

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

На правах рукописи

Матлашов Михаил Егорович

**Молекулярные инструменты для модуляции редокс-статуса и мониторинга
активности нейронов.**

специальность – 03-01-03 – молекулярная биология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание учёной степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель:
Доктор биологических наук
Белоусов Всеволод Вадимович

Москва 2014

Работа выполнена в Группе биологии активных форм кислорода в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институте биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук (ИБХ РАН).

Научный руководитель:

Белоусов Всеволод Вадимович, доктор биологических наук.

Официальные оппоненты:

Малышев Алексей Юрьевич, доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник Лаборатории клеточной нейробиологии обучения Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института высшей нервной деятельности и нейрофизиологии Российской академии наук.

Плотников Егор Юрьевич, доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник Лаборатории структуры и функции митохондрий Научно-исследовательского института физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского МГУ имени М.В. Ломоносова.

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биохимии им. А.Н. Баха Российской академии наук.

Защита состоится 08.10.2014 года в 10.00 на заседании диссертационного совета Д 002.019.01 при ИБХ РАН по адресу: 117997, Москва В-437, ул. Миклухо-Маклая, д. 16/10.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте www.ibch.ru ИБХ РАН.
Автореферат разослан « » 2014 года.

**Ученый секретарь диссертационного совета,
доктор физико-математических наук
В.А. Олейников**

Общая характеристика работы

Актуальность проблемы. Внутриклеточная среда нейронов характеризуется высокой динамичностью параметров: в процессе генерации и передачи электрического сигнала в клетках происходит транспорт ионов, изменяется активность метаболических процессов и т.д. В то же время изменение параметров среды, таких как pH и редокс-статус клетки, влияет на эффективность синаптической передачи. Изучение взаимного влияния синаптической активности и параметров внутриклеточной среды необходимо для понимания процессов, происходящих в мозге в норме, а также при развитии нейродегенеративных заболеваний.

В последнее время существует гипотеза, что, вследствие частичной пространственной обособленности синаптических структур друг от друга и от основной части цитоплазмы, изменение параметров внутренней среды в синапсах может происходить локально. За счёт этого возможно осуществление тонкой регуляции синаптической передачи на уровне отдельных синапсов.

Так транспорт ионов Ca^{2+} и ускорение процессов катаболизма, сопровождающие повышенную электрическую активность, могут вызывать закисление цитоплазмы нейронов. В свою очередь, значение pH влияет на активность некоторых ионных каналов и переносчиков в нервных окончаниях, в связи с чем существует гипотеза, что модуляция клеточного pH может являться одним из механизмов регуляции синаптической передачи. Однако происходят ли в мозге связанные с активностью изменения pH и какова их природа, а также насколько равномерно изменяется pH в нейронах - пока не выяснено.

В нашей лаборатории был получен pH-чувствительный индикатор, удобный для количественного определения цитоплазматического pH, в том числе и в синаптических структурах, однако обладающий относительно низкой интенсивностью флуоресценции. В связи с этим, первая часть данной работы посвящена получению версии индикатора с повышенной интенсивностью флуоресценции в клетках, а также количественной и качественной характеристике динамики pH в теле и синаптических структурах в первичной культуре нейронов.

Высокий интерес вызывает также редокс-сигналинг в нейронах, поскольку, с одной стороны, активные формы кислорода вовлечены в развитие нейродегенеративных заболеваний, а с другой стороны, показано участие супероксид аниона и пероксида водорода в регуляции синаптической передачи. Многие исследования сигналинга активных форм кислорода, впрочем, опирались на косвенные данные, поскольку до сих пор не существовало инструмента для направленной продукции пероксида водорода в отдельных компартментах в клетке.

Наличие генетически кодируемой системы для локальной продукции пероксида водорода в клетках позволило бы более детально изучать редокс-сигналинг, в том числе влияние продукции пероксида в различных компартментах нейрона на эффективность синаптической

передачи. Разработка генетически кодируемой системы контролируемой продукции пероксида водорода составила вторую часть данной работы.

Цель работы. Целью данной работы было усовершенствование генетически кодируемого рН-индикатора *SypHer* для мониторинга физиологической активности нейронов, а также получение генетически-кодируемого инструмента для контролируемой генерации пероксида водорода в синаптических структурах на основе дрожжевой оксидазы D-аминокислот. Для выполнения данной цели были сформулированы следующие задачи:

1. Внесение замены C199S в индикатор *HyPer2* и анализ рН-чувствительности и яркости полученного индикатора в клетках.
2. Регистрация динамики рН в электрически активной диссоциированной культуре нейронов, а также в срезах мозга мыши.
3. Получение конструкций с синаптической локализацией индикатора и анализ динамики рН в синаптических окончаниях нейронов.
4. Получение синтетических конструкций оксидазы D-аминокислот и характеристика продукции пероксида водорода в клетках.
5. Получение конструкции оксидазы D-аминокислот для локальной синаптической продукции пероксида водорода в нейронах.

Научная новизна и практическая ценность работы. В данной работе мы получили новый генетически кодируемый ратиометрический индикатор *SypHer2*, обладающий более высокой интенсивностью флуоресценции в клетках, чем его предшественник, и позволяющий количественно измерять значение внутриклеточного рН. Используя полученный индикатор совместно с Ca^{2+} -индикатором *R-Geco*, нам удалось обнаружить, что спонтанная синхронная активность нейронов в культуре сопряжена с изменениями рН ~ на 0,1 единицу. Похожую динамику рН мы наблюдали и в срезах гиппокампа мыши, что позволяет предполагать, что наблюдаемые нами процессы теоретически могут возникать *in vivo*. Мы также провели ингибиторный анализ, который показал, что изменения рН связаны скорее с активацией метаболических реакций, а не с транспортом ионов кальция, как это ранее считалось. Это наблюдение может иметь терапевтическое значение, поскольку синхронная активность наблюдается в мозге во время эпилептических припадков.

Мы также получили конструкцию с пре- и постсинаптической локализацией и сравнили динамику рН в этих структурах в электрически активной культуре нейронов. Нами было впервые обнаружено, что в исследованных компартментах динамика рН различается, причём в постсинаптическом окончании амплитуда рН-колебаний практически вдвое выше, что должно отражать высокую степень локализации метаболических процессов в нейронах.

Помимо рН-индикатора, в нашей работе мы получили инструмент для направленной контролируемой продукции пероксида водорода с использованием оксидазы D-аминокислот дрожжей *Rhodospiridium toruloides* (DAO). С помощью биосенсора HyPer мы наблюдали продукцию пероксида водорода в клетках, трансфицированных DAO, в ответ на добавление D-аланина в клеточную среду. Мы обнаружили также, что белок, присоединяемый к N-концу DAO, окисляется в 2 или более раз эффективнее, чем свободно диффундирующий белок в том же компартменте. Это даёт возможность направленного окисления определённых клеточных белков и одновременно демонстрирует лабильность молекулы пероксида водорода в клетке.

Мы также получили конструкцию для пресинаптической локализации DAO в нейронах. Мы показали, что продуцируемый в аксоне пероксид водорода не попадает в тело и дендриты того же нейрона - очевидно, это свидетельствует о высокой активности антиоксидантных систем в нейроне, а также доказывает возможность компартментализации перекисного сигналинга. Таким образом, DAO может использоваться для изучения перекисного сигналинга в различных клеточных компартментах.

Таким образом, в нашей работе был усовершенствован инструмент, с помощью которого удалось охарактеризовать явление изменений рН, связанных с физиологической активностью нейронов, а также получен принципиально новый инструмент для модуляции редокс-статуса в клетках путём контролируемой генерации перекиси водорода.

Структура диссертации. Диссертационная работа изложена на 105 страницах и состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов, результатов и обсуждения, выводов, заключения, списка сокращений и списка литературы, включающего 255 ссылок. Диссертация содержит 27 рисунков.

Апробация работы. Основные результаты диссертации были доложены на Международном молодежном научном форуме "Ломоносов", 2013, Москва, Россия; 38th FEBS Congress "Mechanisms in Biology", 2013, Санкт-Петербург, Россия.

Публикации. По материалам работы опубликовано 3 статьи в рецензируемых журналах.

Содержание работы

1. Разработка рН-индикатора и регистрация динамики рН в нейронах

В 2006 году в нашей лаборатории был разработан флуоресцентный индикатор

HyPer, способный количественно определять концентрацию пероксида водорода в живых клетках. Позже нами была предпринята попытка измерения уровня пероксида в культуре гиппокампальных нейронов мыши. Было обнаружено, что в трёхнедельной диссоциированной культуре нейронов обнаруживаются периодические колебания сигнала HyPer (Рисунок 1). Мы наблюдали быстрые фазы падения сигнала индикатора, чередующиеся с фазами постепенного восстановления сигнала до исходного уровня. При этом DPI, ингибитор NADPH оксидазы - фермента, продуцирующего пероксид водорода, вызывал значительное понижение сигнала HyPer и подавлял колебания. На основании показаний HyPer можно было предположить существование высокого уровня продукции АФК в нейронах, который зависит от их электрической активности.

Позже, однако, мы обнаружили, что сигнал HyPer является чувствительным к значению pH среды. Кроме того, существует много данных о влиянии электрической активности нейронов на pH. В связи с этим у нас возник вопрос о необходимости использования pH-индикатора в качестве контроля в экспериментах с HyPer на нейронах.

Ранее уже была охарактеризована нечувствительная к пероксиду версия индикатора - SuperNep, которая успешно применялась в качестве радиометрического pH индикатора. Однако этот белок обладал очень низкой интенсивностью флуоресценции в клетках, что делало проблематичной регистрацию pH, особенно в культуре ткани, где уровень фоновой флуоресценции очень высок. Так в культуре гиппокампальных срезов мыши мы не смогли зарегистрировать достаточный сигнал SuperNep, который был пригоден для регистрации динамики pH.

В связи с этим, мы задались целью получить более яркий pH-индикатор.

