

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

На правах рукописи

Шохина Арина Геннадиевна

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

Специальность 03.01.03 - Молекулярная биология

АВТОРЕФЕРАТ
*диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук*

Москва – 2019

Работа выполнена в группе метаболических основ патологии отдела метаболизма и редокс-биологии ФГБУ Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук (ИБХ РАН).

Научный руководитель:

Билан Дмитрий Сергеевич, кандидат биологических наук.

Официальные оппоненты:

Плотников Егор Юрьевич, доктор биологических наук, заведующий лабораторией структуры и функции митохондрий НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова.

Савицкий Александр Павлович, доктор химических наук, профессор, заведующий лабораторией физической биохимии Федерального исследовательского центра «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук.

Ведущая организация:

Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины ФМБА России.

Защита состоится «26» февраля 2020 года в 10:00 на заседании диссертационного совета Д 002.019.01 при ИБХ РАН по адресу: 117997, Москва, ул. Миклухо-Маклая, д. 16/10.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте www.ibch.ru ИБХ РАН.

Автореферат разослан «___» _____ 20__ года.

**Ученый секретарь диссертационного совета,
д.ф.-м.н. В.А. Олейников**



ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Редокс-биология изучает механизмы клеточной регуляции, основанные на окислительно-восстановительных процессах. Каждая живая клетка обладает характерным редокс-статусом, который изменяется в силу естественных или патологических причин. Поддержанием внутриклеточного гомеостаза редокс-статуса занимаются специализированные ферментативные системы при участии так называемых редокс-пар. Редокс-пары представляют собой соединения, которые присутствуют в клетках одновременно в окисленном и восстановленном состояниях. Одной из ключевых редокс-пар является восстановленный/окисленный глутатион (2GSH/GSSG). Изменение редокс-статуса в клетке приводит к сдвигу соотношения между окисленным и восстановленным компонентами в таких парах. Таким образом, изменение данного редокс-параметра служит маркером, который динамично отражает текущее состояние клетки. Регистрация подобных изменений может быть как ключом к пониманию молекулярной природы некоторых фундаментальных процессов, так и послужить основой для разработок специализированных подходов исследований, в том числе для скрининга лекарственных препаратов.

Традиционным подходом исследования такого параметра, как соотношение 2GSH/GSSG, является использование химических красителей. Однако существенный прорыв в изучении процессов, сопряженных с реакциями тиол-дисульфидного обмена, произошел с появлением генетически кодируемых биосенсоров на базе флуоресцентных белков. Для визуализации изменений редокс-состояния пула глутатиона широкую популярность в мировой практике получили так называемые редокс-чувствительные флуоресцентные белки. Окисленное и восстановленное состояния такого белка различаются спектрально, а изменение флуоресцентного сигнала отражает динамику изменения редокс-статуса исследуемого объекта.

Значительная часть существующих в настоящий момент биосенсоров, в том числе для регистрации GSSG/2GSH, флуоресцирует в зеленой области спектра. Однако расширение цветовой палитры биосенсоров представляется перспективной задачей. Спектрально различающиеся версии индикатора можно использовать совместно в пределах одной системы. Помимо этого, биосенсоры на основе красных флуоресцентных белков обладают рядом преимуществ для использования в системах *in vivo*. Свет с большей длиной волны, применяемый для возбуждения флуоресценции красных белков, менее токсичен для клеток, по сравнению со светом, возбуждающим флуоресценцию зеленых белков. Кроме того, аутофлуоресценция биологических объектов в красном канале регистрации флуоресценции значительно ниже по сравнению с зеленым.

Результатом настоящей работы является создание нового редокс-биосенсора Grx1-roCherry для регистрации соотношения GSSG/2GSH на основе красного флуоресцентного белка mCherry. Grx1-roCherry в сочетании с имеющимися биосенсорами позволяет осуществлять мониторинг редокс-состояния пула глутатиона одновременно в нескольких компартментах живых клеток в режиме реального времени.

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

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

Научная новизна и практическая ценность работы. В настоящей работе описано создание нового генетически кодируемого флуоресцентного индикатора редокс-статуса пула глутатиона, обладающего спектральными характеристиками красного флуоресцентного белка mCherry. Полученный индикатор Grx1-roCherry был охарактеризован в системах *in vitro* и протестирован *in cellulo* и *in vivo*. Было установлено, что Grx1-roCherry пригоден для использования в условиях мультипараметрической микроскопии и прижизненной визуализации редокс-процессов не только в клетках различного генеза, но и в тканях модельного организма *D. rerio*. Grx1-roCherry расширяет спектральную панель индикаторов для редокс-биологии, причем его биохимические свойства сравнимы с таковыми для успешно используемого в мировой исследовательской практике зеленого индикатора редокс-состояния пула глутатиона Grx1-roGFP2.

С помощью нового биосенсора Grx1-roCherry и имеющегося Grx1-roGFP2 в режиме мультипараметрической микроскопии мы продемонстрировали разную динамику

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

Созданный биосенсор Grx1-roCherry соответствует всем требованиям, которые предъявляют к современным генетически кодируемым индикаторам на базе флуоресцентных белков. Есть основания полагать, что Grx1-roCherry будут успешно применять для визуализации редокс-статуса внутриклеточного пула глутатиона в различных медико-биологических исследованиях.

Структура диссертации. Диссертационная работа изложена на 120 страницах и состоит из введения, обзора литературы, экспериментальной части, результатов и их обсуждения, выводов, заключения, списка сокращений и списка литературы, включающего 351 ссылку. Диссертация содержит 30 рисунков и 4 таблицы.

Апробация работы. Основные результаты данной работы были доложены на следующих научных конференциях: «EMBO Conference on Redox Biology» Москва-Санкт-Петербург, Россия, 2017; «V-ый съезд биохимиков России», Сочи, Россия, 2016.

Публикации. По материалам работы опубликовано 6 статей в рецензируемых журналах.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

1. Создание молекулярно-генетической конструкции Grx1-roCherry

При создании красного флуоресцентного индикатора для регистрации редокс-состояния пула глутатиона мы использовали классическую схему, которую ранее использовали при создании семейств белков rxYFP и roGFP. За основу биосенсора нами были выбраны мономерные красные флуоресцентные белки mCherry, mRuby2 или mKate2, отличающиеся высокой яркостью. Для создания флуоресцентного белка, чувствительного к редокс-изменениям пула глутатиона, в последовательности указанных белков мы ввели сайт-направленным мутагенезом пары аминокислотных остатков цистеина. Позиции для замен выбирали таким образом, чтобы они оказывались в непосредственной близости друг с другом на соседних β -листах, а также с хромофором флуоресцентного белка. Предполагалось, что остатки цистеина при окислении окружающей среды будут способны к формированию дисульфидной связи, что приведет к конформационным изменениям окружения хромофора и, как следствие, к изменению спектральных характеристик белка. Позиции для мутаций были выбраны на основе анализа структур красных белков, в том числе в результате их сравнения со структурами зеленых редокс-чувствительных белков.

