

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

На правах рукописи

Билан Дмитрий Сергеевич

**Генетически кодируемые флуоресцентные сенсоры
окислительно-восстановительных процессов
в живых системах**

специальность – 03.01.03 – молекулярная биология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание учёной степени

кандидата биологических наук

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 РАН (ИБХ РАН).

Научный руководитель:

Белоусов Всеволод Вадимович, доктор биологических наук.

Официальные оппоненты:

Черняк Борис Викторович, доктор биологических наук, заведующий Лабораторией биоэнергетики клетки Научно-исследовательского института физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского, Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова.

Воротников Александр Вячеславович, кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник Лаборатории молекулярной эндокринологии Института экспериментальной кардиологии, Российский кардиологический научно-производственный комплекс Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биохимии им. А.Н. Баха РАН.

Защита состоится « 28 » мая 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. Окислительно-восстановительные процессы играют ключевую роль в клетках любых организмов. Широкий спектр биохимических реакций зависит от тонкой регуляции окислительно-восстановительных систем клетки. Исследования последних десятилетий показали, что многочисленные окислительно-восстановительные преобразования внутри клеток в ответ на разные стимулы формируют очень сложную сеть взаимодействующих компонентов и требуют их подробного изучения. Некоторые соединения, представленные в клетке параллельно в окисленном и восстановленном состояниях, формируют универсальные сопряженные окислительно-восстановительные или, так называемые, активные редокс пары, например, НАД⁺/НАДН, НАДФ⁺/НАДФН и окисленный/восстановленный глутатион (GSSG/GSH).

Для аэробных организмов кислород занимает важнейшее место в регуляции жизненно необходимых внутриклеточных процессов, в том числе и окислительно-восстановительных. В настоящий момент известны сигнальные функции кислорода, которые осуществляются через его активные формы (АФК). АФК образуются в ходе протекания многих биохимических процессов как спонтанно, так и целенаправленно при нормальном физиологическом состоянии клеток. Особое внимание уделяют пероксиду водорода, H₂O₂, который активирует клеточные сигнальные каскады и выступает в качестве вторичного мессенджера.

Но до недавнего времени изучение окислительно-восстановительных процессов в живых системах в режиме реального времени было невозможным, поскольку отсутствовали подходящие методы. Для регистрации АФК существуют различные синтетические красители. Но многие среди них, как правило, не являются специфичными, а их реакции необратимы. Что касается изучения в живых клетках активных редокс пар, то до недавнего времени вообще не существовало подходящих методов. Многие проблемы были решены благодаря созданию генетически кодируемых биосенсоров на основе флуоресцентных белков.

Одно из направлений настоящей работы посвящено оптимизации свойств уже существующего и в настоящий момент широко применяемого во всем мире биосенсора на пероксид водорода НуPer. Другая важная часть работы направлена на создание абсолютно нового биосенсора, который позволит регистрировать динамику изменения такого важного параметра, как соотношение НАД⁺/НАДН в живых клетках и их компартментах.

Цель работы. Цель настоящей работы заключалась в усовершенствовании генетически кодируемого флуоресцентного биосенсора для пероксида водорода HyPer, а также создание флуоресцентного генетически кодируемого сенсора на основе бактериального белка T-Rex (*Thermus thermophilus*) и пермутированного желтого флуоресцентного белка cpYFP для исследования динамики изменения соотношения НАД⁺/НАДН в живых системах. Для выполнения сформулированной цели были поставлены и реализованы следующие задачи:

1. Методом направленного мутагенеза создать и провести отбор усовершенствованной версии HyPer.
2. Охарактеризовать усовершенствованную версию HyPer в условиях *in vitro* и *in vivo*.
3. Оценить возможность использования биосенсора HyPer и его усовершенствованной версии в режиме детекции времени жизни флуоресценции.
4. Создать генетически кодируемый флуоресцентный сенсор для регистрации соотношения НАД⁺/НАДН на основе бактериального белка T-Rex и интегрированного в его последовательность пермутированного желтого флуоресцентного белка cpYFP.
5. Охарактеризовать полученный сенсор для регистрации соотношения НАД⁺/НАДН в системе *in vitro* и в условиях живой клетки на уровне отдельных компартментов.

Научная новизна и практическая ценность работы. В настоящей работе был усовершенствован генетически кодируемый флуоресцентный сенсор для регистрации пероксида водорода HyPer путем введения в его структуру мутации H34Y. Полученный вариант биосенсора, HyPer-3, обладает рядом преимуществ перед HyPer и созданным ранее улучшенным вариантом HyPer-2. В частности, HyPer-3 обладает сравнимым с HyPer-2 динамическим диапазоном ответа, но при этом его скорости окисления и последующего восстановления существенно выше, что делает HyPer-3 более предпочтительным инструментом для регистрации быстрых колебаний H₂O₂ в живых системах.

Тестирование HyPer-3 в системе *in vivo* на модели раны хвостового плавника *Danio rerio* продемонстрировало, что предпочтительнее использовать именно HyPer-3 с его более контрастным ответом по сравнению с HyPer.

Впервые, на примере биосенсоров HyPer и HyPer-3 было показано, что время жизни флуоресценции может зависеть от изменения окружения хромофора в одно-флуорофорных сенсорах. Оба сенсора были успешно применены для регистрации H_2O_2 *in vivo* с использованием микроскопии в режиме FLIM.

На основе бактериального белка T-Rex из *Thermus aquaticus* и интегрированного в его последовательность пермутированного желтого флуоресцентного белка cpYFP был создан биосенсор RexYFP для регистрации динамики изменения соотношения $НАД^+/НАДН$ в живых системах, а также был разработан подход, позволяющий устранять влияние колебаний рН на сигнал сенсора.

RexYFP был охарактеризован в системе *in vitro* и протестирован в клетках эукариот. RexYFP на данный момент является единственным биосенсором, с помощью которого можно регистрировать динамику изменения соотношения $НАД^+/НАДН$ как в цитоплазме, так и в митохондриях клеток.

Главными результатами работы являются улучшение созданного ранее и ныне широкого известного биосенсора HyPer, а также создание абсолютно нового биосенсора RexYFP – единственного в своем роде, позволяющего регистрировать соотношение $НАД^+/НАДН$ в разных компартментах клетки.

Структура диссертации. Диссертационная работа изложена на 127 страницах и состоит из введения, обзора литературы, экспериментальной части, результатов и их обсуждения, выводов, заключения, списка сокращений и списка литературы, включающего 304 ссылки. Диссертация содержит 35 рисунков.

Апробация работы. Основные результаты диссертации были доложены на X чтениях, посвященных памяти академика Ю.А. Овчинникова, 2011, Москва, Россия; «Mechanisms in Biology» 38th FEBS Congress, 2013, Санкт-Петербург, Россия; «Seeing is Believing – Imaging the Processes of Life» EMBO/EMBL Symposia, 2013, Гейдельберг, Германия.

Публикации. По материалам работы опубликовано 4 статьи в рецензируемых журналах, 2 патента РФ.

Содержание работы

1. Усовершенствование генетически кодируемого биосенсора *HuPer*, созданного для регистрации пероксида водорода

В 2006 году в ИБХ РАН Белоусовым В. В. впервые был создан генетически кодируемый флуоресцентный сенсор *HuPer* для регистрации H_2O_2 , что послужило мощным стимулом для изучения роли этой молекулы в живой материи, а также создании других инструментов, основанных на принципе работы *HuPer*.

Биосенсор *HuPer* широко применяется в различных исследованиях, связанных с изучением роли молекулы H_2O_2 в живых системах. С помощью *HuPer* можно эффективно исследовать роль H_2O_2 в процессах клеточного апоптоза, ответа клетки на стимуляцию факторами роста, биосенсор позволяет визуализировать колебания концентрации H_2O_2 в цитоплазме, митохондриях и других компартментах при различных физиологических и патологических процессах.

Конструкция *HuPer* основана на чувствительном к H_2O_2 домене бактериального белка *E. coli* OxyR и связанного с ним пермутированного желтого флуоресцентного белка *cpYFP*. OxyR специфично окисляется H_2O_2 и претерпевает конформационные изменения за счет образования дисульфидной связи между цистеиновыми остатками Cys-199 и Cys-208. В результате этих внутримолекулярных перестроек происходит изменение спектра возбуждения флуоресценции белка. Для *HuPer* характерно наличие двух пиков возбуждения флуоресценции с максимумами на 420 нм и 500 нм, и один пик эмиссии с максимумом на 516 нм. В присутствии H_2O_2 для биосенсора наблюдается пропорциональное увеличение интенсивности возбуждения при 500 нм и уменьшение при 420 нм. Таким образом, изменяется и соотношение интенсивностей флуоресценции (F_{500}/F_{420}), возбуждаемых отдельно длинами волн 420 нм и 500 нм.

Реакция *HuPer* является обратимой и специфичной для H_2O_2 . Однако, для многих биологических моделей, в которых концентрация H_2O_2 меняется незначительно, динамический диапазон сенсора является недостаточным. На протяжении последнего времени предпринимались попытки улучшения *HuPer*. Не так давно с помощью метода случайного мутагенеза была создана первая улучшенная версия биосенсора, названная *HuPer-2*. Эта версия демонстрировала больший динамический диапазон ответа на H_2O_2 (максимальное изменение соотношения пиков F_{500}/F_{420} в ответ на окисление) по сравнению с исходным вариантом приблизительно в 2 раза. Как оказалось, ключевую роль в улучшении динамического диапазона *HuPer-2* сыграла единственная замена Ala в положении 406 на Val. Замена в *HuPer-2*

соответствует известной по литературным данным мутации A233V в OxyR дикого типа в области, ответственной за димеризацию молекулы. Однако при улучшенном динамическом диапазоне HyPer-2 все же потерял некоторые из своих положительных свойств. HyPer-2 формирует прочные димеры, что было показано с помощью метода гель-фильтрации, в отличие от мономерного HyPer. Кроме того, HyPer-2 демонстрирует сравнительно медленную, по сравнению с HyPer, кинетику реакций окисления и восстановления, что может сказываться на временном разрешении детектирования H₂O₂.