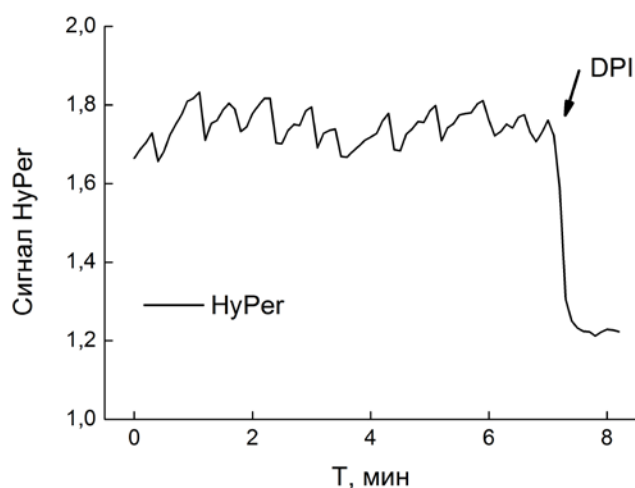


Рисунок 1. Изменение сигнала индикатора HyPer в культуре гиппокампальных нейронов. Регистрация осуществлялась с помощью сенсора HyPer, экспрессированного в цитоплазме мышинных гиппокампальных нейронов в смешанной диссоциированной культуре. Мы наблюдали периодическое падение и возрастание сигнала в функционирующих нейронах и резкое падение сигнала после добавления 10 мкМ ингибитора NADPH оксидазы DPI.

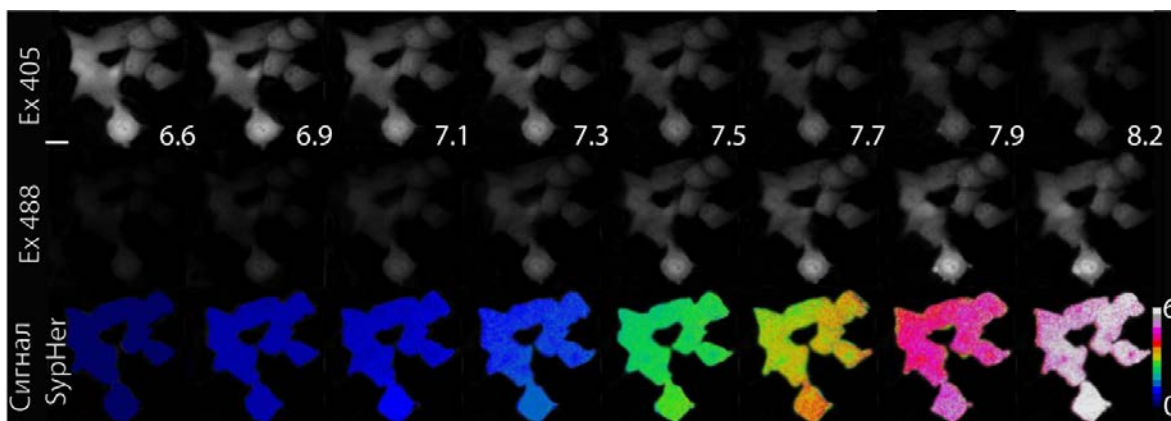


Рисунок 2. Калибровка индикатора SypHer 2 в клетках. Представлены фотографии клеток HeLa Kyoto, флуоресценция SypHer в которых возбуждалась светом 405 нм (верхний ряд), 488 нм (средний ряд), а также отношение интенсивности флуоресценции, возбуждаемой при 488 и 405 нм. Величина сигнала индикатора отображена псевдоцветами как указано на цветовой шкале в правом нижнем углу. Цифрами обозначены значения pH калибровочных буферов. Шкала 25 мкм.

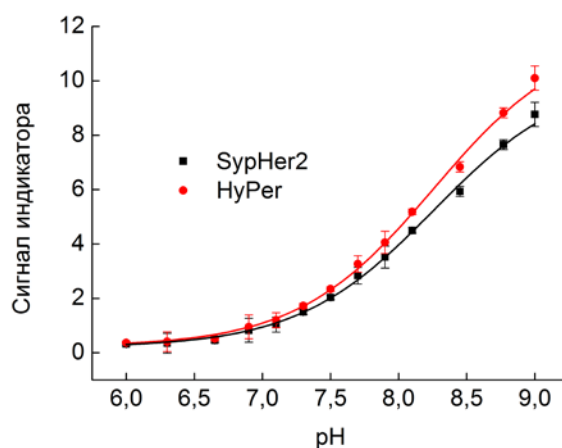


Рисунок 3. Калибровка индикатора HyPer и SypHer2 в клетках. Представлена зависимость сигнала индикаторов в клетках HeLa Kyoto от pH калибровочных буферов. Данные для каждого сенсора были получены не менее чем с 20 клеток. Для каждой точки указана стандартная ошибка среднего.

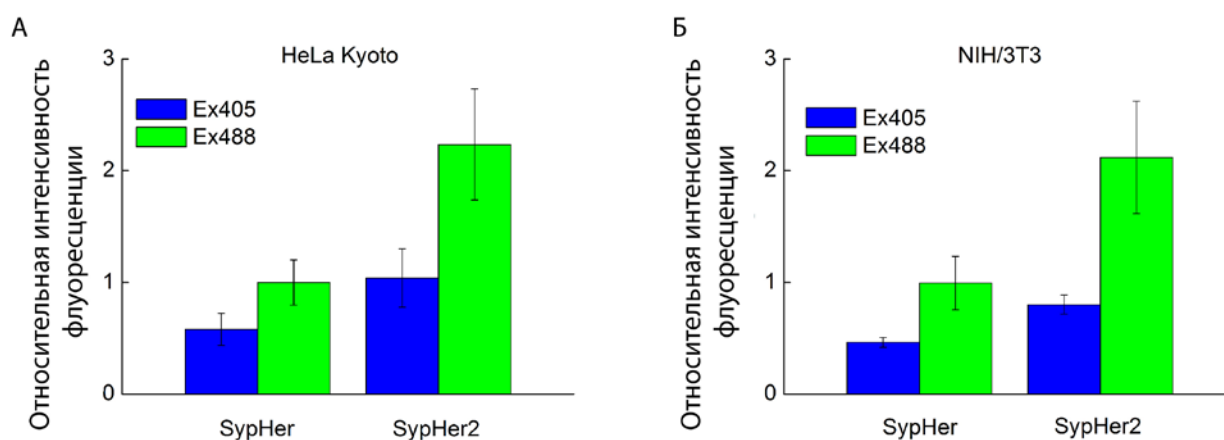


Рисунок 4. Сравнение яркости индикаторов SypHer и SypHer2. Показана относительная средняя интенсивность флуоресценции SypHer, возбуждаемая при 405 и 488 нм в клетках HeLa (А) и NIH/3Т3 (Б). За единицу в каждой клеточной линии была принята интенсивность флуоресценции SypHer, возбуждаемая светом 488 нм. Средняя интенсивность для каждой линии вычислялась не менее чем в 15 клетках, указана стандартная ошибка среднего.

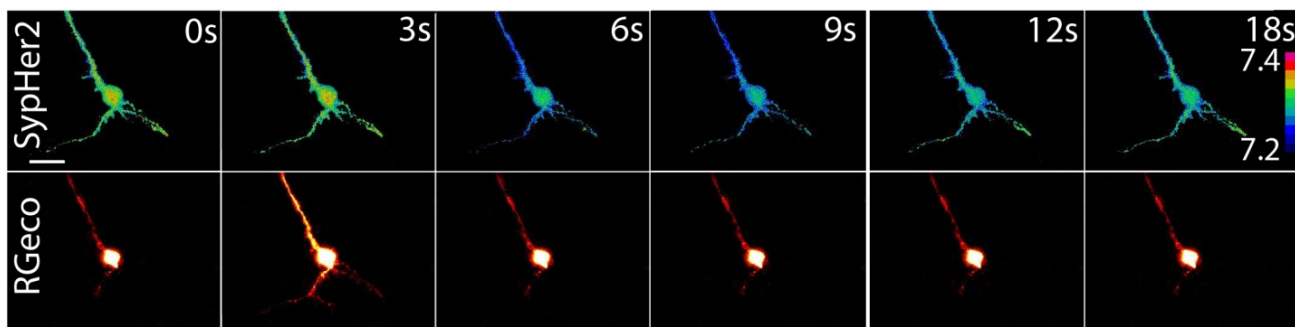


Рисунок 5. Регистрация внутриклеточного значения рН и концентрации Ca^{2+} в электрически активной культуре нейронов. Значение рН регистрировали с помощью индикатора SypHer2 (верхняя панель), уровень концентрации кальция - с помощью индикатора RGeco (нижняя панель). Значение рН отображено псевдоцветами как указано на цветовой шкале. Цифрами указано время с начала съёмки в секундах, шкала 40 мкм.

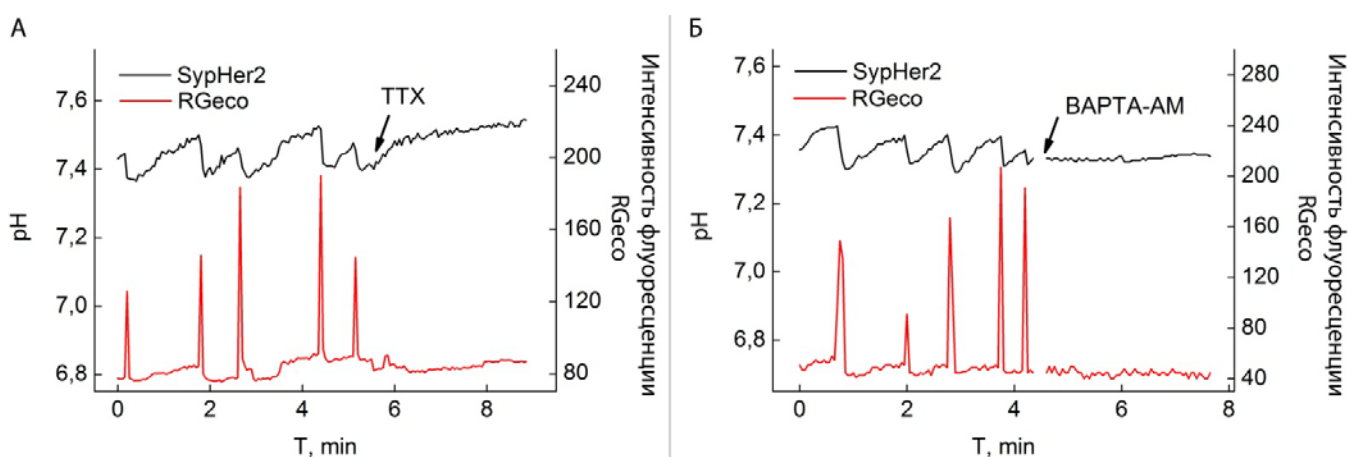


Рисунок 6. Регистрация колебаний рН в культуре нейронов. Представлен результат измерения рН и Ca^{2+} в теле отдельных нейронов, котрансфецированных SypHer2 и RGeco. Максимумы на графике интенсивности флуоресценции RGeco соответствуют входу кальция в клетки. Для подавления электрической активности в среду добавляли 100 нМ тетродотоксина, TTX (А), или 1 мМ ВАРТА-АМ (Б).