Известно, что редокс-состояние данного типа белков уравнивается с пулом глутатиона гораздо быстрее в присутствии белков глутаредоксинов. Поэтому для увеличения локальной концентрации глутаредоксинов и улучшения кинетических свойств индикаторов на N-конец зеленых белков через полипептидный линкер был добавлен человеческий глутаредоксин-1 (Grx-1). Поэтому во всех полученных нами конструкциях с красными белками на N-конце был расположен Grx1, который соединен с флуоресцентным белком через линкер состава (Gly-Gly-Ser-Gly-Gly)₆. Суммарно на данном этапе работы нами было получено 12 молекулярно-генетических конструкций Grx1-mCherry, Grx1-mRuby и Grx1-mKate2, отличающихся положениями пар аминокислотных остатков цистеина.

После проведения первичного скрининга конструкций в бактериальных клетках *E.coli* штамма XL1Blue посредством неспецифического окислителя H₂O₂ мы отобрали 2 варианта сенсорных белков, оба на базе флуоресцентного ядра mCherry. По результатам тестирования этих конструкций в эукариотической системе в культуре человеческих клеток HeLa Kyoto мы выбрали одну: Grx1-mCherry-A150C/K203C.

Для оптимизации спектральных и динамических характеристик полученной сенсорной конструкции мы произвели ряд манипуляций. В частности, заменили линкер

между Grx1 и флуоресцентной частью индикатора на последовательность (SGTGGNASDGGGSGG). Ранее такой линкер был использован в биосенсоре Peredox для регистрации соотношения НАД⁺/НАДН. Затем мы применили подход, который ранее использовали для разработки редокс-чувствительного белка на основе голубого флуоресцентного белка roBFP. Метод основан на внесении изменений в хромофорное окружение флуоресцентного ядра, что позволяет сделать структуру индикатора более подвижной и, таким образом, увеличить динамический диапазон ответа. Для этого с помощью направленного мутагенеза мы вносили дополнительный аминокислотный остаток в последовательность Grx1-mCherry-A150C/K203C после Cys150. Мы использовали все протеиногенные аминокислотные остатки, кроме цистеина, и после тестирования в клетках HeLa Kyoto отобрали одну версию с дополнительным остатком Thr после Cys150.

Затем мы предположили, что внесение полярных аминокислотных остатков в хромофорное окружение флуоресцентного ядра также может увеличить динамический диапазон сенсора. На основе анализа структуры белка мы выбрали два положения в последовательности нашего индикатора, которые в дальнейшем подвергали мутагенезу. Первым мы выбрали остаток Ser151, который с помощью направленного мутагенеза последовательно заменяли на Thr, Asn, Gln, Asp и Glu. Похожим образом мы получили мутации Glu153, который заменяли на Thr, Asn, Gln и Asp. Все полученные версии мы проверяли в культуре клеток HeLa Kyoto и сравнивали с исходным вариантом. В результате была отобрана конструкция, несущая замену Ser151Glu, которая демонстрировала не только увеличенный динамический диапазон по сравнению с исходными версиями, но и быстрее других восстанавливалась после окисления. Под восстановлением в данном случае мы подразумеваем возвращение флуоресцентного сигнала к первоначальному значению после окисления. Итоговая конструкция, несущая мутации Ala150Cys, Ser151Glu, Lys203Cys и инсерцию Ala150CysThr, была названа Grx1-roCherry (рис. 1).

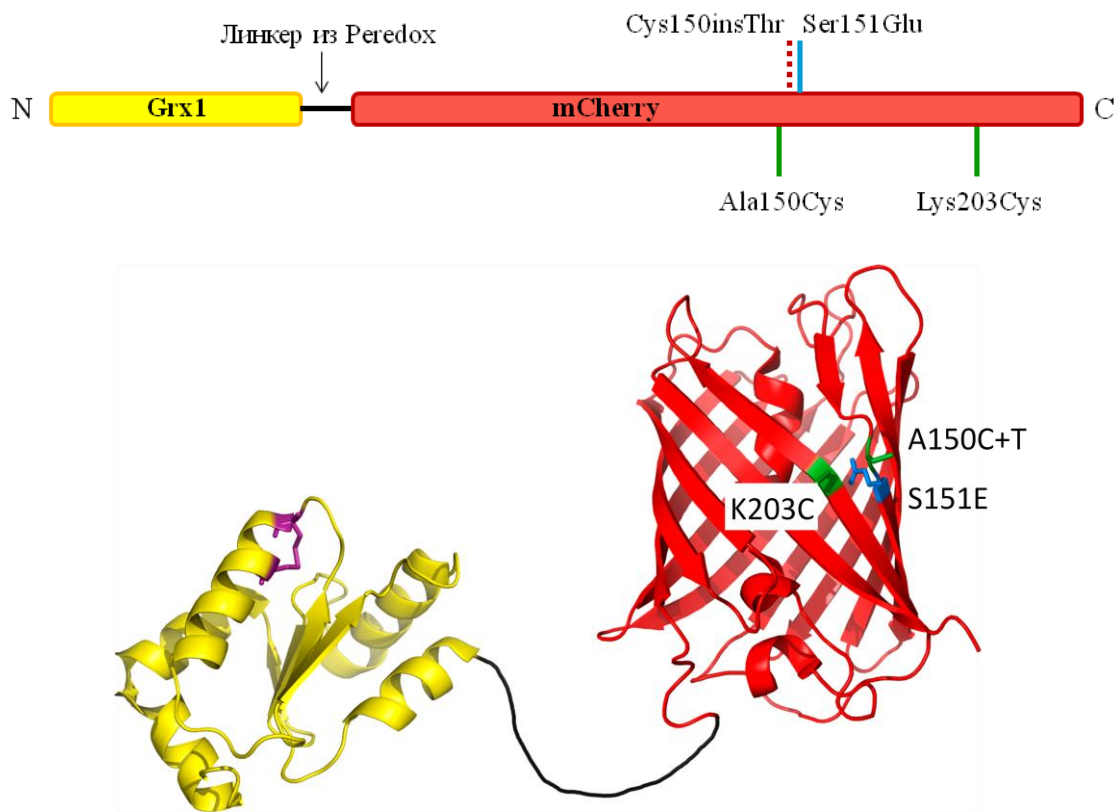


Рис. 1. Схема индикатора Grx1-roCherry на уровне нуклеотидной последовательности и белковой глобулы.

2. Определение характеристик Grx1-roCherry *in vitro*

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

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

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

Во всех используемых нами моделях как в бактериальных клетках, так в эукариотах, мы используем пероксид водорода в качестве неспецифического окислителя пула глутатиона. Поэтому важно проверить, не окисляет ли H_2O_2 индикатор напрямую. Было

показано, что Grx1-roCherry *in vitro* в концентрации 40 нМ не чувствителен к пероксиду водорода в концентрациях вплоть до 100 мМ (рис. 2В). Тогда как внесение в систему окисленного глутатиона в концентрациях от 3 мМ приводит к значительному изменению флуоресцентного сигнала Grx1-roCherry (рис. 2В). Мы также проверили, что окисление, вызванное добавками H₂O₂, было всегда опосредовано окислением глутатиона. Для этого к раствору, содержащему 40 нМ Grx1-roCherry и 10 мМ восстановленный глутатион, мы добавили 100 мМ H₂O₂, который, как мы выяснили, не вызывает напрямую окисления белка и, следовательно, изменений флуоресцентного сигнала. Однако если в данной системе присутствовал глутатион, то биосенсор демонстрировал выраженное изменение сигнала, которое соответствовало окисленному состоянию в результате образования в системе окисленного глутатиона.