1.1. HyPer-3 – версия биосенсора, сочетающая в себе полезные качества HyPer и HyPer-2

Мы попытались создать версию HyPer с улучшенным динамическим диапазоном, не изменяя при этом других полезных свойств биосенсора. Точечная мутация A233V в структуре OxyR каким-то образом привела к изменению динамического диапазона HyPer. Не исключено, что интерфейс, ответственный за формирования димера, может отличаться для OxyR дикого типа и в составе химерной конструкции HyPer. Мы предположили, что и другие мутации в этой же области могут привести к появлению биосенсора с улучшенными характеристиками.

Мы протестировали несколько вариантов HyPer с точечными мутациями в той же области, что и A233V для HyPer-2. Опираясь на результат HyPer-2, мы не могли предположить, как именно и какие мутации изменят свойства биосенсора. Поэтому мы протестировали мутации I110D, L124D, H114Y и F219A белка OxyR, которые ранее были охарактеризованы для белка дикого типа как фенотипические, то есть влияющие на активность wtOxyR. Все эти мутации в большей или меньшей степени влияют на димерное состояние OxyR.

Проекспрессировав полученные версии HyPer с мутациями I110D, L124D, H114Y и F219A в эукариотических клетках HeLa Kyoto, мы определили их сигнал (F500/F420) в ответ на добавление в среду 150 мкМ H₂O₂. Мутации I110D, L124D и F219A в составе биосенсора привели к сильному уменьшению его динамического диапазона по сравнению с изначальным вариантом HyPer. Более успешной оказалась версия с введенной мутацией H114Y, сигнал HyPer в этом случае стал сравним с сигналом HyPer-2 по динамическому диапазону (Рис. 1).

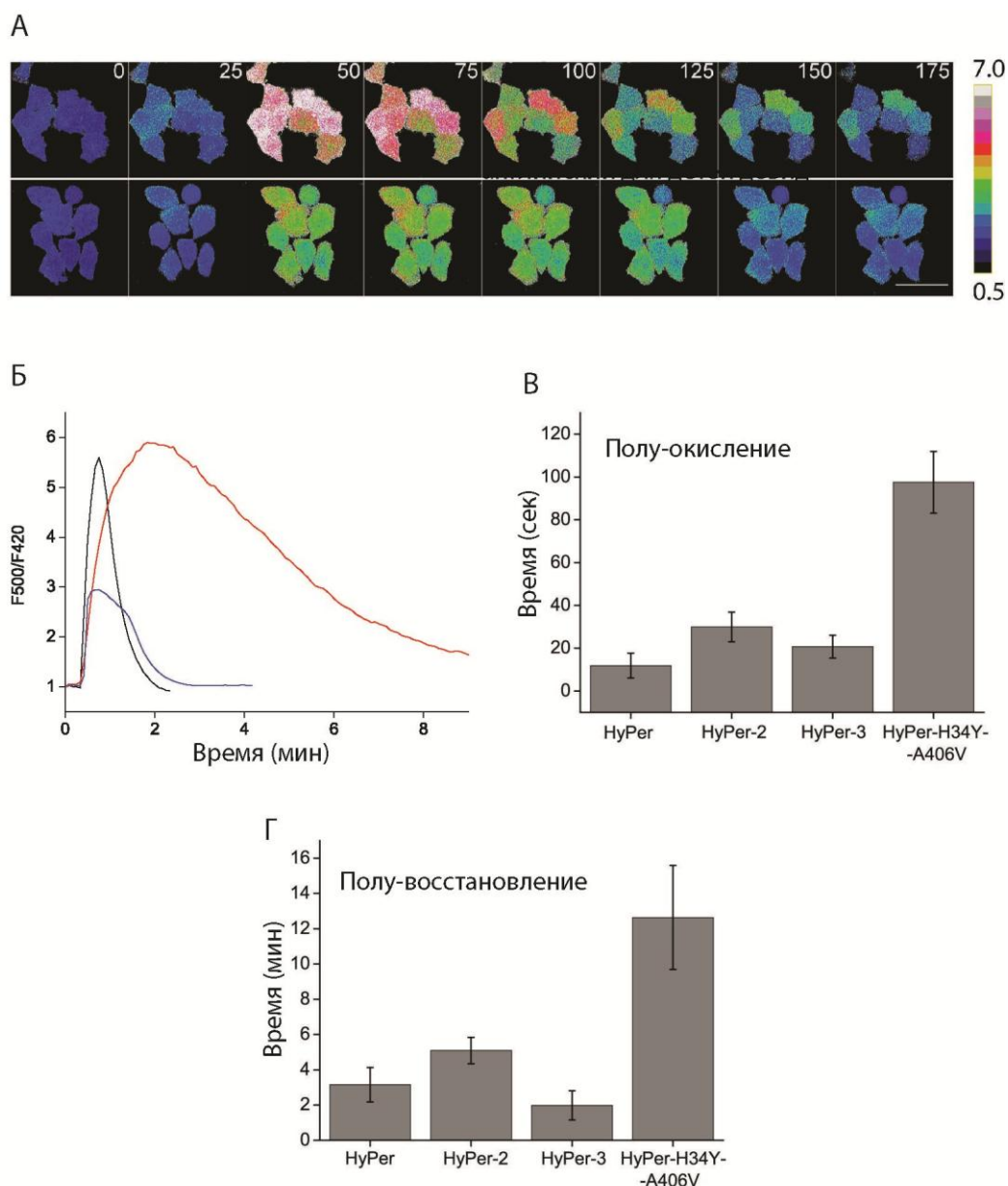


Рисунок 1. Сравнение свойств биосенсора HyPer-3 с HyPer и HyPer-2

А) Изменение соотношения $F500/F420$ в клетках HeLa Kyoto, экспрессирующих HyPer-3 (верхний ряд) и HyPer (нижний ряд) при добавлении 150 мкМ H_2O_2 . Числа обозначают время в секундах. Шкала 40 мкм. Клетки окрашены в псевдоцвета, соответствующие значениям соотношения $F500/F420$ (черный цвет соответствует минимальному значению, белый – максимальному). **Б)** Динамика изменения соотношения $F500/F420$ в клетках HeLa Kyoto, экспрессирующих HyPer (синяя линия), HyPer-2 (красная линия) и HyPer-3 (черная линия) при добавлении 150 мкМ H_2O_2 . **В)** Полупериод окисления HyPer, HyPer-2, HyPer-3 и HyPer-H34Y-A406V. Точка времени 0 секунд соответствует моменту добавления H_2O_2 . **Г)** Полупериод восстановления HyPer, HyPer-2, HyPer-3 и HyPer-H34Y-A406V. Точка времени 0 минут соответствует максимальному значению соотношения $F500/F420$, достигнутому после добавления H_2O_2 . На диаграммах **В** и **Г** показаны средние значения (построены по результатам 7 независимых экспериментов для HyPer, 10 для HyPer-2, 10 для HyPer-3, 4 для HyPer-H34Y-A406V) и стандартное отклонение.

Более того, для HyPer-N114Y характерны более высокие скорости окисления и восстановления по сравнению с HyPer-2. Мы измерили полупериоды окисления и восстановления для HyPer, HyPer-2 и HyPer-N114Y. Полупериод окисления HyPer-N114Y приблизительно в 1,4 раза меньше, чем для HyPer-2. Полупериод восстановления HyPer-N114Y сопоставим с восстановлением HyPer и значительно короче по сравнению с HyPer-2 (Рис. 1 В,Г). Новый полученный вариант биосенсора с мутацией N114Y, отличающийся высоким динамическим диапазоном и быстрым ответом, мы назвали HyPer-3. Мутация N114Y в OxyR дикого типа соответствует позиции N34Y в HyPer.

1.2. Сравнение аффинности и скорости реакции полученного HyPer-3 с HyPer и HyPer-2

Разница полупериодов окисления HyPer, HyPer-2 и HyPer-3 может быть связана с разной аффинностью этих биосенсоров к своему субстрату, что может быть вызвано мутациями. С другой стороны, это может быть связано с тем, что скорость реакции исследуемых биосенсоров с H₂O₂ отличается.

Поскольку нам не удалось выделить белковый препарат HyPer в полностью восстановленном состоянии, измерение кинетики реакции мы провели в эукариотических клетках для каждого вида сенсора. Для этой цели мы использовали м-слайды, в которых мы культивировали клетки и проводили флуоресцентную микроскопию. Преимуществом этих слайдов является небольшой рабочий объем (100 мкл), это позволяет очень быстро заменять клеточную среду при частом режиме съемки микроскопа и измерять скорость реакций псевдопервого порядка. Ранее для HyPer было определено, что выделенный белок реагирует на добавление H₂O₂ от 25 нМ. В клетках *E. coli* и цитоплазме эукариот сигнал сенсора детектируем от 5 мкМ эндогенного H₂O₂. Эти данные согласуются с данными, полученные для OxyR дикого типа. Это позволило нам определить наличие приблизительно 200-500-кратного градиента H₂O₂ через цитоплазматическую мембрану. С учетом этого мы установили, что концентрации H₂O₂, при которых скорость реакции между сенсором и H₂O₂ равна половине от максимальной, составляют 160 нМ для HyPer, 290 нМ для HyPer-2, 260 нМ для HyPer-3. Константы скорости реакции псевдопервого порядка (K_s) равны 5·10⁵ М⁻¹ сек⁻¹ для HyPer, 1,2·10⁵ М⁻¹ сек⁻¹ для HyPer-2 и 2,5·10⁵ М⁻¹ сек⁻¹ для HyPer-3. Среди всех вариантов HyPer именно для HyPer-2 характерна самая низкая скорость реакции, что объясняет его более медленный ответ на H₂O₂. В то время как HyPer-3 занимает промежуточное положение между HyPer и HyPer-2 по скорости реакции с H₂O₂ и

полупериоду окисления. Вероятнее всего, что разные полупериоды восстановления биосенсоров также связаны с отличиями в скоростях реакций окисленных NyPer, NyPer-2 и NyPer-3 с клеточными тиол-восстанавливающими компонентами клетки.