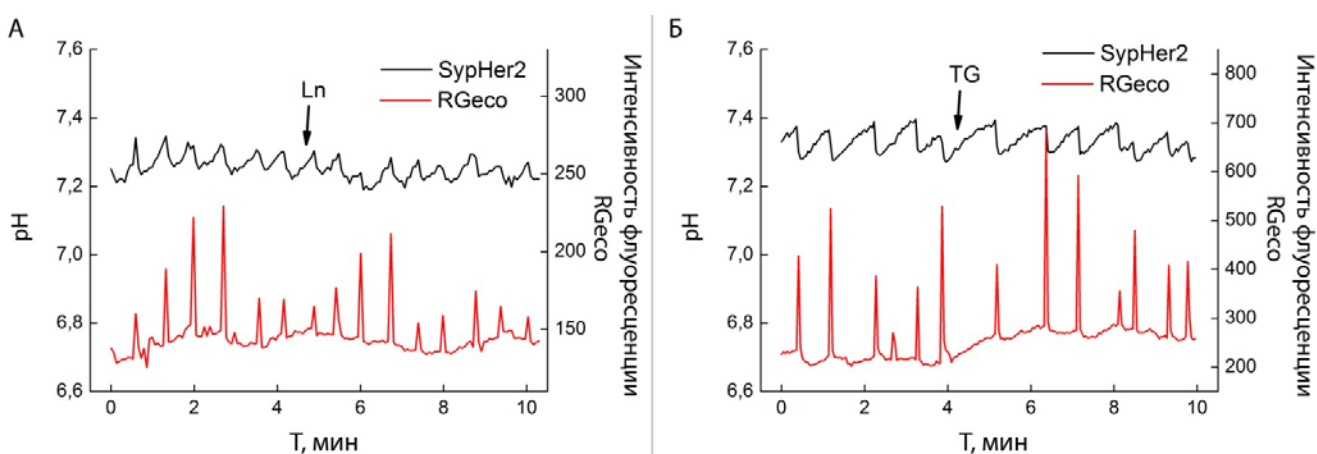


Рисунок 7. Ингибирование Ca^{2+} -АТФаз не влияет на характер колебаний рН в культуре нейронов. Представлен результат параллельного измерения рН и уровня Ca^{2+} теле нейрона, котрансфецированного SypHer2 и RGeco. Стрелкой указан момент добавления 0,5 мМ $LnCl_3$ (А) или 10 мкМ тапсигаргина (Б) для подавления РМСА и SERCA, соответственно.

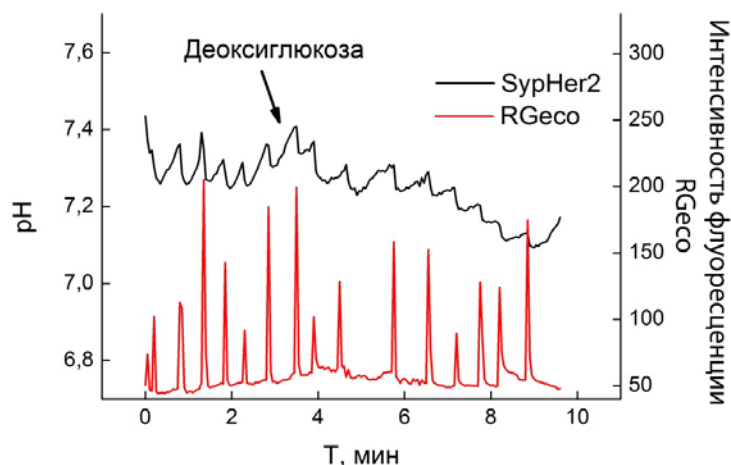


Рисунок 8. Влияние ингибирования гликолиза на характер колебаний рН в культуре нейронов. Представлен результат параллельного измерения рН и уровня Ca^{2+} теле нейрона, котрансфецированного SypHer2 и RGeo. Стрелкой указан момент замены среды имаджинга на содержащую 1 мМ дезоксиглюкозы и 20 мМ пирувата.

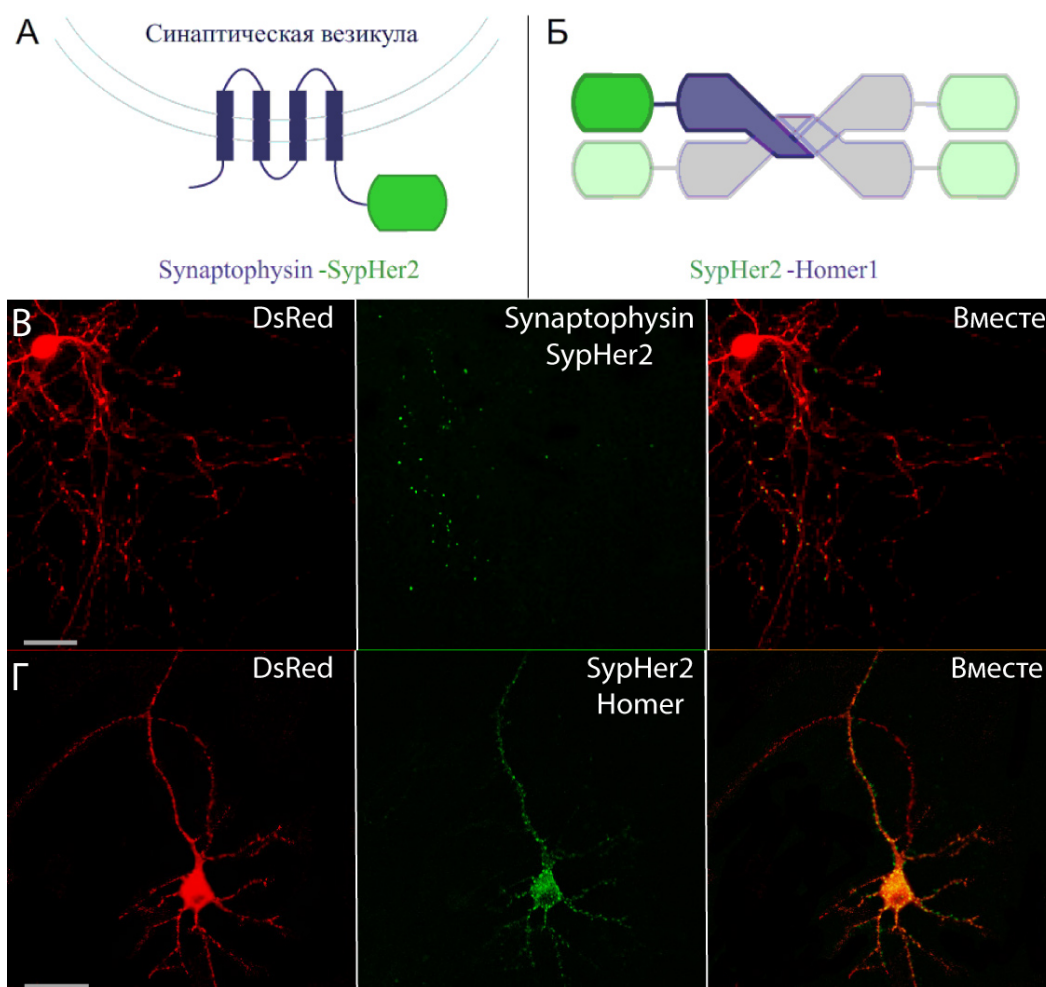


Рисунок 9 Синаптическая локализация SypHer2 в нейронах. **А)** Схема гибридного белка Synaptophysin-SypHer2, локализованного на мембране синаптической везикулы в пресинаптическом окончании. **Б)** Схема гибридного белка SypHer2-Homer1, локализованного в постсинаптическом окончании; на рисунке изображён тетрамерный комплекс белка. **В, Г)** Фотографии гиппокампальных нейронов в культуре, котрансфецированных DsRed и Synaptophysin-SypHer2 (**В**) или SypHer2-Homer1 (**Г**). Экспрессия красного флуоресцирующего белка DsRed осуществлялась для рассмотрения морфологии нейронов. Масштаб 40 мкм.

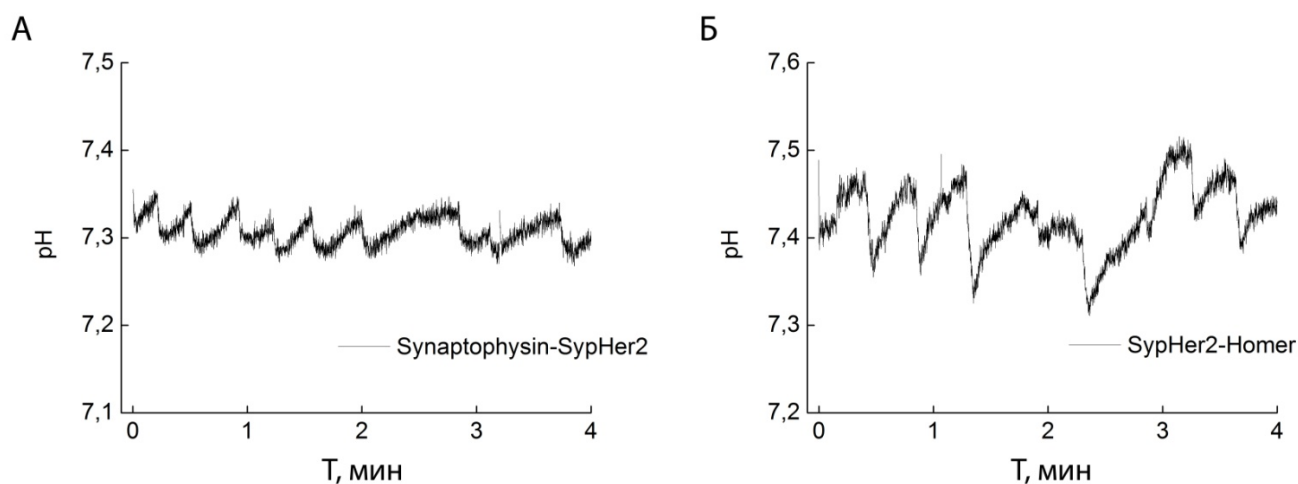


Рисунок 10 Регистрация колебаний рН в синаптических окончаниях нейронов в культуре. Представлен результат измерения спонтанных колебаний рН в нейронах, трансфицированных Synaptophysin-SypHer2 (А) и SypHer2-Homer (Б).