Чтобы оценить яркость индикатора Grx1-roCherry мы определили его коэффициент молярной экстинкции и квантовый выход, которые составили 14500 М⁻¹см⁻¹ и 0.23. У исходного флуоресцентного белка mCherry квантовый выход сравним и составляет 0.22, тогда как коэффициент экстинкции значительно выше – 72000 М⁻¹см⁻¹. Таким образом, индикатор Grx1-roCherry тусклее mCherry приблизительно в 4,75 раз.

Для многих биосенсоров на основе флуоресцентных белков характерна чувствительность к изменению рН в физиологическом диапазоне. В случае отсутствия контрольных экспериментов изменение флуоресцентного сигнала вследствие колебаний рН может привести к неверной интерпретации полученных результатов. Поэтому рН-чувствительность и значение рКа являются важными характеристиками любого индикатора. Мы получили кривую рН-зависимости очищенного белка Grx1-roCherry (рис. 2Г), согласно которой в диапазоне физиологических значений рН 6,0-8,0 интенсивность его флуоресценции изменяется в 4 раза. Это выгодно отличает Grx1-roCherry от ранее опубликованного gxRFP, интенсивность флуоресценции которого в том же диапазоне изменяется в 20 раз. Значение рКа биосенсора Grx1-roCherry составляет 6,7.

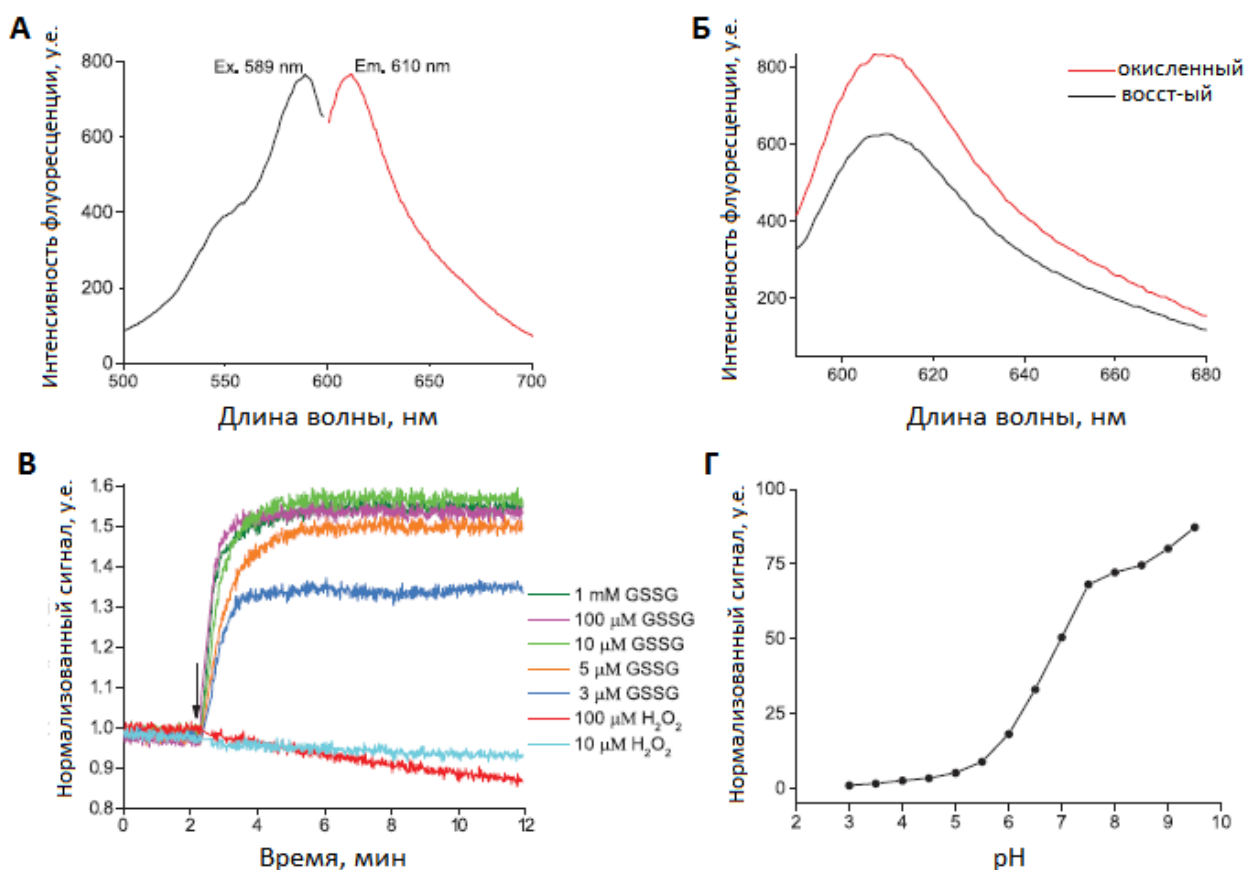


Рис. 2. Характеристики Grx1-roCherry *in vitro*.

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

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

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

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

2.2 Оценка специфичности Grx1-roCherry

Для оценки специфичности Grx1-roCherry мы инкубировали пробы очищенного белка с несколькими наиболее часто встречающимися внутри клетки окислителями. Для сравнения мы использовали зеленый биосенсор Grx1-roGFP2. Оба белка реагируют на появление в системе окисленного глутатиона. Причем для Grx1-roCherry насыщающей концентрацией является 10 мкМ GSSG. При этом для Grx1-roGFP2 сигнал различим для концентраций GSSG 10 мкМ и 1 мМ (рис. 3). Максимальная амплитуда ответа

очищенного белка Grx1-roCherry на насыщающую концентрацию GSSG (10 мкМ) составила $1,53 \pm 0,03$ и не изменялась при дальнейшем увеличении концентрации GSSG, что говорит о высокой скорости установления равновесия между индикатором и пулом глутатиона. Таким образом, Grx1-roCherry, судя по нашим данным (рис. 3 столбцы 1 и 2), более чувствителен к окислению по сравнению с Grx1-roGFP2. В дальнейшем эти наблюдения были подтверждены экспериментами по оценке окислительно-восстановительного потенциала данных индикаторов.