1.3. Сравнение спектральных характеристик NyPer-3 с NyPer и NyPer-2

Мы сравнили яркость всех имеющихся вариантов NyPer на выделенных препаратах. Все измерения мы проводили с окисленной формой белков, чего легко добиться путем добавления H_2O_2 к пробе. Квантовый выход для NyPer, NyPer-2 и NyPer-3 имеет одинаковое значение и составляет 0,1. При этом значения коэффициентов экстинкции отличаются. Коэффициенты экстинкции при 490 нм составляют $17000 M^{-1} cm^{-1}$ для NyPer, $25000 M^{-1} cm^{-1}$ для NyPer-2 и $17000 M^{-1} cm^{-1}$ для NyPer-3. Учитывая значение квантового выхода, яркость для NyPer равна $1700 M^{-1} cm^{-1}$, для NyPer-2 – $2500 M^{-1} cm^{-1}$, для NyPer-3 – $1700 M^{-1} cm^{-1}$, что составляет 5-7 % от яркости EGFP.

1.4. Сравнение олигомерного состояния NyPer-3 с NyPer и NyPer-2

Мутация Н34У в составе NyPer-3 находится в той же области белка ОхуR, что и мутация А406V в NyPer-2. Эта область отвечает за димеризацию белка ОхуR дикого типа. В то время как NyPer преимущественно находится в мономерном состоянии, мутация А406V в ОхуR-части NyPer-2 сделала биосенсор строгим димером. Мы определили какой эффект вызывает мутация Н34У, находящаяся в том же интерфейсе. Для этого воспользовались методом гель-фильтрационной хроматографии.

Оказалось, что при низкой концентрации в растворе (0,02 мг/мл) NyPer-3 находится преимущественно в мономерном состоянии, при увеличении концентрации (до 1 мг/мл) образуется смесь димерной и мономерной форм белка (Рис. 2). Таким образом, по своему олигомерному состоянию NyPer-3 ближе к NyPer, а мутации А406V и Н34У оказывают разное влияние на олигомеризацию белка. Это говорит о том, что увеличенный динамический диапазон NyPer-2 и NyPer-3, по всей видимости, не зависит от олигомерного состояния этих белков. Но существует некая корреляция между скоростями реакций окисления/восстановления и олигомерным состоянием этих белков. Мы определили, что самым медленным сенсором является димерный NyPer-2, а самым быстрым – мономерный NyPer. Что же касается NyPer-3, то он как раз занимает среднюю позицию между NyPer и NyPer-2 по всем перечисленным параметрам.

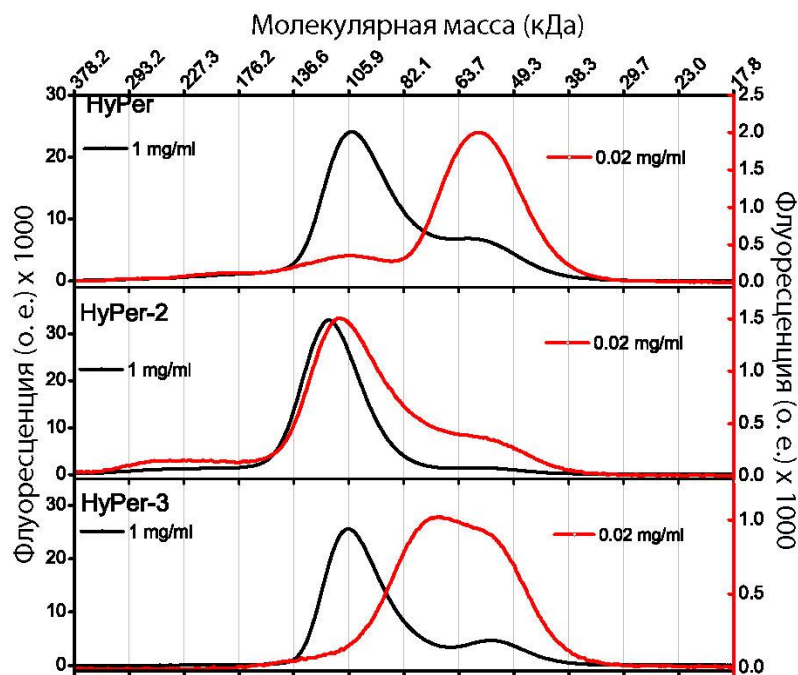


Рисунок 2. Результаты гель-фильтрационной хроматографии для HyPer, HyPer-2 и HyPer-3

Представлены профили элюции для всех трех белков. Красные и черные линии обозначают низкие и высокие концентрации белка в наносимой пробе, соответственно.

1.5. HyPer с объединенными мутациями A406V и H34Y

Мы предположили, что объединение двух мутаций A406V и H34Y в одной конструкции HyPer приведет к появлению варианта с еще более лучшими показателями. Однако созданный HyPer-A406V-H34Y отличался по своим свойствам от всех существующих. Динамический диапазон HyPer с двумя мутациями сравним с HyPer-2 и HyPer-3. Но для HyPer-A406V-H34Y оказались характерными очень длинные полупериоды окисления и восстановления (Рис. 1). Этот вариант HyPer в гораздо меньшей степени пригоден для его использования в регистрации H_2O_2 в режиме реального времени, чем HyPer, HyPer-3 и даже HyPer-2, но может быть рассмотрен в качестве долговременного индикатора, благодаря тому, что длительное время пребывает в окисленном состоянии после стимуляции.

1.6. Тестирование HyPer-3 in vivo: модель раны в *Danio rerio*

Ранее HyPer был успешно применен для визуализации градиента H_2O_2 в тканях zebrafish *Danio rerio* на модели раны хвостового плавника. Градиент концентрации H_2O_2 начинал формироваться через 3 минуты после нанесения раны и достигал своего максимального значения примерно через 20 минут, распространяясь на 100-200 мкм

вглубь эпителия хвостового плавника. Градиент H_2O_2 служит для привлечения нейтрофилов в область воспаления. На этой модели мы протестировали HyPer-3. Для этого в эмбрионы *Danio rerio* на стадии одной клетки мы инъектировали мРНК, кодирующую HyPer-3, после чего наблюдали за флуоресценцией образца в течение последующих трех дней. Эту же самую процедуру мы проделали с HyPer. Несмотря на то, что по яркости выделенные белки HyPer и HyPer-3 не отличаются, по какой-то причине в используемой модели *in vivo* флуоресцентный сигнал HyPer-3 оказался очень слабым.

Для получения оптимального уровня экспрессии и, следовательно, стабильного флуоресцентного сигнала мы, в сотрудничестве с группой Clemens Grabher (Технологический институт Карлсруэ, Германия) создали трансгенную линию zebrafish *Danio rerio*, которая экспрессирует HyPer-3 под контролем промотора β -актина. Таким образом, все клетки полученного трансгенного животного экспрессируют HyPer-3 (Рис. 3). Для экспериментов отбирали трансгенных особей со средним уровнем экспрессии.

Путем ампутации кончика хвостового плавника 3,5-дневных особей мы воспроизводили модель раны, нанесение которой приводило к возникновению градиента концентрации H_2O_2 в хвостовой области (Рис. 3 Б).

Благодаря увеличенному динамическому диапазону HyPer-3 соотношение F500/F420 этого биосенсора изменяется сильнее, чем для HyPer в этой же модели (Рис. 3 Б). Максимальное изменение соотношения F500/F420 составляло $1,72 \pm 0,18$ для HyPer и $2,53 \pm 0,39$ для HyPer-3 (полученные данные усреднены по 10 измерениям для HyPer и 7 измерениям для HyPer-3 в трех независимых экспериментах; приведены средние значения и стандартное отклонение).

Таким образом, HyPer-3 представляет собой еще более лучший индикатор для регистрации H_2O_2 в системе *in vivo*, чем HyPer. Ранее было показано, что изменение сигнала HyPer в описанной модели раны является pH-независимым.

1.7. Использование HyPer-3 и HyPer в FLIM микроскопии

Микроскопия с измерением времени жизни флуоресценции FLIM (fluorescence lifetime imaging microscopy) часто применяется для мониторинга биологических процессов с помощью методов, основанных на взаимодействиях FRET. При изменении эффективности FRET изменяется и время жизни донорного флуорофора, что позволяет осуществлять количественную оценку относительной доли молекул в разных FRET состояниях. При использовании FLIM гораздо меньше помех, связанных с светорассеянием или фотообесцвечиванием, сигнал не зависит от уровня экспрессии и

ему можно дать количественную оценку. Метод FLIM ранее не использовался для сенсоров с одним флуорофором, поскольку считалось, что в отсутствие флуорофора-акцептора (т.е. вне FRET-пары) время жизни флуоресценции сенсора не меняется сколь-нибудь значительно. Известны лишь данные, что время жизни флуоресценции некоторых GFP-подобных белков зависит от изменения величины pH.