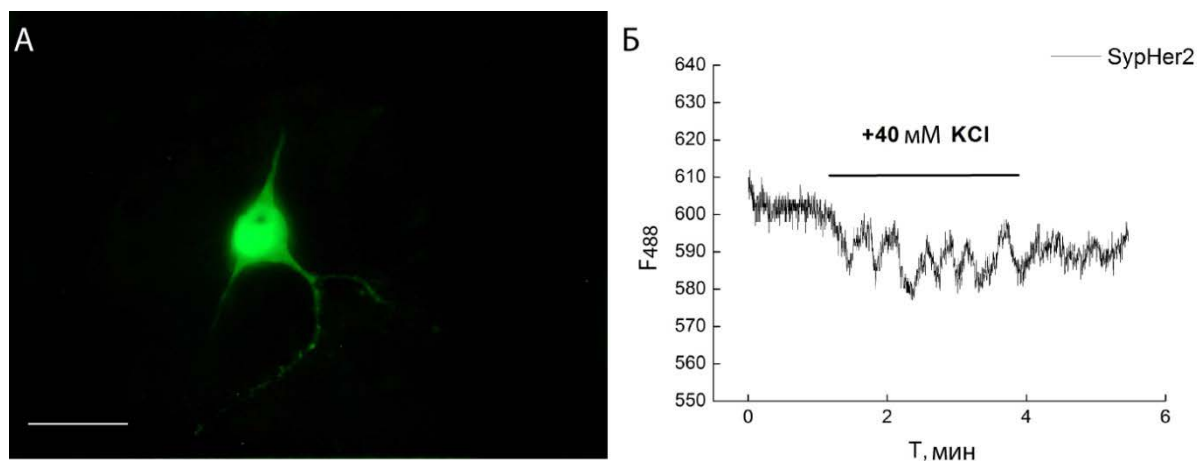


Рисунок 11 Экспрессия SypHer2 и мониторинг динамики рН в гиппокампальных нейронах среза мозга. А) Экспрессия сенсора SypHer2 в гиппокампальном нейроне в срезе через 12 часов после трансфекции с помощью генной пушки. Масштаб 30 мкм. Б) Регистрация флуоресцентного сигнала HyPer в гиппокампальном нейроне среза мозга. Черта указывает время перфузии среза раствором, содержащим 40 мМ КСl. Флуоресценцию HyPer возбуждали светом с длиной волны 488 нм.

1.1 Разработка генетически кодируемого индикатора с повышенной интенсивностью флуоресценции в клетках.

За основу нового рН индикатора мы взяли белок HyPer2, вариант индикатора уровня пероксида водорода, разработанный в нашей лаборатории и отличающийся более высокой интенсивностью флуоресценции в эукариотических клетках. Мы внесли в HyPer2 замену Cys121Ser, поскольку данный цистеин является ключевым остатком, окисление которого и обуславливает чувствительность индикатора к пероксиду водорода.

Мы проанализировали рН-чувствительность и среднюю интенсивность флуоресценции полученного индикатора SypHer2, в культурах клеток HeLa Kyoto и NIH/3T3 (Рисунок 2). Для этого мы использовали метод с добавлением специальных буферных растворов определённого

pH, содержащих ионофоры нигерицин и монензин в сочетании с повышенным содержанием K^+ и пониженным содержанием Na^+ и Cl^- . Нигерицин действует в качестве H^+/K^+ антипортера, а монензин в качестве H^+/Na^+ антипортера, совместное действие этих ионофоров приводит к уравниванию внутриклеточного значения pH с внешней средой и позволяет калибровать pH-индикатор непосредственно в клетках. Это минимизирует возможную погрешность сигнала индикатора, вызванную белковым окружением цитоплазмы, по сравнению с калиброванием индикатора в виде выделенного белка.

Сравнение pH-чувствительности индикаторов HyPer и SypHer2 не выявило заметных различий (Рисунок 3). Оба индикатора отвечали нарастанием отношения интенсивности флуоресценции, возбуждаемой при 488 и 405 нм, при повышении pH. SypHer2 обладает pKa около 8.1, линейным участком приблизительно от pH 7.5 до pH 8.5 с изменением сигнала в 4 раза на этом участке. Хотя такое значение pKa значительно превышает pH цитоплазмы (~7.1-7.4), SypHer2 может количественно измерять pH и в диапазоне pH 6.9-7.5, в котором сенсор изменяет сигнал приблизительно в 2 раза.

Мы заметили, что HyPer2 по неизвестным пока причинам обладает более яркой флуоресценцией в клетках эукариот, чем исходный вариант HyPer. Сравнение интенсивностей флуоресценции SypHer и SypHer2 на клетках HeLa Kyoto и NIH/3T3 также показало, что новый вариант pH-индикатора обладает более чем вдвое большей интенсивностью флуоресценции по сравнению с исходным (Рисунок 4). Это достаточно интересное наблюдение, учитывая что выделенный белок SypHer2 не отличается по яркости от SypHer. Одной из возможных причин может являться то, что SypHer2 обладает более стабильной структурой, устойчивой к деградации в клетке. Двукратное увеличение интенсивности флуоресценции значительно, поскольку оно позволяет более точное определение pH при измерении в условиях высокого уровня фоновой флуоресценции.

Таким образом, мы получили более яркий по сравнению с SypHer pH-индикатор с рациометрическим сигналом, позволяющий производить количественное определение pH в клетках.

1.2 Характеристика динамики значения цитоплазматического pH в диссоциированной культуре нейронов.

Следующим этапом нашей работы стала регистрация pH в диссоциированной эмбриональной культуре гиппокампальных нейронов мыши. Культуру гиппокампальных нейронов мы получали из эмбрионов мыши на 17м дне беременности и растили на конфокальных чашках со стеклянным дном в среде, содержащей эмбриональную бычью сыворотку. В этих условиях культура получалась смешанная, то есть содержала нейроны и астроциты.

Известно, что в культуре нейронов нередко наблюдается спонтанная электрическая активность, которая выражается в одновременной активации потенциала действия сразу мно-

гих клеток. Для исследования влияния спонтанной электрической активности на внутриклеточный pH мы котрансфецировали нейроны векторами, кодирующими SytHer2 и кальциевый индикатор RGeco, который позволял нам наблюдать активность клеток по увеличению внутриклеточной концентрации кальция. Спектр испускания флуоресценции RGeco находится в красном диапазоне спектра и не перекрывается с сигналом SytHer.

Действительно, через 2-3 недели после посадки нейронов при определённых условиях мы наблюдали спонтанные всплески активности в культуре, однако вероятность их появления варьировала в зависимости от возраста культуры и менялась от препарата к препарату. Чтобы стимулировать спонтанную активность, мы добавляли в культуральную чашку 50 мкМ биккуллина, ингибитора ГАМК рецепторов, перед каждым экспериментом. Для количественного определения значений pH в конце каждого эксперимента производилась калибровка индикатора в клетках в калибровочных буферах, pH 7.1 - 7.5, в присутствии ионофоров.

Регистрация сигнала SytHer2 в активной культуре нейронов показала, что значение pH меняется с периодичностью и амплитудой, повторяющей изменение сигнала индикатора Nupher, наблюдаемое ранее (Рисунки 5, 6). Исходный уровень pH в клетках составлял ~ 7.4. Приблизительно 1-2 раза в минуту pH падало на 0.1 единицу, после чего плавно достигало исходного значения. Параллельная регистрация активности нейронов и цитоплазматического pH показали: закисление происходило в течение не более трёх секунд после момента входа кальция в клетку (Рисунок 5). Очевидно, падение pH связано со спонтанной электрической активностью нейронов, и это подтверждается тем, что добавление ингибитора Na^+ каналов тетродотоксина или внутриклеточного хелатора кальция ВАРТА-АМ полностью подавляло как вход кальция в клетку, так и изменения внутриклеточного pH (Рисунок 6).

Хотя существует много работ, свидетельствующих об изменении pH при долговременной деполяризации мембран, например при добавлении NMDA или электрической стимуляции, ещё не было проведено количественной оценки таких изменений во время несколько более естественной ситуации - спонтанной активности нейронов.

Наблюдаемое нами значение цитоплазматического pH 7.2-7.4 расходится со значениями 6.8-7.2, полученными ранее некоторыми другими исследователями в культурах нейронов с помощью химических индикаторов, а также pHluorin. Эта разница может объясняться различными условиями ведения культуры и регистрации pH. Так, в нашем эксперименте съёмка осуществлялась на комнатном воздухе, т.е. в присутствии 0.04% а не 5% CO_2 . Ион бикарбоната действительно может участвовать в регуляции pH за счёт работы Na -зависимых $\text{HCO}_3^-/\text{Cl}^-$ обменников, к тому же карбонатный буфер, среди прочего, определяет буферную ёмкость цитоплазмы. Однако, мы убедились, что хотя базовое значение pH может меняться в присутствии 5% CO_2 и 20 мМ HCO_3^- в среде имаджинга, на амплитуду изменений pH содержание CO_2 не влияло. Это хорошо согласуется с данными литературы, что основной вклад в регуляцию pH в синаптических структурах вносят Na/H обменники, не зависящие от концентрации би-

карбоната. В связи с этим, для простоты мы проводили большинство экспериментов на воздухе при 37 °С.

В то же время, известна работа, в которой электрическая стимуляция нейронов в течение 60 секунд частотой 10 Гц приводила к изменению рН на 0,1 единицу, что соответствует наблюдаемой нами величине изменения рН в результате всплеска спонтанной активности. Интересно, что различные способы стимуляции - электрическая стимуляция в течение 1 минуты и спонтанная деполяризация в течение 1-3 секунд - приводили к одинаковой амплитуде изменения рН. Вероятно, во время спонтанной активности в культуре происходит значительно более продолжительная деполяризация, чем таковая вызванная отдельными электрическими импульсами.

Очевидно, изменения сигнала HypEr , зарегистрированные нами ранее, соответствуют изменению рН, а не изменению концентрации пероксида водорода. Однако чем же вызваны наблюдаемые изменения рН?

Среди прочих основными причинами закисления цитоплазмы нейронов считают вызванную входом кальция в клетки активацию $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$ обменников, а также активацию процессов гликолиза вследствие повышения уровня метаболизма активной клетки.