При добавлении больших концентраций пероксида водорода (500 мкМ) незначительное изменение сигнала демонстрирует Grx1-roGFP2. Однако можно считать, что в физиологических условиях пероксид водорода не будет влиять на флуоресцентный сигнал обоих биосенсоров. Мы выяснили, что в отличие от Grx1-roGFP2, сигнал красного биосенсора зависит от присутствия больших концентраций оксида азота NO (рис. 3 столбец б). Мы также выяснили, что оба индикатора крайне чувствительны к хлораминам, а именно к N-хлоротаурину – производному хлорноватистой кислоты. Еще один окислитель, супероксид-анион радикал, который образуется в реакции, катализируемой ксантин оксидазой, также влияет на сигнал обоих биосенсоров, однако в большой концентрации, которая не достигается в клетках. Полученные данные представлены на рисунке 3. Неспецифичное окисление обоих сенсоров объясняется экспонированными в их структурах редокс-активными остатками цистеина, которые легко могут быть атакованы высокоактивными соединениями. Из перечисленных окислителей в заданных концентрациях производные гипогалогенного стресса действительно могут существенно влиять на сигнал в реальных условиях.

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

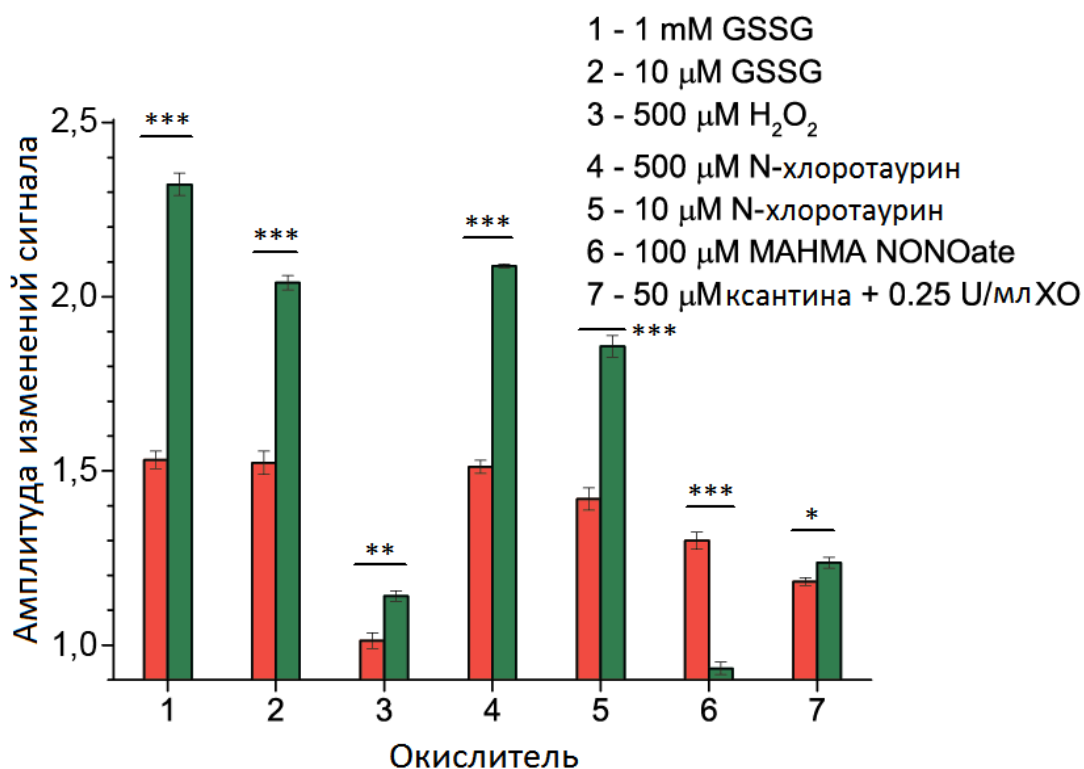


Рис. 3. Сравнительная оценка специфичности индикаторов Grx1-roCherry и Grx1-roGFP2.

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

2.3 Оценка окислительно-восстановительного потенциала Grx1-roCherry

Для оценки окислительно-восстановительного потенциала Grx1-roCherry пробы очищенного белка титровали растворами с заданным соотношением DTT_{red}/DTT_{ox} в диапазоне от 0:10 до 10:0. По нашей оценке окислительно-восстановительный потенциал Grx1-roCherry составляет -335 мВ при pH 7.4. В аналогичных условиях при pH 7.4 потенциал зеленого аналога Grx1-roGFP2 составляет -315 мВ. Величины потенциалов, пересчитанные при pH 7.0, составляют -311 мВ для Grx1-roCherry и -291 мВ для Grx1-roGFP2, что приближено к данным литературы. Полученные данные приведены в табл. 1.

Табл.1. Значения окислительно-восстановительных потенциалов редокс-чувствительных индикаторов Grx1-roGFP2 и Grx1-roCherry. Определены титрованием редокс-парой

$$\text{DTT}_{\text{red}}/\text{DTT}_{\text{ox}}$$

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

Полученная относительная величина окислительно-восстановительного потенциала Grx1-roCherry позволяет сделать вывод о том, что красный белок окисляется легче зеленого. Это согласуется с полученными ранее данными в эксперименте по определению специфичности на препаратах очищенных белков, где было продемонстрировано, что для максимального изменения сигнала Grx1-roCherry требуется GSSG в меньшей концентрации по сравнению с Grx1-roGFP2 (рис. 3 столбцы 1 и 2). Таким образом, по окислительно-восстановительному потенциалу Grx1-roCherry (-311 мВ) схож с другими представителями семейства данных биосенсоров (roGFP1: -291 мВ, roGFP2: -280 мВ, rxYFP: -261 мВ). Следовательно, по-прежнему существует необходимость создания биосенсоров с отличающимися значениями окислительно-восстановительных потенциалов, в том числе для работы в компартментах с высоким потенциалом, таких, как люмен эндоплазматического ретикулума.

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

Создание биосенсора для регистрации редокс-статуса пула глутатиона на основе красного флуоресцентного белка позволяет использовать его в режиме мультипараметрической микроскопии в комбинации с другими редокс-биосенсорами с эмиссией флуоресценции в зеленой области спектра. Мы выбрали наиболее популярные в исследованиях биосенсоры: Grx1-roGFP2 и SoNar, для регистрации соотношения НАД⁺/НАДН. Для локализации биосенсоров Grx1-roCherry и Grx1-roGFP2 в матриксе митохондрий использовали сигнальную последовательность MTS из субъединицы VIII человеческой цитохром-С оксидазы, которая на уровне генов была добавлена на N-концы белков.

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

Вещество DMF хорошо проникает в клетки млекопитающих, где ковалентно связывается с восстановленной формой глутатиона и, таким образом, выводит его из общего пула. Это провоцирует развитие кратковременного окислительного стресса. Однако, также известно, что DMF активирует NRF2 – один из ключевых транскрипционных факторов, вовлеченных в клеточный ответ на окислительный стресс. Активация NRF2 запускает транскрипцию генов нескольких ферментов-участников редокс-систем гомеостаза, в том числе ген НАДФН-зависимой глутатионредуктазы. Усиление экспрессии гена этого фермента стимулирует процесс рециклизации глутатиона, что, в конечном счете, приводит к сдвигу равновесия 2GSH/GSSG в сторону восстановленной формы. Мы решили проверить, как вещество диметилфумарат, влияющее на редокс-статус клетки, влияет на динамику соотношения 2GSH/GSSG при окислительном стрессе.