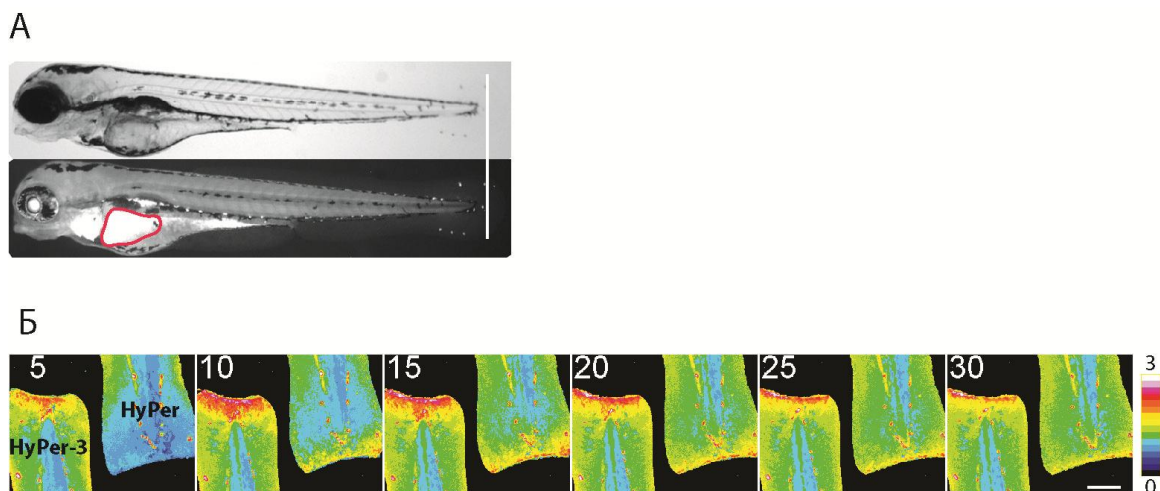


Рисунок 3. Сравнение ответов HyPer-3 и HyPer на H_2O_2 в модели раны для zebrafish *Danio rerio*

А) Фотографии трансгенной рыбы *Danio rerio*, экспрессирующей HyPer-3 под контролем промотора β -актина, на стадии развития 3,5 дней в проходящем свете (верхний снимок) и в режиме регистрации флуоресценции (нижний снимок). Вертикальная белая линия отмечает область нанесения раны. Область сердца, обведенная красной линией, с высокой интенсивностью флуоресценции содержит маркер трансгенеза *cmc2:egfp*. **Б)** Сравнение изменений соотношения F500/F420 в области хвостового плавника *Danio rerio* при нанесении раны отдельно для HyPer-3 (слева) и HyPer (справа). Цветовая гамма соответствует значениям соотношения F500/F420 от нулевого (черный) до максимального (белый). Цифрами отмечено время в минутах от момента нанесения раны. Шкала 100 мкм.

Мы проверили, изменяется ли время жизни флуоресценции HyPer-3 и HyPer при их взаимодействии с H_2O_2 . Для этого провели микроскопию в режиме FLIM клеток HeLa, экспрессирующих HyPer-3 и HyPer, до и после добавления 100 мкМ H_2O_2 . Интенсивность флуоресценции, возбуждаемой при 488 нм, увеличивалась для обеих проб после добавления H_2O_2 , при этом время жизни флуоресценции биосенсоров уменьшалось (Рис. 4).

Для HyPer измеренные по фазе и модуляции времена жизни флуоресценции составили $1,27 \pm 0,04$ нс и $1,73 \pm 0,02$ нс, соответственно (усредненные значения по 20 клеткам в 3 независимых экспериментах). Разница между фазой и модуляцией времени жизни флуоресценции свидетельствует о мультиэкспоненциальном затухании

возбужденного состояния. После добавления H_2O_2 к этим же клеткам измеренные по фазе и модуляции времена жизни флуоресценции для HyPer изменились и составили $1,02 \pm 0,06$ нс и $1,44 \pm 0,13$ нс, соответственно.

В случае HyPer-3 измеренные по фазе и модуляции времена жизни составили $1,29 \pm 0,04$ нс и $1,77 \pm 0,05$ нс, соответственно. При окислении времена жизни флуоресценции HyPer-3 тоже падают до значений $0,92 \pm 0,01$ нс (по фазе) и $1,12 \pm 0,02$ нс (по модуляции) (усредненные значения по 11 клеткам в 3 независимых экспериментах) (рисунок 4 А). Примечательно, что при окислении молекул HyPer возрастала яркость, но при этом понижалось время жизни флуоресценции. Поскольку величина квантового выхода пропорциональна времени жизни флуоресценции, при окислении HyPer-3 происходит падение величины квантового выхода на 25 – 30 %. И в то же время окисление вызывает увеличение интенсивности флуоресценции примерно в 5 раз, что объясняется увеличением коэффициента экстинкции.

Таким образом, HyPer и HyPer-3 могут быть использованы в микроскопии в режиме FLIM, при этом для HyPer-3 характерно более выраженное изменение времени жизни флуоресценции при окислении.

Далее мы проверили возможность использования FLIM с помощью HyPer-3 *in vivo* на уже используемой нами модели раны в zebrafish *Danio rerio*. Используя описанный выше протокол, мы провели FLIM в области раны (рисунок 4 Б, В). Оказалось, что и с помощью FLIM можно регистрировать градиент H_2O_2 , распространяющийся от раны вглубь эпителия хвостового плавника zebrafish, поскольку время жизни флуоресценции окисленного и восстановленного HyPer-3 отличается.

Таким образом, нами был получен усовершенствованный вариант HyPer-3, который отличается от HyPer расширенным динамическим диапазоном, а от HyPer-2 более быстрыми реакциями окисления и последующего восстановления в живых клетках, а также мономерным состоянием. Мы также продемонстрировали преимущества использования HyPer-3 в системе *in vivo* и в микроскопии в режиме FLIM.

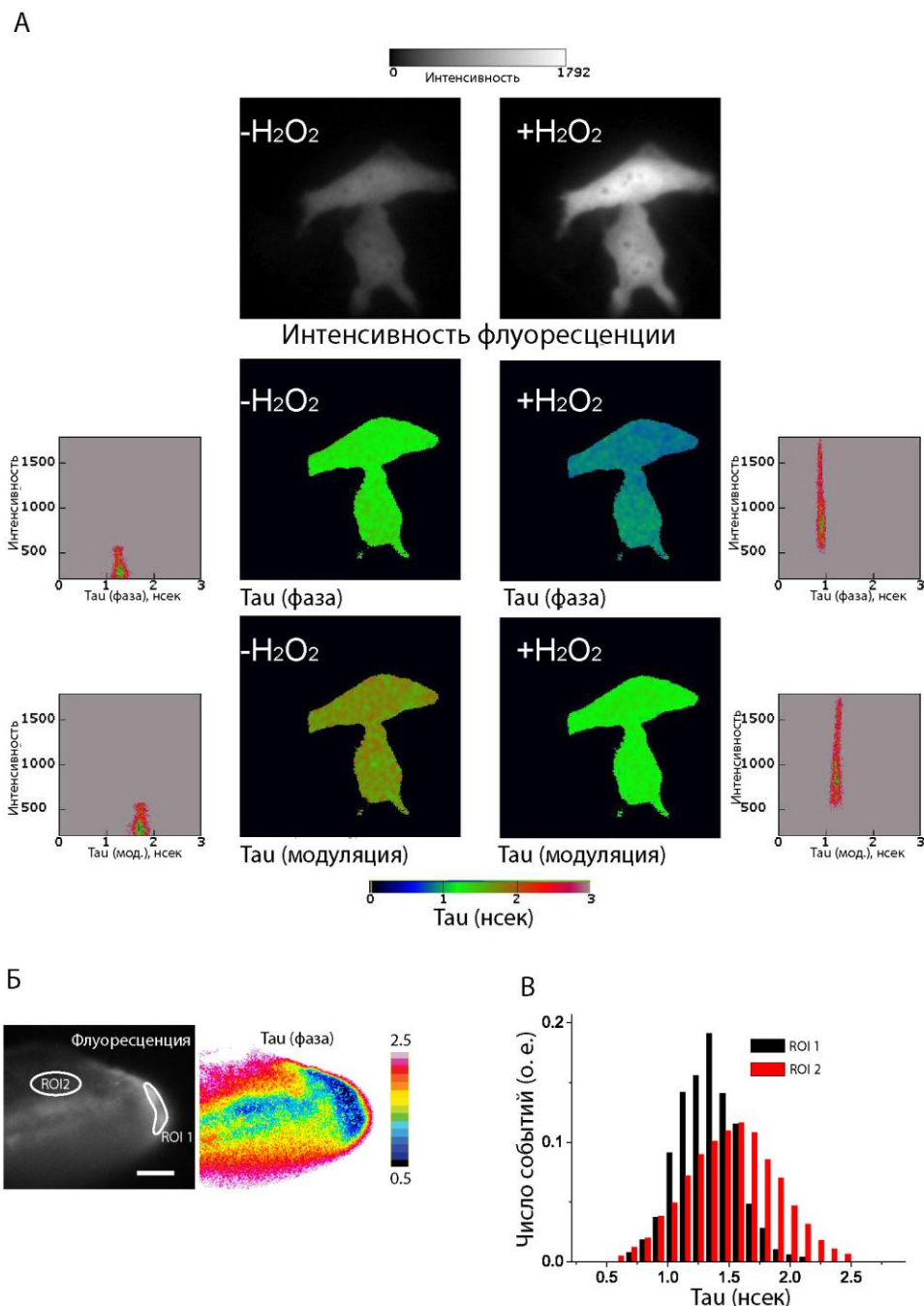


Рисунок 4. Регистрация времени жизни флуоресценции HyPer-3

А) FLIM HyPer-3 при добавлении H_2O_2 . Слева изображены клетки HeLa, экспрессирующие HyPer-3, до добавления H_2O_2 . Справа те же клетки, но уже через минуту после добавления 100 мкМ H_2O_2 . Сверху вниз изображены: средняя интенсивность флуоресценции, увеличивающаяся после добавления H_2O_2 ; время жизни флуоресценции, измеренное по фазе, с соответствующими графиками распределения интенсивности флуоресценции и времени жизни флуоресценции; время жизни флуоресценции, измеренное по модуляции, с соответствующими графиками распределения интенсивности флуоресценции и времени жизни флуоресценции. **Б)** Регистрация H_2O_2 в модели раны хвостового плавника zebrafish *Danio rerio* с использованием FLIM HyPer-3. Слева представлен снимок, отражающий интенсивность флуоресценции; справа – изображение FLIM. ROI1 соответствует области раны; ROI2 соответствует области, расположенной далеко от нее. **В)** График распределения времени жизни флуоресценции в областях ROI1 и ROI2.

2. Создание генетически кодируемого флуоресцентного биосенсора для регистрации соотношения НАД⁺/НАДН

До недавнего времени методов, позволяющих регистрировать динамику изменения соотношения НАД⁺/НАДН в живых системах, не существовало. С помощью УФ и двух-фотонной микроскопии можно было детектировать лишь флуоресцирующий НАДН, но более важным клеточным показателем является именно соотношение окисленной и восстановленной форм данного кофактора. От клеточного соотношения НАД⁺/НАДН зависит протекание многих важнейших биохимических реакций, а сам параметр отражает общее окислительно-восстановительное состояние клетки. Однако недостаток методов долгое время затруднял исследование этого важного клеточного показателя в живых системах.