Во время возбуждения потенциала действия в нейроне значительно увеличивается внутриклеточная концентрация Ca^{2+} , который затем откачивается в межклеточное пространство и эндоплазматический ретикулум посредством Ca^{2+} -АТФаз и $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ обменников, часть может переноситься в митохондрии посредством белков-переносчиков. При этом Ca^{2+} -АТФазы цитоплазматической мембраны (PMCA) и SERCA на эндоплазматическом ретикулуме перемещают один протон в цитоплазму в обмен на ион кальция. Таким образом, в условиях длительного повышения концентрации кальция в цитоплазме Ca^{2+} -АТФазы гипотетически могут вызывать закисление цитоплазмы нейронов.

Мы решили проверить, вызовет ли ингибирование Ca^{2+} -АТФаз изменение характера колебаний рН (Рисунок 7). В наших условиях, ни добавление 500 мкМ LnCl_3 , ингибирующего PMCA, ни 10 мкМ тапсигаргина, ингибитора SERCA, не вызвало видимых изменений в амплитуде или частоте изменений внутриклеточного рН. Добавление более 1 мМ LnCl_3 подавляло нервную активность, по-видимому, за счёт общего нарушения входа кальция в пресинаптическое окончание и высвобождения медиатора (не приведено). Таким образом, активность кальциевых АТФаз не является основной причиной связанного с активностью закисления цитоплазмы нейронов.

Другой причиной закисления цитоплазмы во время длительной деполяризации мембраны может являться активация гликолитических процессов. Исследователями было показано, что ускоренное потребление АТФ, вызванное активацией различных АТФаз - Na^+/K^+ насоса, Ca^{2+} -АТФаз и протонного насоса синаптических везикул, в свою очередь вызывает ускорение катаболических процессов - гликолиза и цикла трикарбоновых кислот. В ходе гликолиза

одна молекула глюкозы превращается в две молекулы пировиноградной кислоты с выделением двух протонов. Следовательно, периодическая активация гликолиза могла бы приводить к колебаниям внутриклеточного значения рН.

Для проверки этой гипотезы мы заменяли среду имаджинга с содержанием 10 мМ D-глюкозы на среду, содержащую 1 мМ дезоксиглюкозы, обратимого ингибитора фосфоглюкоизомеразы, и 20 мМ пирувата в качестве источника энергии (Рисунок 8). Мы наблюдали двукратное уменьшение амплитуды рН-колебаний через 4 минуты после смены среды. При этом наблюдалось падение среднего значения рН, что, вероятно, является следствием активации протон-зависимого транспорта пирувата в клетку. Уменьшение амплитуды колебаний рН могло бы быть вызвано снижением электрической активности за счёт нарушения везикулярного транспорта в пресинаптических окончаниях. Однако в течение 6-8 минут после добавления дезоксиглюкозы мы не наблюдали существенного изменения динамики внутриклеточной концентрации Ca^{2+} , следовательно электрическая активность в культуре не претерпевала изменений. Неполное подавление рН-колебаний может объясняться неполным ингибированием гликолиза благодаря запасам глюкозы в клетке, а также существованием и других процессов, вызывающих закисление цитоплазмы.

Итак, ингибирование процесса гликолиза приводит к частичному подавлению колебаний рН, в то время как ингибирование Ca^{2+} -АТФаз не приводило к существенному изменению характера рН-колебаний. Закисление, наблюдаемое нами во время всплесков активности в культуре нейронов, может иметь регуляторное значение, поскольку активность многих ионных каналов, участвующих в передаче электрического импульса, является рН-зависимой. Кроме того, в случае продолжительных припадков и нарушения работы рН-регуляции в нейронах, закисление цитоплазмы нейронов может приводить к нарушению функционирования клеток, и знание причины нарушения гомеостаза может способствовать обнаружению мишеней для осуществления терапии нервных заболеваний.

Таким образом, с помощью нового индикатора SynHer2 нам удалось зарегистрировать и количественно охарактеризовать спонтанные колебания рН в культуре нейронов, а также показать участие метаболических процессов в формировании колебаний. Однако мы регистрировали изменения в основном в телах и крупных отростках нейронов, а ведь важнейшие процессы регуляции электрической передачи сосредоточены в синаптических окончаниях. Мы задались вопросом, если в пре- и постсинаптических структурах происходят мощные метаболические процессы в ограниченном объёме, будет ли в этих компартментах отличаться характер изменений рН, связанных с электрической активностью, от динамики рН в основной части цитоплазмы?

1.4 Получение синаптических конструкций с SypHer2

Как известно, в синапсах происходят ключевые процессы передачи сигнала в нейронах. В синаптических окончаниях сосредоточены комплексы ионных каналов и регуляторных белков, обеспечивающих поддержание ионных градиентов и транспорт нейромедиаторов, и выполняющих иные процессы, обуславливающие синаптическую передачу. Кроме того, нередко синаптические структуры оказываются структурно обособлены в клетке, как это происходит с дендритными шипиками гиппокампальных нейронов, что способствует образованию микроокружения, уникального для каждого синапса. Суммируя указанные особенности, мы предполагаем, что биохимические параметры, в том числе и pH, могут изменяться более-менее независимо друг от друга в синаптических компартментах.

В связи с этим, мы поставили перед собой задачу получить варианты SypHer2, локализующиеся в пре- и постсинаптических окончаниях, и количественно оценить в этих компартментах изменения pH, связанные с активностью. Для разработки индикатора с пресинаптической локализацией мы присоединили SypHer2 к С-концу мембранного белка синаптических везикул Synaptophysin через гибкий 22-аминокислотный линкер, так чтобы SypHer2 находился на цитоплазматической стороне мембраны. Этот белок мы выбрали благодаря его специфической локализации в синаптических компартментах и поскольку он уже был успешно применён для локализации других флуоресцентных индикаторов. Для достижения постсинаптической локализации мы присоединили через 13-аминокислотный линкер с С-конца SypHer2 структурный белок постсинаптической плотности Homer1 (PSD-Zip45) (Рисунок 9). Homer1 - тетрамерный белок, участвующий в организации постсинаптической плотности; белок, меченый GFP, применяется для идентификации постсинаптических окончаний нейронов.

Проекспрессировав Synaptophysin-SypHer2 в культивируемых гиппокампальных нейронах, мы наблюдали небольшие включения флуоресцирующего белка в аксонах, но не в теле и дендритах нейронов. В случае белка Homer-SypHer2 мы наблюдали включения индикатора в теле и дендритах при отсутствии сигнала в аксоне нейрона. При этом мы детектировали небольшую фоновую флуоресценцию индикатора, отражающую, по-видимому, фракцию Homer1, не участвующую в формировании постсинаптической плотности. Эти результаты хорошо согласуются с данными по экспрессии флуоресцентно меченых белков Synaptophysin и Homer1, известными из литературы.

Регистрация сигнала синаптически локализованных индикаторов в активной культуре гиппокампальных нейронов позволила нам обнаружить различия в динамике pH в пре- и постсинаптических структурах (Рисунок 10). В пресинаптическом окончании мы наблюдали изменения pH в пределах 0.1 единицы pH, что согласуется с данными, полученными нами для индикатора с цитоплазматической локализацией. В то же время, сигнал сенсора, локализованного с Homer1 в дендритах, как правило показывал практически вдвое большую амплитуду колебаний - до 0.2 единиц pH. Это наблюдение было справедливо в различных препаратах

нейронов и независимо от среднего значения цитоплазматического рН. Кроме того, если анализировать форму графиков, в постсинаптическом окончании переход от закисления к восстановлению выражен более отчётливо, а кривые, соответствующие восстановлению рН, показывают значительно большую скорость роста сигнала.

Таким образом, по нашим наблюдениям колебания рН в постсинаптических окончаниях оказались значительно более выражены, чем в цитоплазме и пресинаптических окончаниях нейронов. Из наших предыдущих экспериментах мы выяснили, что ускорение метаболических процессов, в частности гликолиза, является одной из основных причин закисления цитоплазмы в нейронах. Возможно, всплески активности вызывают большее потребление энергии в постсинаптических окончаниях и, как следствие, более активное протекание метаболических процессов. Действительно, данные литературы по анализу потребления кислорода в срезах мозга говорят о том, что более половины энергетических затрат нейронов является прямым следствием активации ионных токов через NMDA рецепторы и генерации постсинаптического потенциала. Разница в скорости восстановления рН после закисления в синаптических структурах может свидетельствовать о более активной работе системы рН-регуляции в постсинаптических окончаниях. Возможно это выражается в более высокой концентрации белков-регуляторов рН, таких как Na/H обменников, как это было показано для NHE5. Логично предположить, что это является прямым следствием более значительных изменений рН в этих компартментах.

Насколько нам известно, мы впервые показали различие динамики рН в пре- и постсинаптических окончаниях с помощью генетически-кодируемого индикатора. То, что динамика значения рН в активных нейронах отличается в постсинаптических окончаниях и в основном объёме цитоплазмы, свидетельствует в пользу гипотезы о существовании локального микроокружения в постсинаптических структурах, таких как дендритные шипики. Вполне вероятно, что регуляция передачи в отдельных синапсах может осуществляться на уровне рН, хотя мы пока не смогли зарегистрировать различий в динамике рН в соседних дендритных шипиках. Генетически кодируемые биосенсоры позволяют проводить изучение процессов регуляции рН на уровне отдельных клеточных структур, и если изменение рН действительно отражает уровень энергетического потребления в нейроне, это может быть использовано в целях мониторинга метаболической активности в отдельных синапсах.

Однако достаточно ли яркий SynHer2 для регистрации рН в более сложных системах, таких как срезы мозга?

1.5 Экспрессия *SypHer2* в короткоживущих срезах мозга мыши

Увеличение яркости флуоресценции индикатора особенно ценно для имаджинга *in vivo* в условиях высокого уровня шума вследствие автофлуоресценции в тканях и заниженного уровня сигнала вследствие поглощения и рассеивания света. Для проверки эффективности работы индикатора в первичной культуре нервной ткани мы осуществили экспрессию *SypHer* под промотором *CMV* в культуре срезов мозга мыши. Доставка вектора осуществлялась на частицах коллоидного золота путём биолиственной трансфекции.

Нам удалось зарегистрировать флуоресценцию *SypHer2* через 12 часов после трансфекции (Рисунок 11). Большинство нейронов, расположенных на поверхности среза, погибли из-за механических повреждений, полученных во время приготовления среза, что выражалось в вакуолизации аксонов и дендритов. Однако яркости флуоресценции индикатора было достаточно, чтобы рассмотреть морфологию нейронов в более глубоких слоях среза, не выказывающих признаков клеточной гибели.

