further Improvement. *Protein & Cell* **2013**, *4*, 299–309, doi:10.1007/s13238-013-2103-4.
681. Dana, H.; Mohar, B.; Sun, Y.; Narayan, S.; Gordus, A.; Hasseman, J.P.; Tsegaye, G.; Holt, G.T.; Hu, A.; Walpita, D.; et al. Sensitive Red Protein Calcium Indicators for Imaging Neural Activity. *eLife* **2016**, *5*, e12727, doi:10.7554/eLife.12727.
682. Tian, L.; Hires, S.A.; Mao, T.; Huber, D.; Chiappe, M.E.; Chalasani, S.H.; Petreanu, L.; Akerboom, J.; McKinney, S.A.; Schreiter, E.R.; et al. Imaging Neural Activity in Worms, Flies and Mice with Improved GCaMP Calcium Indicators. *Nature Methods* **2009**, *6*, 875–881, doi:10.1038/nmeth.1398.

683. Akerboom, J.; Chen, T.-W.; Wardill, T.J.; Tian, L.; Marvin, J.S.; Mutlu, S.; Calderón, N.C.; Esposti, F.; Borghuis, B.G.; Sun, X.R.; et al. Optimization of a GCaMP Calcium Indicator for Neural Activity Imaging. *J. Neurosci.* **2012**, *32*, 13819, doi:10.1523/JNEUROSCI.2601-12.2012.
684. Chen, T.-W.; Wardill, T.J.; Sun, Y.; Pulver, S.R.; Renninger, S.L.; Baohan, A.; Schreiter, E.R.; Kerr, R.A.; Orger, M.B.; Jayaraman, V.; et al. Ultrasensitive Fluorescent Proteins for Imaging Neuronal Activity. *Nature* **2013**, *499*, 295–300, doi:10.1038/nature12354.
685. Dana, H.; Sun, Y.; Mohar, B.; Hulse, B.K.; Kerlin, A.M.; Hasseman, J.P.; Tsegaye, G.; Tsang, A.; Wong, A.; Patel, R.; et al. High-Performance Calcium Sensors for Imaging Activity in Neuronal Populations and Microcompartments. *Nature Methods* **2019**, *16*, 649–657, doi:10.1038/s41592-019-0435-6.
686. Leder, L.; Stark, W.; Freuler, F.; Marsh, M.; Meyerhofer, M.; Stettler, T.; Mayr, L.M.; Britanova, O.V.; Strukova, L.A.; Chudakov, D.M.; et al. The Structure of Ca<sup>2+</sup> Sensor Case16 Reveals the Mechanism of Reaction to Low Ca<sup>2+</sup> Concentrations. *Sensors* **2010**, *10*, 8143–8160, doi:10.3390/s100908143.
687. Thekkan, S.; Jani, M.S.; Cui, C.; Dan, K.; Zhou, G.; Becker, L.; Krishnan, Y. A DNA-Based Fluorescent Reporter Maps HOCl Production in the Maturing Phagosome. *Nature Chemical Biology* **2019**, *15*, 1165–1172, doi:10.1038/s41589-018-0176-3.
688. AU - Foote, J.R.; AU - Levine, A.P.; AU - Behe, P.; AU - Duchen, M.R.; AU - Segal, A.W. Imaging the Neutrophil Phagosome and Cytoplasm Using a Ratiometric PH Indicator. *JoVE* **2017**, e55107, doi:10.3791/55107.
689. Levine, A.P.; Duchen, M.R.; de Villiers, S.; Rich, P.R.; Segal, A.W. Alkalinity of Neutrophil Phagocytic Vacuoles Is Modulated by HVCN1 and Has Consequences for Myeloperoxidase Activity. *PLOS ONE* **2015**, *10*, e0125906, doi:10.1371/journal.pone.0125906.
690. Niethammer, P.; Grabher, C.; Look, A.T.; Mitchison, T.J. A Tissue-Scale Gradient of Hydrogen Peroxide Mediates Rapid Wound Detection in Zebrafish. *Nature* **2009**, *459*, 996–999, doi:10.1038/nature08119.
691. Bienert, G.P.; Schjoerring, J.K.; Jahn, T.P. Membrane Transport of Hydrogen Peroxide. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **2006**, *1758*, 994–1003, doi:10.1016/j.bbamem.2006.02.015.
692. Li, W.; Liu, G.; Chou, I.-N.; Kagan, H.M. Hydrogen Peroxide-Mediated, Lysyl Oxidase-Dependent Chemotaxis of Vascular Smooth Muscle Cells. *Journal of Cellular Biochemistry* **2000**, *78*, 550–557, doi:10.1002/1097-4644(20000915)78:4<550::AID-JCB4>3.0.CO;2-8.
693. Klyubin, I.V.; Kirpichnikova, K.M.; Gamaley, I.A. Hydrogen Peroxide-Induced Chemotaxis of Mouse Peritoneal Neutrophils. *Eur J Cell Biol* **1996**, *70*, 347–351.
694. Yoo, S.K.; Starnes, T.W.; Deng, Q.; Huttenlocher, A. Lyn Is a Redox Sensor That Mediates Leukocyte Wound Attraction in Vivo. *Nature* **2011**, *480*, 109–112, doi:10.1038/nature10632.
695. Jelcic, M.; Enyedi, B.; Xavier, J.B.; Niethammer, P. Image-Based Measurement of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Reaction-Diffusion in Wounded Zebrafish Larvae. *Biophysical Journal* **2017**, *112*, 2011–2018, doi:10.1016/j.bpj.2017.03.021.