Мы разработали метод, который позволяет регистрировать в режиме реального времени динамику изменения соотношения НАД⁺/НАДН в живых системах на уровне не только единичных клеток, но и на уровне отдельных внутриклеточных компартментов, в том числе митохондрий. Полученный биосенсор для регистрации соотношения НАД⁺/НАДН, который мы назвали впоследствии RexYFP, основан на бактериальном белке T-Rex (из *Thermus aquaticus*) и пермутированного желтого флуоресцентного белка cpYFP.

2.1. Конструкция и спектральные характеристики RexYFP

В качестве основы разрабатываемого нами биосенсора для регистрации динамики изменения соотношения НАД⁺/НАДН мы выбрали белок T-Rex из *Thermus aquaticus*, который в этих бактериях выступает в качестве природного сенсора для регистрации данного клеточного параметра. В клетках для белка T-Rex характерны два конформационных состояния, взаимные переходы которых зависят от показателя соотношения НАД⁺/НАДН. В аэрированных условиях белок находится в НАД⁺-связывающем состоянии, при этом он образует прочный комплекс с определенными последовательностями ДНК, выступая в качестве репрессора некоторых бактериальных генов. В аэробных условиях значение соотношения НАД⁺/НАДН в клетке снижается, T-Rex сразу связывает НАДН, поскольку именно к восстановленной форме кофактора этот белок имеет наибольшее сродство. При этом структура T-Rex претерпевает конформационные изменения и переходит в более компактную, которая уже не связывает ДНК.

Для создания биосенсора на основе T-Rex мы решили попробовать визуализировать реакцию бактериального белка на изменение соотношения

НАД⁺/НАДН. Для этого мы выбрали несколько позиций в структуре T-Rex и на уровне гена вставили последовательность cpYFP, создав, таким образом, несколько вариантов химерной конструкции T-Rex-cpYFP. На первом этапе создания биосенсора было необходимо отобрать такую конструкцию химерного белка, в которой конформационные изменения T-Rex передавались бы и на флуоресцентный белок, вызывая при этом изменения в его спектре. Важно, чтобы в химерном белке T-Rex по-прежнему обладал способностью к регистрации соотношения НАД⁺/НАДН, а cpYFP не утрачивал флуоресцентных свойств. Всего было проанализировано 11 вариантов T-Rex-cpYFP, отличающихся положением cpYFP в структуре T-Rex. Во всех позициях cpYFP был интегрирован в структуру T-Rex через короткие пептидные линкеры SAG и GT, ранее пермутант cpYFP с подобными линкерами уже был использован для создания биосенсора HyPer.

Все версии полученного химерного белка мы проэкспрессировали в клетках *E. coli* штамма XL 1 Blue, чтобы из всех созданных конструкций отобрать флуоресцентные. Оказалось, что в составе большинства версий химерного белка cpYFP либо полностью утратил, либо значительно снизил свою способность к флуоресценции. Лишь конструкции, в которых cpYFP был интегрирован в структуру T-Rex по позициям 79-80, 99-100 и 116-117, были флуоресцирующими. При этом по интенсивности флуоресценции в большей степени среди всех выделялся химерный белок T-Rex-79-80-cpYFP. Его полную генетическую конструкцию мы подвергли случайному мутагенезу в целях улучшения свойств белка. И действительно, из полученной библиотеки нам удалось найти клон, который отличался более быстрым созреванием хромофора и еще большей интенсивностью флуоресценции по сравнению с исходным вариантом. После секвенирования последовательности отобранной конструкции мы установили, что на улучшение характеристик белка повлияли появившиеся мутации L169P, Y175N и D313G, все расположенные в последовательности cpYFP. Именно этот химерный белок T-Rex-79-80-cpYFP(L169P-Y175N-D313G) позже и стал биосенсором для регистрации соотношения НАД⁺/НАДН, который мы будем далее называть RexYFP (Рис. 5). Были получены и другие пробные версии биосенсора, но все они в итоге уступили конечному варианту на разных этапах исследования.

Белок RexYFP был выделен. Спектр возбуждения флуоресценции представлен одним пиком с максимумом на 490 нм, для спектра эмиссии характерен пик с максимумом интенсивности на 516 нм (Рис. 5 Б).

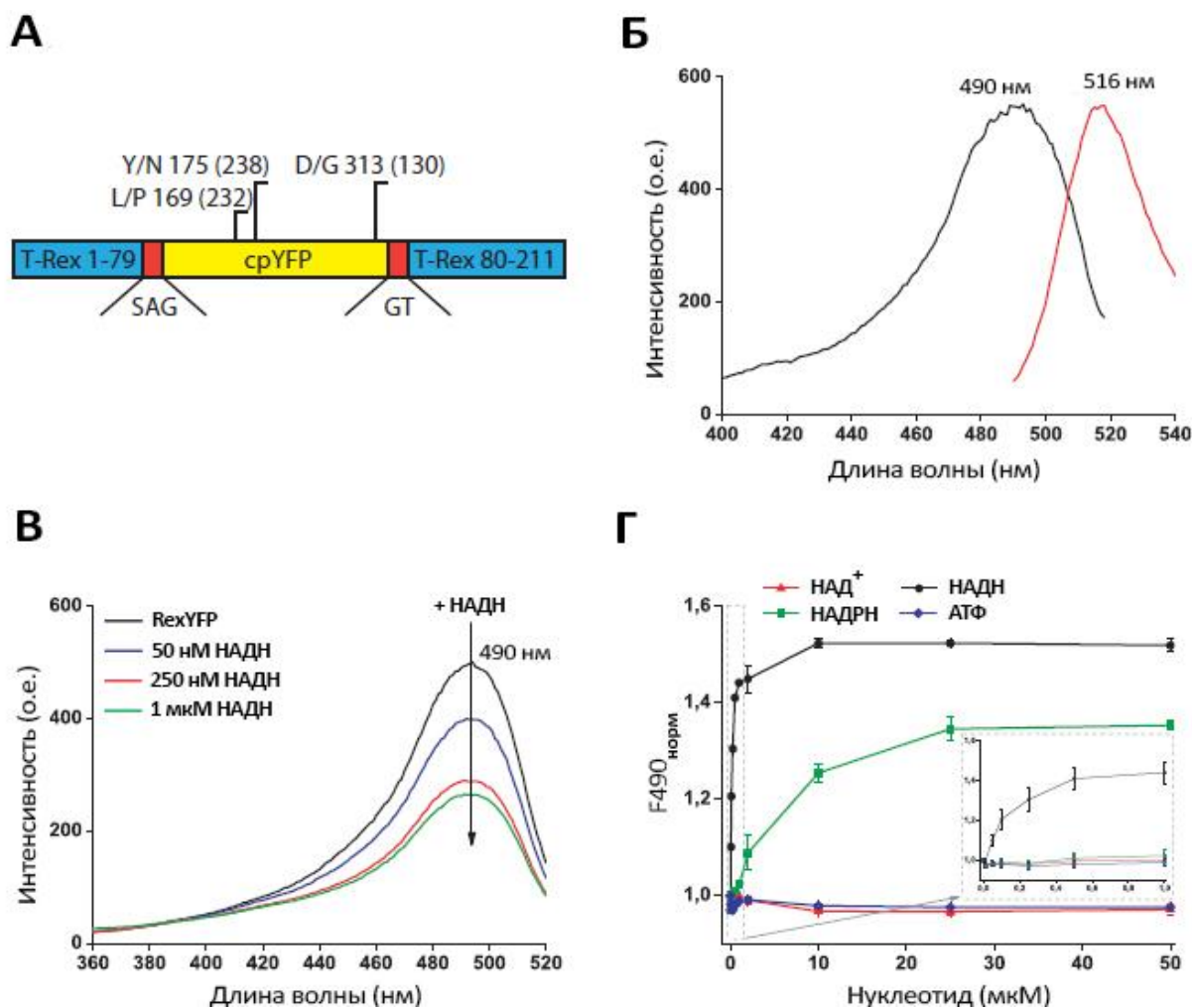


Рисунок 5. Структура и спектральные характеристики RexYFP

А) Схема структуры RexYFP. Биосенсор состоит из cpYFP (изображен желтым), который интегрирован в структуру T-Rex (изображен синим) в позицию между 79 и 80 аминокислотными остатками через короткие пептидные линкеры SAG и GT (изображены красным). На схеме отмечены мутации, присутствующие в структуре RexYFP (номера в скобках соответствуют позициям EYFP). **Б)** Спектр флуоресценции RexYFP. Спектр возбуждения флуоресценции (черная кривая) имеет выраженный пик с максимумом при 490 нм, максимум эмиссии составляет при 516 нм (красная линия). **В)** Изменение спектра возбуждения флуоресценции RexYFP (250 нМ в пробе) при увеличении концентрации НАДН в той же самой пробе (до 50 нМ, 250 нМ и 1 мкМ). **Г)** Зависимость сигнала RexYFP ($F_{490_{\text{норм}}} = 1/F_{490}$, приведено к 1) от концентрации нуклеотидов НАД⁺ (красная кривая), НАДН (черная кривая), НАДФН (зеленая кривая), АТФ (синяя кривая) в диапазоне концентраций от 10 нМ до 50 мкМ. Усредненные кривые построены по результатам пяти независимых экспериментов.

2.2. Определение чувствительности RexYFP

При выделении белок T-Rex частично находится в НАДН-связанном состоянии из-за его высокого сродства именно к восстановленной форме кофактора. Для устранения связанного клеточного НАДН мы перед каждым экспериментом

пересадили белок с помощью сульфата аммония в кислых условиях, после чего вновь растворяли. Качество очистки оценивали по спектрам поглощения пробы, поскольку НАДН поглощает при 340 нм.