Чтобы проверить функциональность сенсора, мы индуцировали электрическую активность нейронов путём перфузии срезов в присутствии 40 мМ KCl. Из литературы известно, что такая концентрация K^+ вызывает деполяризацию нейронов и появление спонтанной, "припадной" активности, подобной наблюдаемой нами в культуре нейронов.

Действительно, замена базового раствора перфузии на раствор, содержащий 40 мМ KCl, позволила нам наблюдать спонтанные колебания сигнала *SypHer*, которые быстро затухали после возврата исходного раствора перфузии. К сожалению, по техническим причинам (отсутствие лазера необходимой длины волны) нам не удалось откалибровать зависимость сигнала индикатора от pH в срезе. Тем не менее, мы подтвердили, что индуцированная электрическая активность нейронов в культуре срезов мозга может вызывать спонтанные колебания цитоплазматического pH. Этот результат хорошо согласуется с литературными данными, в которых измерение pH в срезах гиппокампа проводили, используя химический индикатор SNARF.

Таким образом, нам удалось получить более яркую версию pH-индикатора *SypHer* и использовать его в качестве инструмента для регистрации повышенной электрической активности нейронов посредством мониторинга скорости протекания в них метаболических процессов. В дальнейшем мы планируем попытаться использовать индикатор для изучения динамики pH в синаптических компартментах *ex vivo* и *in vivo*.

Роль pH в регуляции метаболизма и синаптической передачи в нейронах активно изучается уже десятки лет, и количество научных открытий в этой области с каждым годом только растёт. Мы уверены, что инструмент для мониторинга pH в нейронах, в том числе в синаптических структурах, расширит понимание происходящих в нормально функционирующем мозге процессов, а также поможет обнаруживать нарушения в регуляции гомеостаза и физиологической активности нейронов.

Высокая динамичность показателя рН в нейронах затрудняет измерение рН с помощью биосенсора HyPer. Сейчас в нашей лаборатории ведётся разработка перекисного индикатора с флуоресценцией в красной области спектра, что позволит регистрировать количество пероксида с учётом вклада рН в изменение сигнала HyPer. Однако помимо возможности детекции пероксида водорода, мы считаем не менее важным уделить внимание возможности направленной продукции H_2O_2 в клетке.

2. Система для контролируемой локальной продукции пероксида водорода

До недавнего времени эффект продукции пероксида водорода пытались имитировать внесением перекиси извне, что неизбежно должно было приводить к массовым окислительным повреждениям клеточных структур. Сейчас уже стало ясно, что эффект пероксида водорода может быть совершенно различным в зависимости от количества, места и времени его продукции в клетке. Существование системы контролируемой продукции пероксида водорода значительно расширило бы возможности изучения перекисного сигналинга, поскольку позволила бы симулировать физиологическое повышение концентрации пероксида водорода в отдельных субклеточных компартментах, например, только в аксонах или только в дендритах нейронов. В связи с этим, вторая часть данной работы была посвящена созданию генетически-кодируемого инструмента для контролируемой локальной продукции пероксида водорода.

2.1 Оксидаза D-аминокислот может продуцировать пероксид водорода в ответ на добавление D-аланина к клеткам

В качестве кандидата на роль генетически-кодируемого источника АФК мы выбрали дрожжевую оксидазу D-аминокислот (DAO) из *Rhodotorula gracilis*. Как было показано выше, этот фермент окисляет некоторые D-аминокислоты с выделением соответствующих α -кетокислот, иона аммония и пероксида водорода. Выбранная нами DAO используется в промышленности в одной из стадий биосинтеза антибиотика цефамандола из цефалоспориноса, поэтому активность фермента и его специфичность к различным D-аминокислотам были хорошо изучены. Дрожжевая оксидаза D-аминокислот обладает сравнительно высокой активностью по сравнению с аналогичными белками других организмов, к тому же использование животных DAO может привести к их нежелательному взаимодействию с естественными белками-партнёрами в клетке. Кроме того, субстрат оксидазы относительно недорогой и может быть легко введён в организм, например с пищей. При этом собственные D-аминокислоты эукариот не вовлечены в основные биохимические процессы в организме, что снижает риск побочных эффектов от введения D-аминокислот и оверэкспрессии DAO.

Мы решили проверить, можно ли использовать DAO в качестве генетически-кодируемого инструмента для продукции пероксида водорода в клетках. Для этого мы получили ген дрожжевой оксидазы D-аминокислот, оптимизированный для экспрессии в животных и удалённым сигналом локализации в микротельцах. Затем мы получили гибридные белки, в которых к С- или N-концу DAO через гибкие линкеры присоединили флуоресцентный индикатор пероксида водорода HyPer (или пероксид-нечувствительный вариант - SypHer, в качестве контроля на рН). В дальнейшем оказалось, что в случае конструкции, в которой HyPer находился с С-конца DAO, мы не наблюдали изменения сигнала в ответ на добавление D-аланина. При этом HyPer демонстрировал рост флуоресценции в ответ на добавление H_2O_2 , что означало нарушение функции DAO, но не HyPer в гибридном белке. В связи с этим в дальнейших экспериментах мы использовали N-концевую конструкцию, HyPer-DAO.

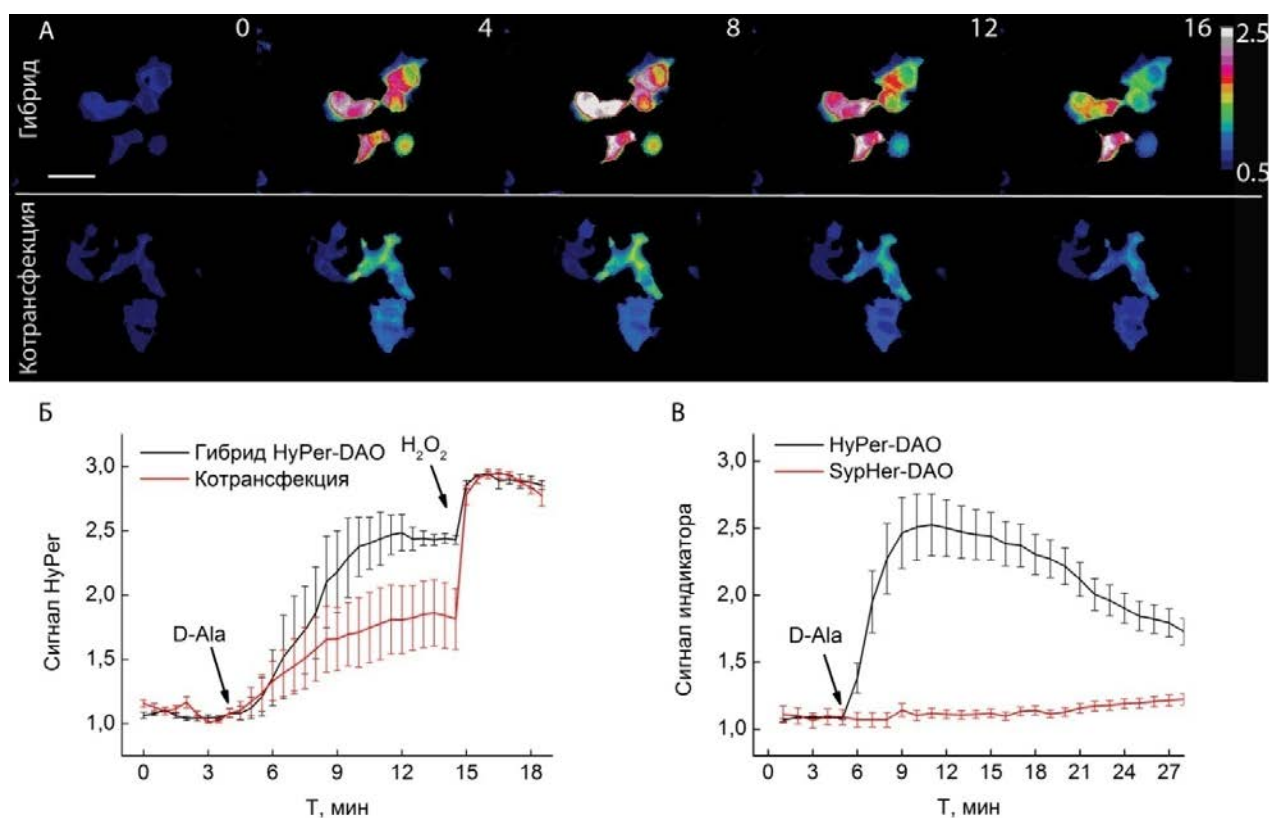


Рисунок 12. Продукция пероксида водорода в клетках HeLa Kyoto в ответ на добавление D-аланина. А) Показаны фотографии клеток HeLa Kyoto, экспрессирующих гибридный белок HyPer-DAO (верхний ряд) или DAO и HyPer отдельно (нижний ряд). Величина сигнала индикатора отображена псевдоцветами как указано на цветовой шкале. Цифрами обозначено время после добавления D-аланина в минутах. Шкала 25 мкм. Б) Динамика продукции пероксида водорода в ответ на добавление 8 мМ D-аланина в клетках HeLa Kyoto, трансфецированных гибридным белком HyPer-DAO (чёрный) или котрансфецированных HyPer и DAO в отдельных векторах. В) Сравнение сигналов, полученных с помощью гибридных белков HyPer-DAO и пероксид-нечувствительного SypHer-DAO, используемого в качестве рН-контроля. В Б) и В) представлены значения сигнала HyPer, усреднённые не менее чем по 20 клеткам, указана стандартная ошибка среднего. Стрелки отмечают момент добавления D-аланина до концентрации 8 мМ, или 100 мкМ пероксида водорода.