Для этого в одних и тех же клетках HeLa Kyoto мы локализовали разработанный нами красный биосенсор Grx1-roCherry, а в матриксе митохондрий – зеленый Grx1-roGFP2. Клетки инкубировали в течение 24 часов с 50 μ M DMF, после чего заменяли среду и проводили микроскопию в мультипараметрическом режиме с одновременной регистрацией флуоресцентного сигнала в нескольких каналах. В качестве контроля использовали аналогичные клетки, которые инкубировали с растворителем DMSO, в котором готовят пробу DMF. В качестве неспецифического окислителя, вызывающего окислительный стресс, использовали пероксид водорода в конечной концентрации 150 μ M, который вносили в среду к клеткам в процессе микроскопирования.

Было показано, что после внесения H_2O_2 Grx1-roCherry в цитоплазме клеток, преинкубированных с DMF, окисляется гораздо менее эффективно по сравнению с контрольными, не обработанными DMF (рис. 4А). В то же время мы не выявили значительных отличий в амплитуде ответа Grx1-roGFP2 в митохондриях этих же клеток (рис. 4А). Чтобы убедиться, что наблюдаемые различия не вызваны индивидуальными особенностями двух используемых индикаторов, мы повторили эксперимент, поменяв их локализации: Grx1-roCherry направили в матрикс митохондрий, а Grx1-roGFP2 – в цитоплазму. В результате полученная ранее тенденция развития динамики сигналов была воспроизведена: с помощью Grx1-roCherry мы по-прежнему не зарегистрировали значительных различий в эффективности окисления глутатиона в митохондриях контрольных клеток и преинкубированных с DMF (рис. 4Б), тогда как в цитоплазме разница оказалась существенной (рис. 4Б).

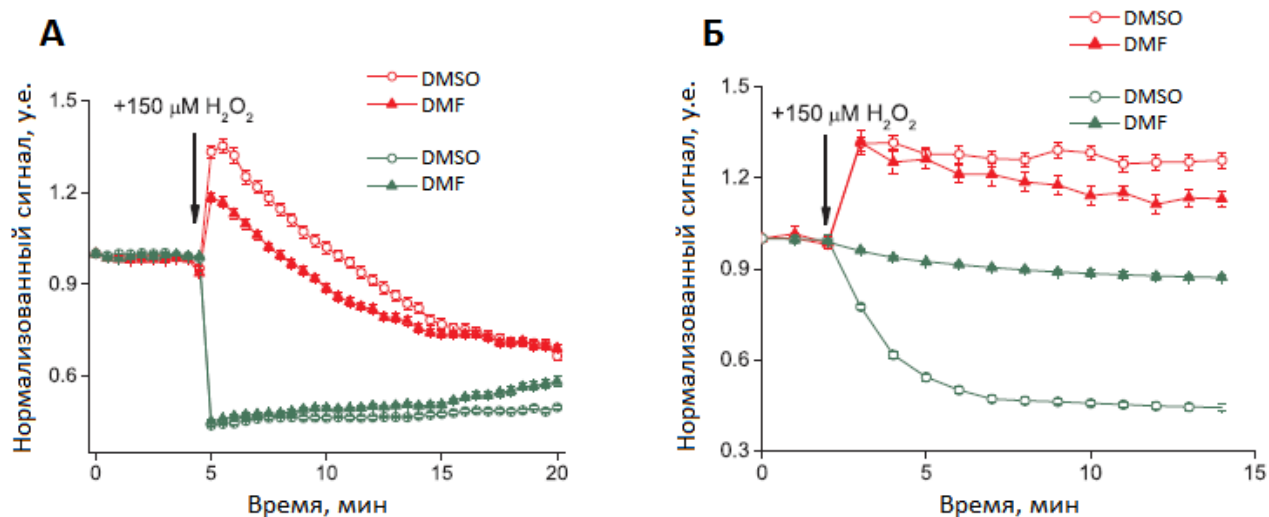


Рис. 4. Влияние вещества DMF на динамику редокс-состояния пулов глутатиона в матриксе митохондрий и цитоплазме клеток HeLa Kyoto при развитии окислительного стресса.

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

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

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

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

Для того чтобы проверить, каким образом гипоксия/реоксигенация оказывает влияние на пул глутатиона в цитоплазме и матриксе митохондрий клеток HeLa Kyoto, мы экспрессировали в них Grx1-roCherry и Grx1-roGFP2 с соответствующими сигналами локализации. Непосредственно во время микрофотоирования клетки подвергали гипоксии (0% O₂) в течение 20 минут, затем подачу кислорода восстанавливали, вызывая реоксигенацию (21% O₂). Динамику сигналов Grx1-roCherry (F589 - интенсивность флуоресценции, возбужденной при 589 нм) и Grx1-roGFP2 (F405/F488 – соотношение интенсивностей флуоресценции, возбужденной при соответствующих длинах волн) регистрировали при этом в режиме реального времени.

На рисунке 5 представлены полученные результаты. С первых минут развития гипоксии в матриксе митохондрий клеток происходит значительное увеличение соотношения 2GSH/GSSG, которое так же быстро возвращается к первоначальному состоянию при оксигенации через 20 минут. При этом выраженных изменений цитоплазматического пула глутатиона не было зафиксировано. Таким образом, митохондриальный пул глутатиона в данных условиях оказался гораздо чувствительнее к изменению концентрации кислорода окружающей среды.

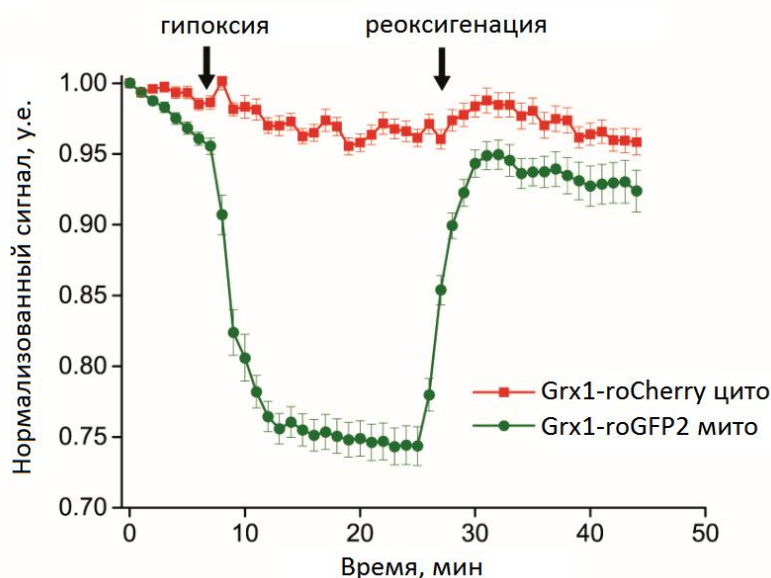


Рис. 5. Цитоплазматический и митохондриальный пулы глутатиона ведут себя независимо во время гипоксии/реоксигенации.