Далее к пробе очищенного белка (250 нМ) добавляли НАДН и регистрировали спектры возбуждения флуоресценции. Даже добавление небольшого количества НАДН к пробе приводило к уменьшению интенсивности пика (Рис. 5 В). В дальнейшем мы определяли сигнал биосенсора RexYFP, как обратную величину значения интенсивности флуоресценции, возбуждаемой при 490 нм (1/F490). При таком подходе увеличение концентрации НАДН в системе приводит к увеличению сигнала биосенсора.

Известно, что все нуклеотид связывающие домены белков могут отличаться по своей чувствительности к разным нуклеотидам. Мы проверили сродство RexYFP к основным клеточным нуклеотидам: к НАД⁺, НАДН, НАДФН и АТФ в диапазоне концентраций от 10 нМ до 50 мкМ при концентрации белка в пробе 250 нМ (Рис. 5 Г).

Было показано, что АТФ и НАД⁺ не вызывают изменений флуоресценции RexYFP даже при больших концентрациях. Сигнал изменяется в присутствии НАДН и НАДФН, но значения константы сродства (K') для этих нуклеотидов разные. Для НАДН это значение составляет 180 нМ, а для НАДФН – 6,2 мкМ. При этом следует помнить, что внутриклеточная концентрация НАДФ ниже, чем НАД (в клетках печени крысы примерно в 10 раз), но при нормальных физиологических условиях общий пул НАДФ в клетке более восстановлен, в отличие от пула НАД. Мы не исключаем вероятности того, что при некоторых условиях НАДФН все же может влиять на сигнал RexYFP.

При нормальных физиологических условиях в цитоплазме клеток млекопитающих соотношение между свободными НАД⁺ и НАДН может варьировать от 1 до 700. Это означает, что окисленная форма кофактора всегда присутствует в клетке в большей концентрации, чем восстановленная. Для того чтобы проверить как будет изменяться сигнал биосенсора при увеличении НАДН в пробе на фоне уже имеющегося избытка НАД⁺, мы использовали сопряженную ферментативную систему (Рис. 6 А). В системе участвует гексокиназа, которая катализирует реакцию превращения глюкозы в глюкозо-6-фосфат. Во второй реакции сопряженной системы дегидрогеназа превращает глюкозо-6-фосфат в 6-фосфоглюконат и переносит восстановительные эквиваленты на НАД⁺. Таким образом, при функционировании данной системы происходит постепенное увеличение концентрации НАДН в пробе до тех пор, пока не расходуется НАД⁺.

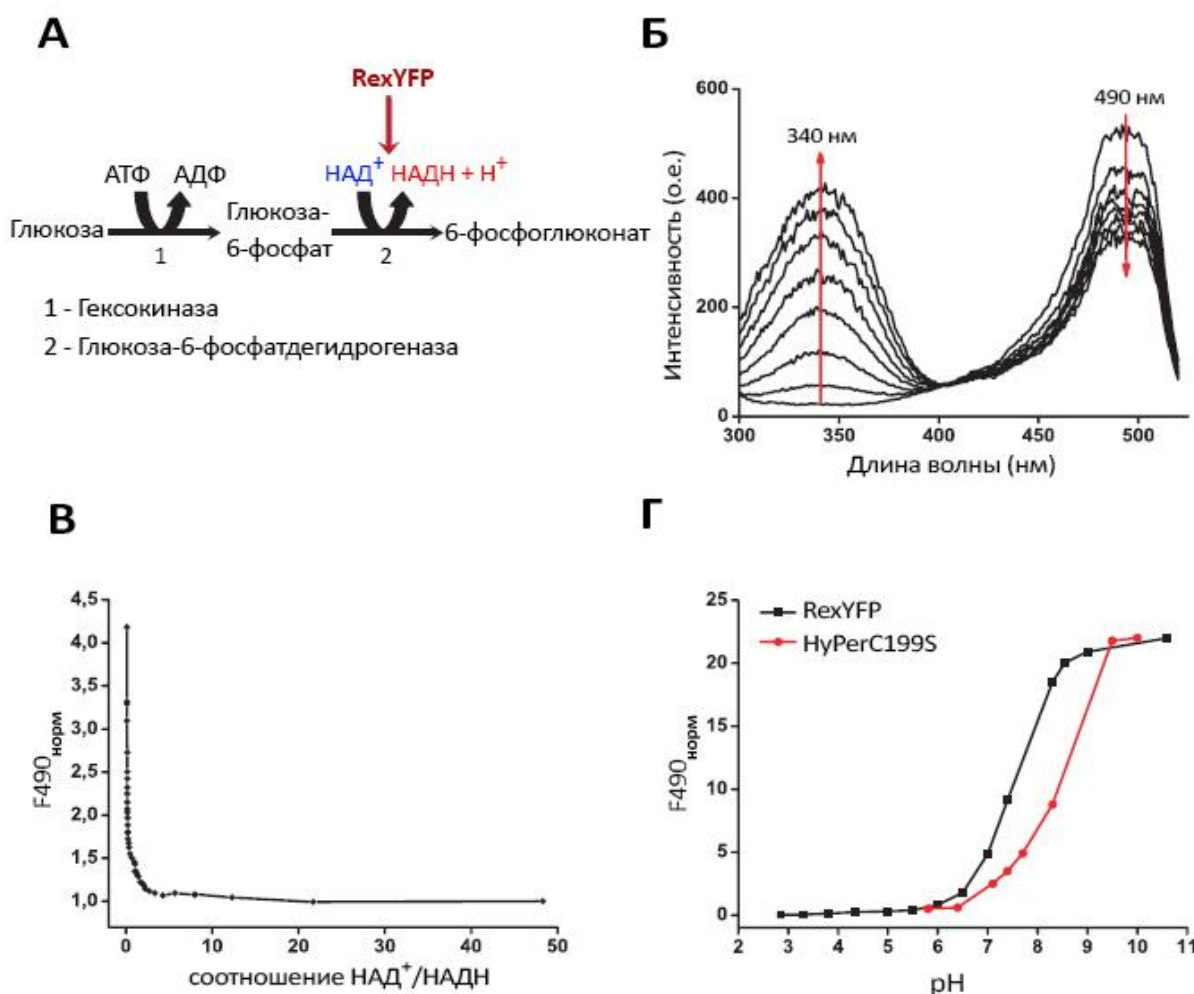


Рисунок 6. Зависимость сигнал RexYFP от соотношения $\text{НАД}^+/\text{НАДН}$ и величины pH

А) Схема сопряженной ферментативной системы для определения зависимости сигнала RexYFP от значений соотношения $\text{НАД}^+/\text{НАДН}$. **Б)** Изменение спектра возбуждения флуоресценции пробы, содержащей RexYFP и все компоненты работающей сопряженной системы. Временной интервал между спектрами составляет 30 секунд. **В)** Зависимость сигнала RexYFP ($F_{490 \text{ норм}} = 1/F_{490}$, приведено к 1) от значений соотношения $\text{НАД}^+/\text{НАДН}$. Усредненная кривая построена по результатам трех независимых экспериментов. **Г)** Зависимость интенсивности флуоресценции хромофора srYFP ($F_{490 \text{ норм}} = F_{490}$, приведено к 1) в составе HyPerC199S (красная линия) и RexYFP (черная линия) от значений pH среды. Кривые построены по результатам двух независимых экспериментов.

В состав реакционной смеси входили глюкоза, Mg-АТФ, НАД^+ , глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа и RexYFP. Реакцию начинали добавлением гексокиназы. Образование НАДН в системе приводит к увеличению поглощения пробы при 340 нм с одновременным падением интенсивности пика возбуждения флуоресценции на 490 нм биосенсора RexYFP (Рис. 6 Б). Подобрав предварительно оптимальную скорость реакции, в каждой временной точке мы рассчитали значение соотношения $\text{НАД}^+/\text{НАДН}$ в пробе и определили зависимость сигнала RexYFP от величины этого параметра (Рис.

6 В). Данный эксперимент продемонстрировал, что RexYFP способен детектировать небольшие количества НАДН даже на фоне избытка других нуклеотидов, в частности НАД⁺ и АТФ. В каждой серии эксперимента мы использовали разные концентрации биосенсора (100, 250, 750 нМ), сохраняя при этом все остальные параметры, и убедились, что сигнал RexYFP не зависит от его концентрации в пробе.

Во всех экспериментах *in vitro* мы также контролировали значение pH реакционных смесей. Поэтому следует подчеркнуть, что изменения сигнала RexYFP в наших экспериментах не вызвано изменением величины pH.

2.3. Подбор pH-контроля при работе с биосенсором RexYFP в живых системах

Как и другие биосенсоры, созданные на основе *srYFP*, сигнал RexYFP обладает pH-зависимостью. При работе с биосенсором в клетках эукариот мы убедились, что многие физиологические процессы, связанные с изменением соотношения НАД⁺/НАДН, связаны также и с pH-колебаниями. Закисление среды приводит к понижению флуоресценции RexYFP, это может привести к возникновению ложного сигнала. Для того чтобы учесть влияние pH на сигнал RexYFP мы использовали контрольный белок *HyPer-C199S* (*SypHer*), который тоже создан на основе пермутанта *srYFP* и, следовательно, должен иметь схожую pH-зависимость. *HyPer* является генетически кодируемым биосенсором для регистрации H₂O₂. Мутация C199S делает этот сенсор нечувствительным к своему субстрату, но pH-зависимость *srYFP* остается прежней. Таким образом, изменения флуоресцентного сигнала *SypHer* свидетельствуют лишь об изменениях величины pH среды. Для подтверждения одинаковой pH-зависимости RexYFP и *SypHer*, оба белка были выделены. Мы сравнили pH-зависимость флуоресценции, возбуждаемой при 490 нм, для обоих белков (Рис. 6 Г). Оказалось, что для белков характерны разные величины pK_a, несмотря на то, что оба они содержат один и тот же флуоресцентный белок в своей основе. Для *SypHer* величина pK_a составляет 8,5, в то время как для RexYFP – 7,6. Несмотря на различия в pK_a для биосенсоров характерно одинаковое изменение флуоресценции (приблизительно в 8 раз) в физиологическом диапазоне изменений pH (6,5 – 8,0).