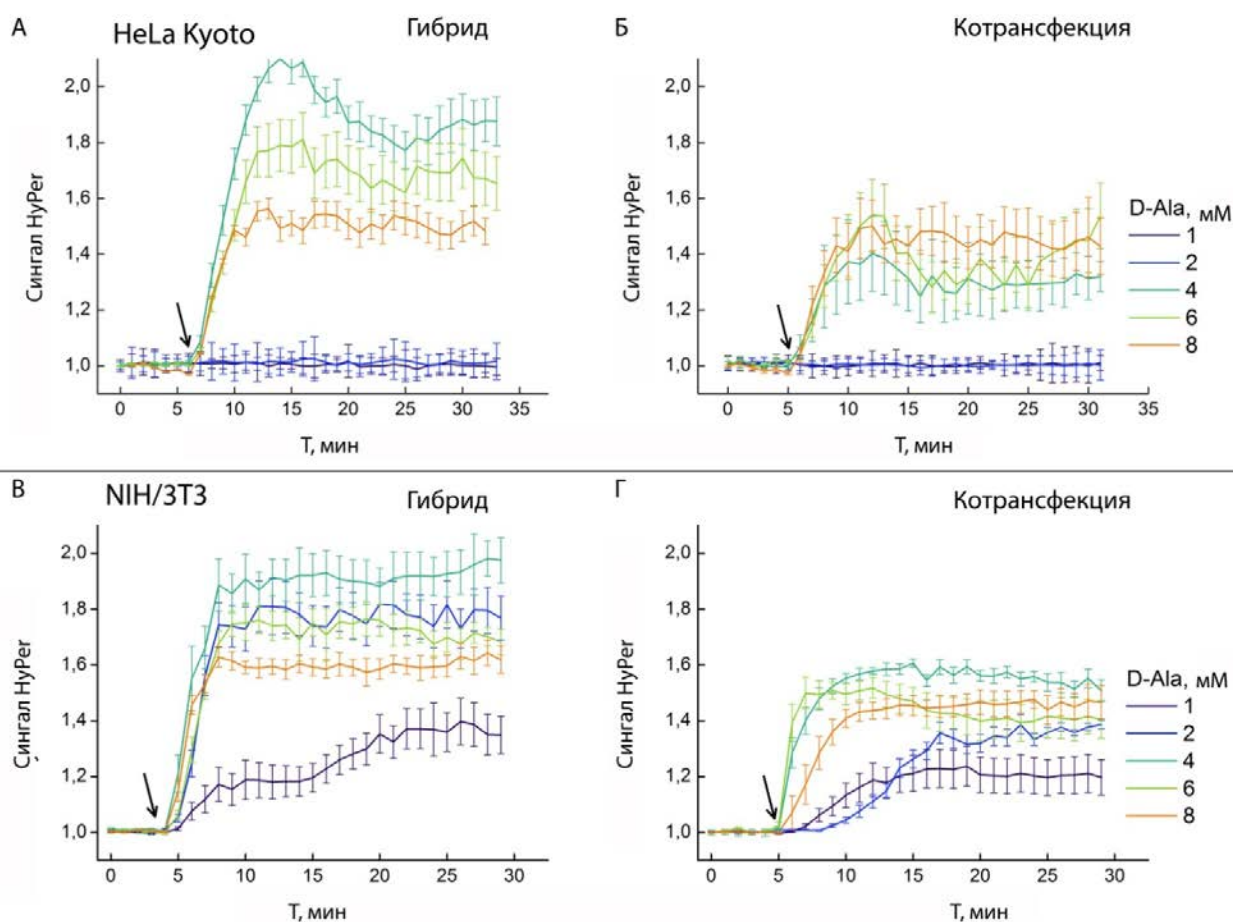


Рисунок 13. Зависимость динамики продукции пероксида водорода в клетках HeLa Kyoto и NIH/3T3 от концентрации D-аланина. Представлены значения сигнала HуPer, усреднённые не менее чем по 20 клеткам HeLa Kyoto **А,Б**) и NIH/3T3 **В,Г**), указана стандартная ошибка среднего. Стрелка отмечает момент добавления D-аланина до концентрации, указанной в легенде.

Мы трансфецировали клетки HeLa Kyoto вектором, кодирующим гибридный белок HуPer-DAO, или смесью плазмид, кодирующих HуPer и DAO (Рисунок 12). Наличие флуоресценции в цитоплазме подтверждало нормальное сворачивание гибридного белка. Добавление 4 мМ D-аланина вызывало рост сигнала HуPer в течение нескольких минут, что соответствует увеличению концентрации перекиси водорода в клетке. Как правило, приблизительно через 10 минут после добавления D-аланина рост флуоресценции останавливался, а при длительной инкубации часто наблюдалось падение флуоресцентного сигнала на 20-30%. Возможно падение сигнала было вызвано ингибированием DAO накапливающимися продуктами окисления. Добавление L-аланина вместо D-аланина не приводило к изменениям сигнала (не приведено).

Мы обнаружили, что максимальное изменение сигнала HуPer в гибридном белке в ответ на добавление D-аланина практически вдвое превышает максимальное увеличение сигнала в системе с коэкспрессией индивидуальных белков. При этом добавление 100 мкМ пероксида водорода для полного окисления HуPer вызывает одинаковый ответ индикатора в обеих системах, что означает, что разница в сигналах не связана с изменением динамического диапазона HуPer в гибридном белке.

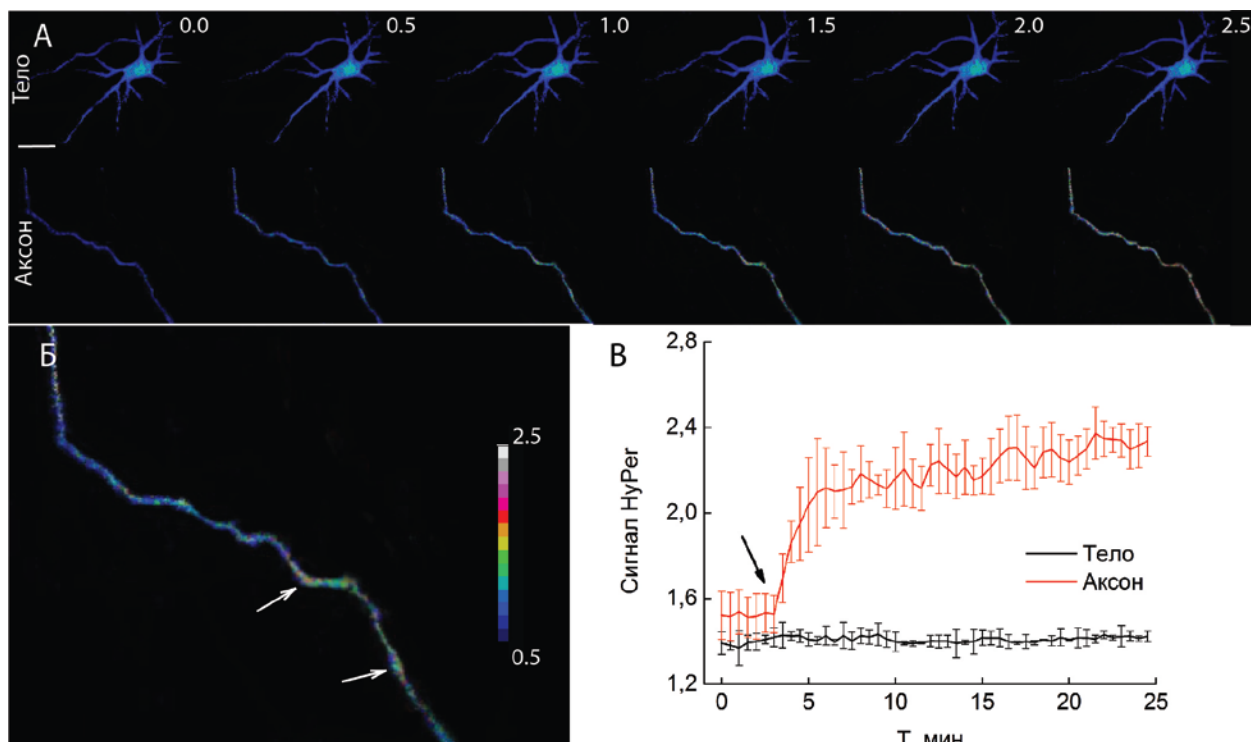


Рисунок 14. Визуализация продукции пероксида водорода в аксоне нейрона.

А) Представлены фотографии тела (верхний ряд) и аксона (нижний ряд) нейрона, котрансфецированного Synaptophysin-DAO и НuPer. Цифры указывают время в минутах после добавления 4 мМ D-аланина. Масштаб 40 мкм. **Б)** Увеличенная фотография аксона через 1.5 минуты после добавления D-аланина. Стрелками обозначены два участка аксона, в которых наблюдается продукция пероксида водорода. В **А)** и **Б)** величина сигнала индикатора отображена псевдоцветами как указано на цветовой шкале в **Б)**. **В)** Динамика продукции пероксида водорода Synaptophysin-DAO в теле и аксоне нейрона. Представлено среднее значение сигналов от 3х гиппокампальных нейронов, указана стандартная ошибка среднего. Стрелка обозначает момент добавления 4 мМ D-аланина.

Очевидно, объединение НuPer и DAO в единый конструктор приводит к увеличению эффективности окисления НuPer в несколько раз. Этот результат не является неожиданностью, поскольку пероксид водорода является крайне лабильной молекулой и быстро разрушается в клетке ферментами антиоксидантных систем. Это свойство может быть использовано для направленного окисления исследуемого белка, например, для изучения влияния окисления редокс-активных цистеинов киназ или фосфатаз на их активность.

Одним из продуктов реакции окисления D-аланина является ион аммония, который, гипотетически, может приводить к защелачиванию среды, что также может приводить к росту сигнала НuPer вследствие рН-чувствительности его хромофора. Чтобы проверить, вызывает ли добавление D-аланина к DAO-экспрессирующим клеткам изменение внутриклеточного рН, мы трансфецировали HeLa гибридным белком SynPer-DAO. SynPer обладает идентичной рН-чувствительностью с НuPer, при этом нечувствителен к пероксиду водорода, поэтому он являлся оптимальным рН-контролем в нашем эксперименте. В такой системе добавление 4 мМ D-аланина не вызывало изменения сигнала, следовательно, реакция окисления

D-аланина DAO в наших условиях не вызывает существенного защелачивания цитоплазмы.

Мы решили проверить, будет ли отличаться чувствительность систем с гибридным белком и свободно экспрессируемой DAO к различным концентрациям D-аланина. Мы ожидали, что при достаточно низких концентрациях D-аланина система с гибридным белком позволит детектировать небольшие количества продуцируемого пероксида водорода, не детектируемые или практически не детектируемые в системе с коэкспрессией индивидуальных белков.