Динамика изменения сигналов в мультипараметрическом режиме микроскопии индикаторов Grx1-roCherry (F589, красная линия) в цитоплазме и Grx1-roGFP2 (F405/F488, зеленая линия) в матриксе митохондрий клеток HeLa Kyoto, подвергнутых

гипоксии (20 мин) и последующей реоксигенации. Значения сигналов нормированы на исходные. Данные получены по результатам анализа 28 клеток в 2 экспериментах. Планки погрешностей соответствуют стандартной ошибке среднего.

3.3 Изменения редокс-статуса опухолевых клеток при переключении метаболизма

Дихлороацетат (DCA) является структурным аналогом пируват-аниона и ингибирует киназу пируватдегидрогеназы. В результате в митохондриях происходит активация пируватдегидрогеназного комплекса (ПДК): активируется электрон-транспортная цепь, приток пирувата в митохондрии увеличивается. Таким образом, DCA может быть использован для контролируемого переключения метаболизма клеток с гликолиза на окислительное фосфорилирование.

Мы решили выяснить, как подобный метаболический сдвиг в раковых клетках влияет на такие важные редокс-показатели, как соотношения 2GSH/GSSG и НАД⁺/НАДН. Для этого мы коэкспрессировали индикаторы Grx1-roCherry и SoNar в цитоплазме клеток линии HeLa Kyoto. Затем клетки инкубировали в среде с 30 мМ DCA в течение 48 часов, после чего с помощью проточной цитометрии регистрировали распределение флуоресцентного сигнала в популяции клеток.

SoNar, индикатор изменения соотношения НАД⁺/НАДН, в отличие от Grx1-roCherry является радиометрическим. Это значит, что его сигнал анализируют как отношение интенсивности флуоресценции, возбужденной при 420 нм, к интенсивности флуоресценции, возбужденной при 490 нм (F420/F490). В нашей работе мы рассматриваем изменения флуоресценции SoNar в двух каналах независимо.

Мы выяснили, что инкубация раковых клеток линии HeLa Kyoto с DCA приводит к росту интенсивности флуоресценции Grx1-roCherry в среднем по популяции, что отражает окисление цитоплазматического пула глутатиона (рис 6А). В тех же клетках F420 индикатора SoNar растет, а F490 меняется незначительно, это свидетельствует о восстановлении пула НАДН в цитоплазме (рис. 6А). Мы проверили, изменяются ли в аналогичных условиях указанные редокс-параметры в клетках неракового происхождения. В качестве примера мы использовали линию HEK293. В ходе данного исследования мы показали, что существенных изменений соотношений 2GSH/GSSG и НАД⁺/НАДН в клетках HEK293 не происходит (рис. 6Б).

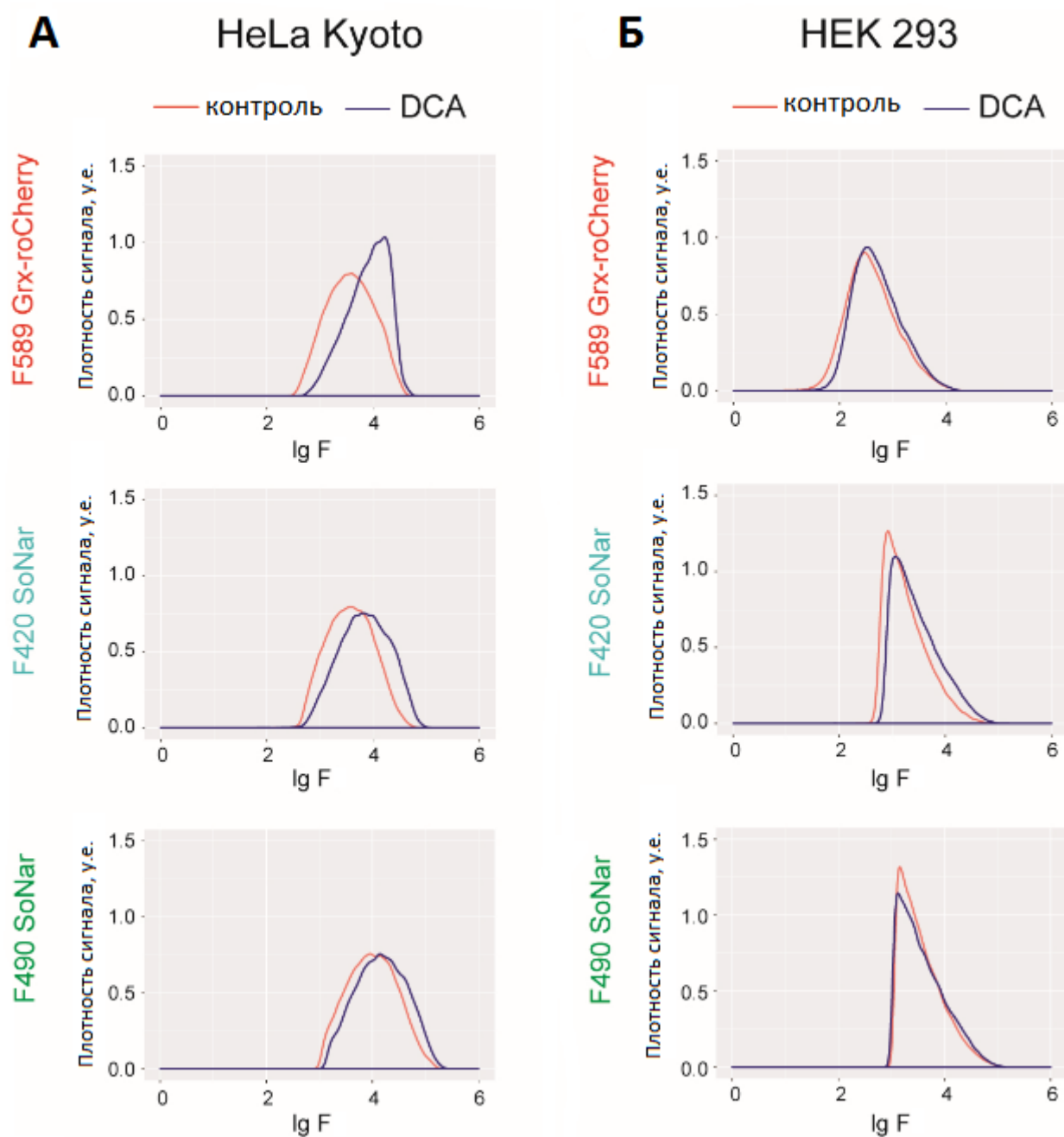


Рис. 6. Распределение флуоресцентного сигнала биосенсоров Grx1-roCherry и SoNar в популяциях клеток HeLa Kyoto и HEK293 при инкубации с DCA.

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

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

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

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

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

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

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

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

Мы показали, что генерация пероксида водорода в ядре вызывает окисление как цитоплазматического, так и митохондриального пулов глутатиона в обоих типах клеток (рис. 7А, Б). У нейронов локальная генерация пероксида водорода в митохондриях также вызывает окисление глутатиона в обоих компартментах (рис. 7В). Однако у клеток HeLa Kyoto при генерации пероксида водорода в митохондриях окисляется лишь глутатион митохондриального матрикса, окисление не затрагивает пул в цитоплазме (рис. 7Г).