В дальнейшем мы решили нормировать сигнал RexYFP на сигнал *SypHer*, полученные при одинаковых условиях эксперимента. Такой подход позволяет учитывать влияние pH и дает достоверную информацию об изменении внутриклеточного соотношения НАД⁺/НАДН.

2.4. Использование RexYFP в клетках эукариот

На следующем этапе исследования мы проверили возможность биосенсора RexYFP функционировать в живых клетках. Для этого мы проэкспрессировали конструкцию биосенсора в клетках линий HeLa и HEK293.

В экспериментах, связанных с микроскопией клеток, мы использовали восьмилучные слайды (μ -Slide 8 well, ibidi) и покадровый мультипозиционный режим съемки микроскопа. Это позволило нам детектировать сигналы сразу нескольких биосенсоров одновременно.

К клеткам, экспрессирующим RexYFP и SypHer, мы добавляли лактат и пируват. Обе добавки вызвали мгновенное падение сигнала RexYFP. При этом снижение интенсивности флуоресценции наблюдалось и для рН-сенсора SypHer. Изменение сигнала вызвано закислением цитоплазмы, поскольку транспорт лактата и пирувата через цитоплазматическую мембрану осуществляется благодаря H^+ -симпорту. Мы усреднили сигналы биосенсоров по большому количеству клеток и нормировали усредненный сигнал RexYFP на сигнал SypHer. Нормированный сигнал RexYFP не зависит от рН-колебаний и отражает изменение соотношения $НАД^+/НАДН$ в клетке. Сигнал RexYFP на добавление пирувата и лактата мы сравнили с сигналом еще одного биосенсора на соотношение $НАД^+/НАДН$ Peredox, опубликованного ранее. Peredox также представляет собой химерный белок, но в отличие от RexYFP, пермутант флуоресцентного белка T-Sapphire связан с двумя субъединицами T-Rex. Поэтому механизм работы Peredox основан на межмолекулярных взаимодействиях двух субъединиц в составе димера T-Rex. При увеличении $НАДН$ в системе интенсивность флуоресценции Peredox растет. Для ратиометрического измерения к Peredox был пришит флуоресцентный белок mCherry, поэтому сигнал этого биосенсора регистрируют как F405/F561. При тестировании биосенсора RexYFP мы одновременно проводили те же самые эксперименты с Peredox, сравнивая полученные результаты.

На рисунке 7 А,Б приведены сравнения сигналов RexYFP и Peredox в ответ на добавление к клеткам линии HEK293 пирувата и лактата. После добавления 5 мМ пирувата оба сенсора регистрировали падение цитоплазматического $НАДН$. А добавление избытка лактата (20 мМ) в среду наоборот привело к быстрому повышению $НАДН$, при этом после 15 минут от момента добавки соотношение окисленной и восстановленной форм кофактора вернулось приблизительно к прежнему значению. RexYFP и Peredox демонстрируют схожие характер и амплитуду ответа. Это позволяет сделать вывод о том, что предложенный нами способ контроля рН-изменений в клетке и нормирование сигнала RexYFP вполне эффективен.

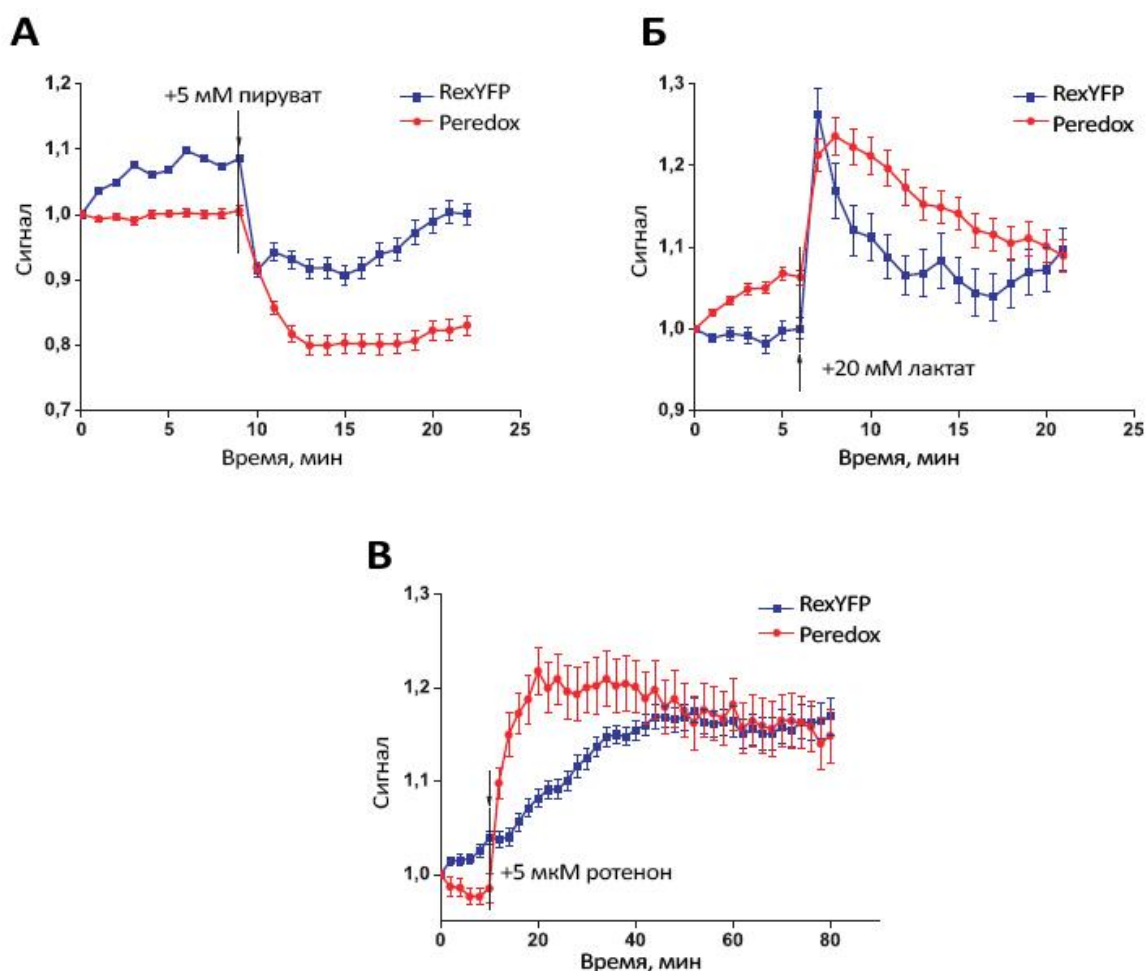


Рисунок 7. Сравнение сигналов RexYFP и Peredox в экспериментах с живыми клетками

Изменения сигналов RexYFP (синие линии) и Peredox (красные линии) в ответ на добавление **А)** 5 мМ пирувата **Б)** 20 мМ лактата **В)** 5 мкМ ротенона. Используемые линии клеток в эксперименте с пируватом и лактатом HEK293, с ротенонем - HeLa. Сигнал Peredox рассчитывается как F_{405}/F_{561} , сигнал RexYFP рассчитывается как $F_{490_{HyPer-C199S}}/F_{490_{RexYFP}}$. Кривые обоих биосенсоров построены по результатам 3 независимых экспериментов

Митохондрии являются главными потребителями НАДН в клетке. До сих пор оставалось неясным передаются ли изменения окислительно-восстановительного состояния матрикса митохондрий в цитоплазму. Мы ингибировали дыхательную цепь митохондрий на уровне комплекса I, используя ингибитор ротенон. С помощью биосенсоров RexYFP и Peredox регистрировали изменения соотношения $НАД^+/НАДН$ в цитоплазме. Оба сенсора регистрировали увеличение цитоплазматического НАДН при инкубации клеток с 5 мкМ ротенона. Вероятно, это связано с тем, что ингибирование комплекса I приводит к накоплению НАДН в матриксе митохондрий. При этом происходит восстановление пула НАД и в цитоплазме (Рис. 7 В).

Ингибирование дыхательной цепи митохондрий с помощью ротенона приводит к более медленному восстановлению пула НАД по сравнению с динамикой, которую мы прежде наблюдали при добавлении лактата. Perox достигают максимума ответа быстрее, чем RexYFP. Это связано, скорее всего, с тем, что Perox имеет большее сродство к НАДН, его константа сродства составляет около 5 нМ. По этой причине Perox не может быть использован для работы в митохондриях, в условиях с более высокими концентрациями НАДН. В матриксе митохондрий соотношение $\text{НАД}^+/\text{НАДН}$ приблизительно в сто раз ниже по сравнению с цитоплазмой.

2.5. Сравнение окислительно-восстановительного состояния пула НАД в цитоплазме и матриксе митохондрий с помощью RexYFP

Мы создали митохондриальную версию биосенсора RexYFP, названную RexYFP-мито, поместив на N-конец белка последовательность митохондриальной локализации. Влияние рН мы учитывали с помощью SypHer с митохондриальной локализацией (SypHer-мито). В каждом эксперименте в одинаковых условиях мы параллельно регистрировали сигналы сразу четырех биосенсоров: SypHer, SypHer-мито, RexYFP и RexYFP-мито.

Мы вновь убедились в том, что при ингибировании комплекса I с помощью ротенона происходит восстановление пула НАД в цитоплазме. Этот процесс наблюдался и в матриксе митохондрий (Рис. 8 А).

В другой серии экспериментов мы ингибировали комплекс II дыхательной цепи митохондрий с помощью ингибитора 3-нитропропионовой кислоты (3-NP). Ингибирование комплекса II привело к незначительному уменьшению НАДН в матриксе митохондрий, в то время как в цитоплазме соотношение $\text{НАД}^+/\text{НАДН}$ не изменилось (Рис. 8 Б). Комплекс II благодаря окислению сукцината поставляет дополнительные электроны в цепь. Возможно, комплекс I частично компенсирует работу заингибированного комплекса II, что приводит к большему расходованию НАДН.