Выяснилось (Рисунок 13), что в клетках HeLa Kyoto рост радиометрического сигнала в обеих системах наблюдался только в присутствии в среде 4 мМ D-аланина и более; в присутствии 2 мМ D-аланина продукции пероксида не наблюдалось. К нашему удивлению, в другой клеточной линии, NIH 3T3, мы регистрировали продукцию перекиси водорода уже в присутствии 1 мМ D-аланина. Ещё одно наблюдение заключалось в том, что, максимальный уровень продукции пероксида в двух клеточных линиях наблюдался в присутствии 4 мМ D-аланина, а дальнейшее увеличение концентрации D-аланина нередко приводило к снижению уровня продукции.

По-видимому, в исследованных клеточных линиях транспорт аминокислот осуществляется с различной эффективностью. Это свойство полезно учитывать в работе с различными тканями или организмами. Мы ожидаем, что в более активно делящихся клетках транспорт D-аланина, а следовательно и продукция пероксида должны осуществляться более эффективно. Совместная экспрессия DAO и HuPer позволяет подобрать оптимальные условия для продукции пероксида водорода клетками.

Поскольку дрожжевая DAO обладает относительно низким сродством к D-аланину (около 1 мМ по данным литературы), проблема проницаемости клеток может стать существенной для использования нашего инструмента *in vivo*, ведь в клетку проникает только часть добавленного D-аланина. В связи с этим возникает вопрос, можно ли улучшить проницаемость клеток для D-аминокислот. На основании данных литературы по эффективности транспорта радиоактивно меченых D-аминокислот и селективности оксидазы D-аминокислот мы пришли к выводу, что D-аланин, D-фенилаланин и в меньшей степени D-метионин являются оптимальными субстратами для продукции пероксида водорода в клетках. При этом транспорт D-фенилаланина и D-метионина, по-видимому, осуществляется разными транспортными белками (транспортёры аминокислот L- и ASC-типа). Возможно, в некоторых клеточных линиях целесообразно использовать другие аминокислоты, нежели D-аланин. Альтернативным вариантом может стать химическая модификация аминокислот, например, использование сложных эфиров, легче проникающих через клеточную мембрану и разрушающихся внутри клеток с высвобождением аминокислоты. Наконец, ещё одним способом улучшения эффективности продукции пероксида является поиск DAO с более высоким сродством к D-аминокислотам.

Можем ли мы количественно оценить уровень продукции пероксида в клетках? Основываясь на данных, полученных путём калибровки сигнала выделенного белка HyPer в ответ на добавление пероксида водорода, концентрация пероксида водорода, при которой наблюдается полумаксимальное окисление сенсора HyPer, составляет 100-150 нМ. На основании этого мы утверждаем, что использование нескольких миллимоль внеклеточного D-аланина позволяет локально продуцировать в пределах 25 - 250 нМ пероксида, что близко к наблюдаемым в физиологических условиях концентрациям эндогенно вырабатываемых АФК, например в ответ на стимуляцию некоторыми гормонами. Для сравнения, чтобы добиться подобной внутриклеточной концентрации пероксида водорода по нашим оценкам необходимо поддерживать постоянную концентрацию внеклеточного H₂O₂ порядка 5-20 мкМ.

2.2 Продукция пероксида водорода в нейронах

Получив систему для локальной продукции пероксида водорода, мы решили проверить, можно ли добиться локальной продукции пероксида водорода в синаптических окончаниях. Для этого мы собрали конструкцию Synaptophysin-DAO с пресинаптической локализацией и провели котрансфекцию первичной культуры гиппокампальных нейронов мыши полученной конструкцией совместно с биосенсором HyPer. При разработке химерного белка для постсинаптической продукции пероксида водорода мы столкнулись с проблемой сворачивания белка DAO в конструкторе с белком Homer1, в данный момент мы занимаемся оптимизацией конструкции.

Как мы и ожидали (Рисунок 14), добавление D-аланина к нейронам вызывало продукцию пероксида в аксонах, но не в дендритах и телах нейронов. При этом рост сигнала HyPer происходил не равномерно по всему аксону, а сначала в небольших участках, и только потом распространялся на остальную его часть. По-видимому, эти небольшие участки соответствуют местонахождению пресинаптических окончаний аксона. Интересно, что даже через значительный промежуток времени пероксидный сигнал распространяется по аксону, но не достигает тела и дендритов нейронов. Это происходит вследствие того, что пероксид водорода разрушается в клетке антиоксидантными системами. Это делает возможным локализацию перекисного сигналинга, так что молекулы пероксида, вырабатываемые в аксонах и дендритах, могли бы независимо модулировать различные биохимические процессы.

Из литературы известны данные о том, что пероксид водорода влияет на выброс нейромедиатора через изменение концентрации кальция в пресинаптических окончаниях. Наличие генетически-кодируемого инструмента для продукции пероксида водорода позволит, например, отделить влияние H₂O₂ в пресинаптических окончаниях на синаптическую проводимость от эффектов продукции АФК в постсинаптических и других клеточных структурах. Однако такие исследования потребуют получения высокого процента клеток,

экспрессирующих DAO в культуре нейронов. В связи с этим нашими ближайшими задачами помимо разработки новых конструкций DAO, локализованных в постсинаптическом компартменте, станет разработка вирусных векторов для трансдукции нейронов в культуре и *in vivo*.

Мы предполагаем, что DAO может использоваться в трансгенных животных для продукции пероксида водорода, в том числе в мозге. Локальная экспрессия пероксида водорода позволила бы изучать роль АФК в нейродегенеративных заболеваниях и старении и тестировать лекарства, в том числе на основе антиоксидантов. При этом не стоит забывать про присутствие естественных D-аминокислот, например, D-серина в мозге: во взрослом мозге концентрация D-серина может достигать порядка 300 нм/г мокрого веса головного мозга. Оверэкспрессия DAO может вызывать некоторые изменения в регуляции работы MNDA-рецепторов, следовательно, и в поведении животных, а также повышать фоновую продукцию пероксида водорода, поэтому необходимые контроли должны быть соблюдены. С другой стороны, метаболизм D-аминокислот эукариот сосредоточен в пероксисомах, поэтому концентрация D-аминокислот в цитоплазме крайне мала, и продукция активных форм кислорода цитоплазматической DAO, вероятно, будет незначительна.

Таким образом, мы показали, что оксидаза D-аминокислот в сочетании с НуPer позволяют направленно продуцировать и визуализировать пероксид водорода в клетках животных. По нашим данным, на сегодняшний день это единственная в своём роде система контролируемой продукции пероксида водорода в клетках. Нам удалось стимулировать продукцию пероксида водорода в пресинаптических окончаниях нейрона и показать, что продуцируемый пероксид быстро разрушается и не распространяется на тело и дендриты того же нейрона. Такая система значительно расширяет возможности изучения пероксидного сигналинга и окислительного стресса в различных клеточных компартментах. В дальнейшем мы планируем опробовать полученный инструмент *in vivo* и исследовать эффект продукции пероксида водорода в синаптических окончаниях на поведение мышей.

Сейчас нейродегенеративные заболевания являются одной из самых главных проблем здравоохранения. Однако применение антиоксидантов может вызвать отрицательные результаты, поскольку пероксид водорода выполняет важную регуляторную роль в нейронах, в связи с этим необходимо тщательное изучение локализации продукции "вредного" пероксида. Мы уверены, наша система позволит эффективно находить и проверять мишени для терапии заболеваний, вызванных окислительными повреждениями.

ВЫВОДЫ

1. Получен флуоресцентный индикатор SynHer2, обладающий повышенной яркостью флуоресценции в эукариотических клетках. pK_a сенсора составляет 8,1, отношение пиков возбуждения флуоресценции при изменении значения pH от 7.5 до 8.5 увеличивается в 4 раза. Радиометрический сигнал сенсора позволяет количественно оценивать показатель pH в клетках в режиме реального времени.

2. С помощью нового индикатора зарегистрированы колебания значения внутриклеточного pH в электрически активной диссоциированной первичной культуре гиппокампальных нейронов, а также в нейронах переживающих срезов мозга мыши. Наблюдаемые изменения pH имеют метаболическую природу. Фаза закисления совпадает с возникновением потенциала действия и отражает временное повышение метаболизма, сопряженное с нейрональной активностью.

3. С помощью версий индикатора SynHer2, локализованных в синапсах нейронов, проведена количественная оценка изменений pH в пре- и постсинаптических окончаниях нейронов. Обнаруженные различия в динамике и амплитуде изменений pH в этих компартментах свидетельствуют о высокой степени локализации метаболических процессов в нейронах.

4. Получена рекомбинантная система генерации и детекции пероксида водорода в клетках млекопитающих, основанная на оксидазе D-аминокислот дрожжей, сопряженной с генетически кодируемым сенсором HyPer. Система эффективно продуцирует пероксид водорода в цитоплазме клеток в ответ на добавление D-аланина. Визуализация активности оксидазы осуществляется по изменению сигнала сенсора HyPer.

5. Оксидаза D-аминокислот, локализованная в пресинаптических окончаниях нейронов, позволяет локально повышать уровень пероксида водорода в аксонах, не затрагивая дендриты и тело клетки. При этом диффузии пероксида водорода из аксона в другие компартменты нейрона не происходит, что свидетельствует о высокой активности антиоксидантных систем в нейроне.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

Статьи

1. Mishina N., Markvicheva K., Bilan D., **Matlashov M.**, Liebl D., Schultz C., Lukyanov S., Belousov V. Visualization of intracellular hydrogen peroxide with HyPer, a genetically encoded fluorescent probe. **Methods in Enzymology**. 2013; 526:45-59.
2. Bilan DS, **Matlashov ME**, Gorokhovatsky AY, Schultz C, Enikolopov G, Belousov VV. Genetically encoded fluorescent indicator for imaging NAD(+)/NADH ratio changes in different cellular compartments. **Biochimica et Biophysica Acta**. 2014; 1840(3): 951-7.
3. **Matlashov ME**, Belousov VV, Enikolopov G. How Much H₂O₂ Is Produced by Recombinant D-Amino Acid Oxidase in Mammalian Cells? **Antioxidants and Redox Signaling**. 2014; 20(7): 1039-44.

Тезисы докладов на конференциях

1. **Матлашов М.** "Использования генетически кодируемых флуоресцентных биосенсоров для регистрации синаптической активности в первичной культуре нейронов. " Международный молодежный научный форум "Ломоносов-2013".
2. **Matlashov M**, Enikolopov G., Belousov V. "H₂O₂ producing/reporter system, based on D-amino acid oxidase - HyPer fusion.", FEBS congress 2013 "Mechanisms in biology", 2013, St. Petersburg, Russia.