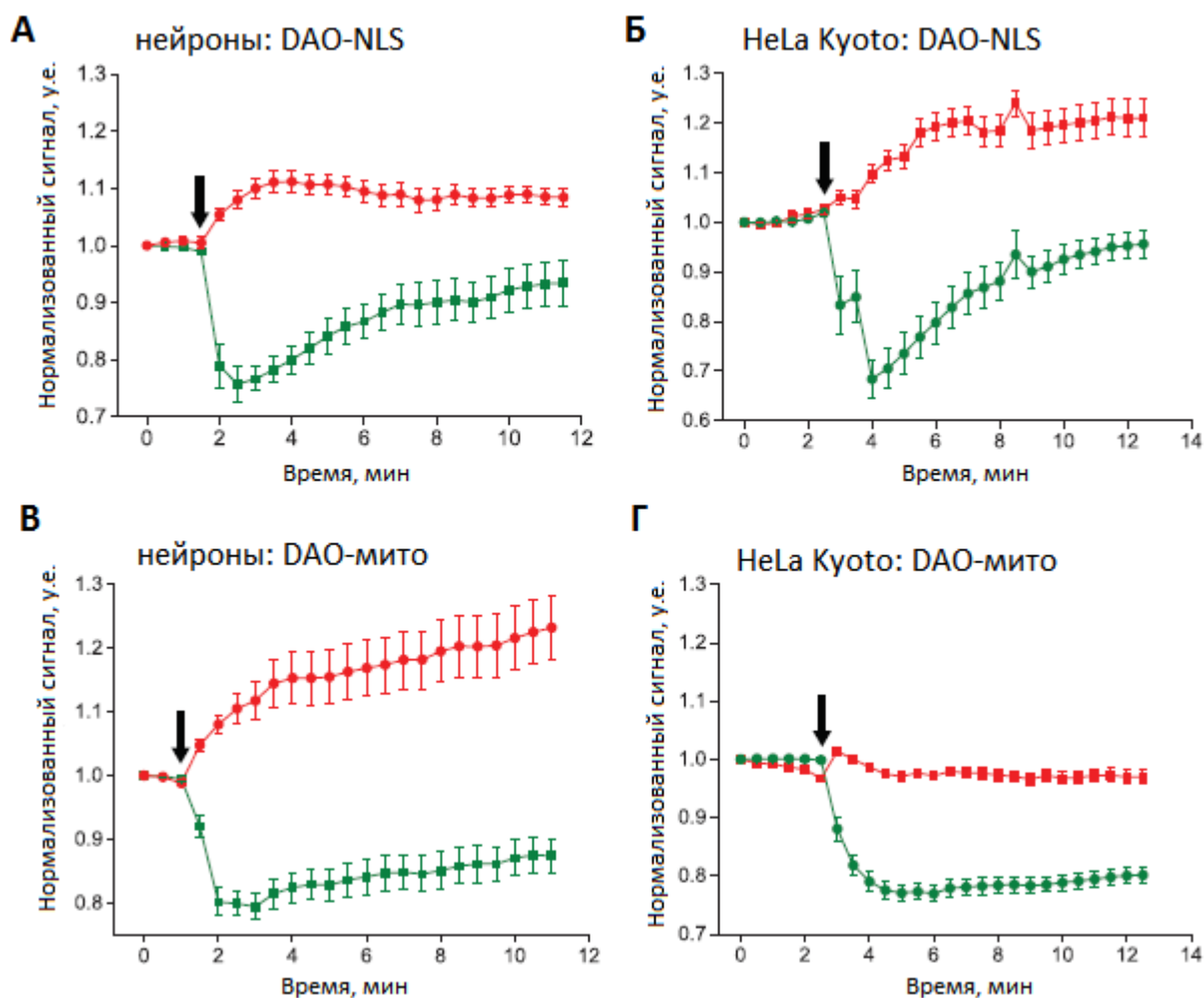


Рис. 7. Динамика редокс-статуса глутатиона в цитоплазме и матриксе митохондрий клеток линии HeLa Kyoto и мышинных нейронов в первичной культуре при локализованной генерации пероксида водорода с помощью фермента DAO.

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

Известен факт, что уровень экспрессии тиоредоксинредуктазы (TrxR), ключевого фермента антиоксидантной защиты, у раковых клеток выше, чем у других типов. Мы предположили, что цитоплазма HeLa Kyoto может оставаться нечувствительной к окислительному стрессу, образуемому в митохондриях при направленной генерации

H_2O_2 , из-за повышенной активности TrxR. Для проверки этой гипотезы мы ингибировали TrxR в клетках HeLa Kyoto, в которых коэкспрессировали цитоплазматическую версию Grx1-roCherry и митохондриальные версии фермента DAO и биосенсора Grx1-roGFP2. В качестве специфического ингибитора TrxR использовали ауранофин.

Мы показали, что при локальной генерации H_2O_2 в митохондриях клеток HeLa Kyoto, преинкубированных с 2,5 μM ауранофина в течение ночи, происходит окисление как цитоплазматического, так и митохондриального пулов глутатиона (рис. 8А). Тогда как в контрольных клетках без ингибирования TrxR окисление затрагивает лишь митохондриальный пул (рис. 8Б).

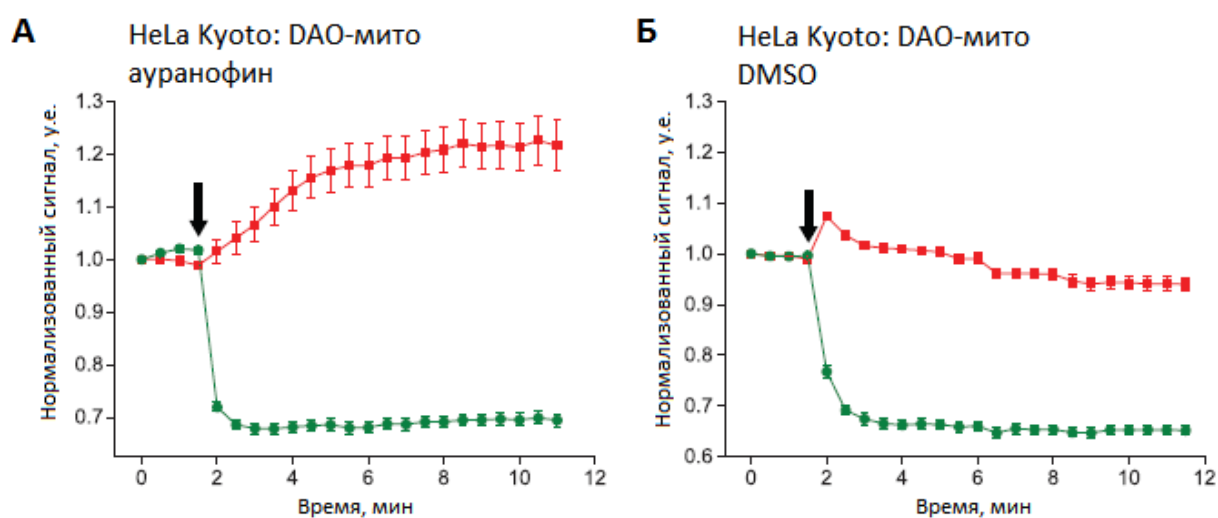


Рис. 8. Динамика соотношения 2GSH/GSSG в цитоплазме и матриксе митохондрий клеток линии HeLa Kyoto при локальной генерации H_2O_2 в митохондриях в присутствии и отсутствии ингибитора тиоредоксинредуктазы (TrxR).