Добавление разобщающего агента цианид м-хлорофенилгидразона (СССР) в концентрации 5 мкМ привело к закислению цитоплазмы и матрикса митохондрий. При этом в матриксе митохондрий значительно снизился НАДН, а в цитоплазме RexYFP регистрировал наоборот незначительное повышение восстановленной формы кофактора (Рис. 8 В). Последующее добавление к этой же самой пробе 25 мкМ ротенона способствовало небольшому увеличению НАДН, причем в обоих компартментах (Рис. 8 Г).

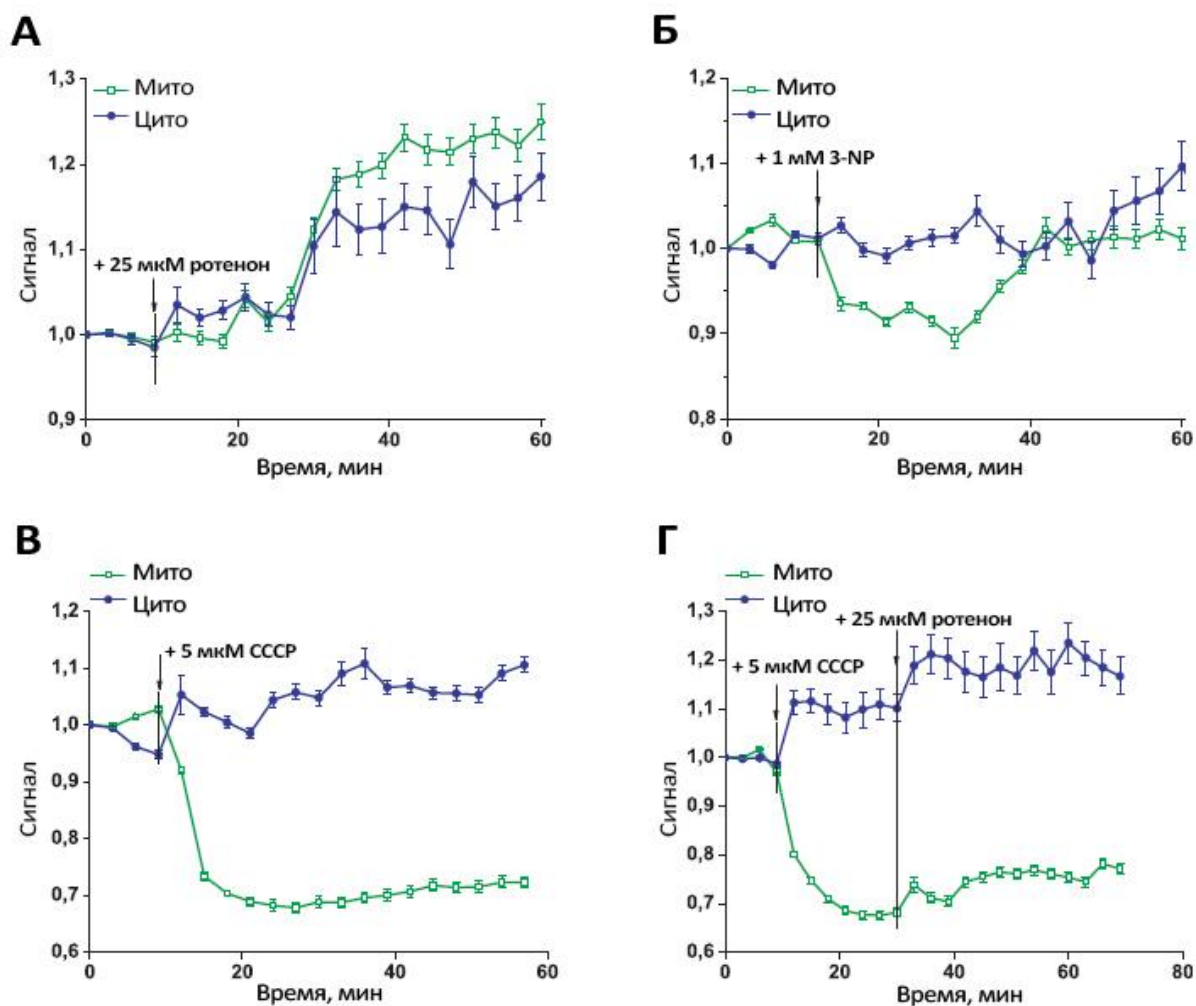


Рисунок 8. Сравнение сигналов RexYFP с цитоплазматической и митохондриальной локализацией

Изменения сигналов RexYFP с цитоплазматической локализацией (синие линии) и митохондриальной (зеленые линии) в клетках HeLa при добавлении **А)** 25 мкМ ротенона **Б)** 1 мМ 3-нитропропионовой кислоты (3-NP) **В)** 5 мкМ цианид м-хлорофенилгидразона (CCCP) **Г)** 5 мкМ CCCP с последующим добавлением 25 мкМ ротенона. Сигнал RexYFP рассчитывается как $F490_{\text{Hyp-C199S(МИТО)}}/F490_{\text{RexYFP(МИТО)}}$ для цитоплазматической и митохондриальной версий биосенсоров. Усредненные кривые построены по результатам четырех независимых экспериментов с добавлением 3-NP и по результатам трех для всех остальных.

На основании полученных результатов можно заключить, что созданный биосенсор RexYFP совместно с подходом нормирования его сигнала на рН-колебания является хорошим инструментом, позволяющим регистрировать изменения соотношения НАД⁺/НАДН в живых клетках и их компартментах.

Выводы

1. Получена и охарактеризована усовершенствованная версия биосенсора HyPer, регистрирующего пероксид водорода. Версия была названа HyPer-3, она отличается высоким динамическим диапазоном по сравнению с HyPer и высокими скоростями реакций окисления и последующего восстановления по сравнению с предыдущей версией HyPer-2. Преимущества HyPer-3 были продемонстрированы *in vivo* на модели раны zebrafish *Danio rerio*.
2. Впервые было показано на примере HyPer и HyPer-3, что при изменении окружения хромофора может изменяться время жизни флуоресценции некоторых сенсоров с одним флуорофором. Мы показали, что подобные сенсоры могут быть успешно использованы в микроскопии с режимом детекции времени жизни флуоресценции (FLIM).
3. Получен и охарактеризован генетически кодируемый флуоресцентный биосенсор RexYFP для регистрации динамики изменения соотношения НАД⁺/НАДН в живых системах в режиме реального времени. RexYFP является единственным в своем роде сенсором, позволяющим регистрировать соотношение НАД⁺/НАДН в цитоплазме и матриксе митохондрий.
4. На примере RexYFP была разработана и применена стратегия использования сенсоров на основе cpYFP в условиях значительных изменений величины рН в пределах физиологического диапазона.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

Статьи

1. Markvicheva KN, **Bilan DS**, Mishina NM, Gorokhovatsky AY, Vinokurov LM, Lukyanov S, Belousov VV. A genetically encoded sensor for H₂O₂ with expanded dynamic range. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**. 2011; 19(3): 1079-1084.

2. **Bilan DS**, Pase L, Joosen L, Gorokhovatsky AY, Ermakova YG, Grabher C, Gadella TWJ, Schultz C, Lukyanov S, Belousov VV. HyPer-3: a genetically encoded H₂O₂ probe with improved performance for ratiometric and fluorescence lifetime imaging. **ACS Chemical Biology**. 2013; 8(3): 535-542.

3. Mishina NM, Markvicheva KN, **Bilan DS**, Matlashov ME, Shirmanova MV, Liebl D, Schultz C, Lukyanov S, Belousov VV. Visualization of intracellular hydrogen peroxide with HyPer, a genetically encoded fluorescent probe. **Methods in Enzymology**. 2013; 526: 45-59.

4. **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): 951-957.

Патенты

1. Патент РФ № 2493260. **Билан Д.С.**, Белоусов В.В., Лукьянов С.А. Выделенная нуклеиновая кислота, кодирующая флуоресцентный биосенсор для детекции пероксида водорода, кассета экспрессии, клетка, продуцирующая биосенсор, выделенный флуоресцентный биосенсор для детекции пероксида водорода, выделенная нуклеиновая кислота, кодирующая флуоресцентный биосенсор, оперативно слитая с нуклеиновой кислотой, кодирующей сигнал внутриклеточной локализации, 20.09.2013. <http://www.freepatent.ru/patents/2493260>

2. Заявка на изобретение № 2012112582. **Билан Д.С.**, Белоусов В.В., Лукьянов С.А. Выделенная нуклеиновая кислота, кодирующая флуоресцентный биосенсор, кассета экспрессии, клетка продуцирующая флуоресцентный биосенсор, выделенный флуоресцентный биосенсор, 10.10.2013. <http://bankpatentov.ru/node/450587>

Тезисы докладов на конференциях

1. **Билан Д.С.**, Белоусов В.В. Генетически кодируемый флуоресцентный сенсор для регистрации соотношения НАД⁺/НАДН. X чтение памяти академика Юрия Анатольевича Овчинникова, 2011, Москва, Россия.

2. **Bilan D**, Matlashov M, Gorokhovatsky A, Schultz C, Enikolopov G, Belousov V. Genetically encoded fluorescent indicator for NAD⁺/NADH ratio imaging in different cellular compartments. «Mechanisms in Biology», The 38th FEBS Congress, 2013, St. Petersburg, Russia.

3. Ermakova Y, **Bilan D**, Mishina N, Markvicheva K, Enikolopov G, Belousov V. Genetically encoded red fluorescent probe for intracellular H₂O₂ detection. «Mechanisms in Biology», The 38th FEBS Congress, 2013, St. Petersburg, Russia.

4. **Bilan D**, Ermakova Y, Mishina N, Matlashov M, Subach O, Subach F, Schultz C, Enikolopov G, Belousov V. Expanding a HyPer family of genetically encoded redox probes. «Seeing is Believing – Imaging the Processes of Life» EMBO/EMBL Symposia, 2013, Hiedelberg, Germany.