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

(А) Клетки в течение ночи инкубировали с 2.5 μM ауранофина, ингибитора TrxR.

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

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

Интересно, что параллельно в нашей лаборатории были получены аналогичные данные с использованием генетически кодируемых биосенсоров HuPers для регистрации

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

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

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

Мы протестировали Grx1-roCherry *in vivo* в тканях модельного объекта *D. rerio*. Для этого препарат очищенной мРНК Grx1-roCherry инъецировали в желточный мешок эмбрионов на стадии одной клетки. Выяснили, что Grx1-roCherry экспрессируется в данной системе, флуоресцентный сигнал хорошо визуализируется и интенсивности флуоресценции достаточно для регистрации посредством широкопольного флуоресцентного микроскопа. Для проверки функциональной активности индикатора трансфецированных 2-дневных мальков (рис. 9А) иммобилизовали в капле легкоплавкой агарозы, затем индуцировали окислительный стресс в тканях животных посредством внесения в среду пероксида водорода. Параллельно в режиме реального времени регистрировали изменение сигнала Grx1-roCherry в тканях животного. Поверхностные ткани эмбриона *D. rerio* плохо проницаемы для пероксида водорода, поэтому мы использовали заведомо избыточную концентрацию окислителя (50 мМ). Мы выявили, что индикатор Grx1-roCherry функционально активен в тканях модельного объекта *D. rerio* и пригоден для детекции в них изменений соотношения 2GSH/GSSG (рис. 9В).

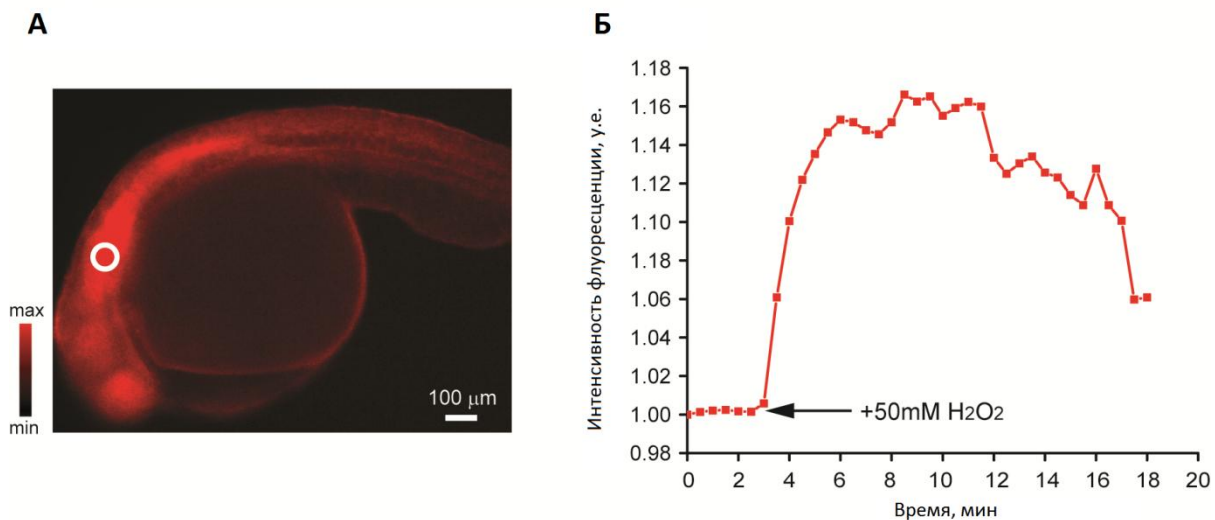


Рис. 9. Grx1-roCherry в тканях двухдневной личинки *D. rerio*.

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

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

ВЫВОДЫ

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

Список статей, опубликованных по теме диссертации:

- 1) **Shokhina AG**, Kostyuk AI, Ermakova YG, Panova AS, Staroverov DB, Egorov ES, Baranov MS, van Belle GJ, Katschinski DM, Belousov VV, Bilan DS. “Red fluorescent redox-sensitive biosensor Grx1-roCherry”, *Redox Biol*, 2019; 21:101071.
- 2) **Шохина А.Г.**, Белоусов В.В., Билан Д.С. «Генетически кодируемый биосенсор roKate для регистрации редокс-состояния пула глутатиона», *Вестник РГМУ*, 2019; 1: 94–101.
- 3) Ermakova YG, Pak VV, Bogdanova YA, Kotlobay AA, Yampolsky IV, **Shokhina AG**, Panova AS, Marygin RA, Staroverov DB, Bilan DS, Sies H, Belousov VV. “SypHer3s: a genetically encoded fluorescent ratiometric probe with enhanced brightness and an improved dynamic range”, *Chem Commun (Camb)*, 2018; 54(23): 2898-2901.
- 4) В.В. Белоусов, **А.Г. Шохина**, А.С. Панова, Д.С. Билан «Регистрация динамики соотношения НАД⁺/НАДН в тканях эмбрионов рыб *Danio rerio* с помощью генетически кодируемого биосенсора», *Вестник РГМУ*, 2018; 1: 74-55.
- 5) Ermakova YG, Lanin AA, Fedotov IV, Roshchin M, Kelmanson IV, Kulik D, Bogdanova YA, **Shokhina AG**, Bilan DS, Staroverov DB, Balaban PM, Fedotov AB, Sidorov-Biryukov DA, Nikitin ES, Zheltikov AM, Belousov VV. “Thermogenetic neurostimulation with single-cell resolution”, *Nat Commun*, 2017; 8: 15362.
- 6) Билан Д.С., **Шохина А.Г.**, Лукьянов С.А., Белоусов В.В. (2015). Основные редокс-пары клетки. *Биоорг. хим.* 41 (4), 385–402.

Тезисы конференций:

- 1) **Shokhina AG**, Kostyuk AI, Ermakova YG, Panova AS, Belousov VV, Bilan DS, “Sensors for glutathione redox potential based on red fluorescent proteins”, EMBO Conference on Redox Biology, 2017. Moscow–Saint Petersburg, Russia. Poster presentation.
- 2) **Шохина А.Г.**, Костюк А.И., Белоусов В.В., Билан Д.С., «Красный генетически кодируемый флуоресцентный сенсор состояния пула глутатиона», V Съезд биохимиков России, 2016. Сочи-Дагомыс, Россия. Постерная презентация.