

**Костюк Александр Игоревич**

**Исследование гипогалогенного стресса с помощью генетически  
кодируемых биосенсоров**

Специальность 1.5.3. – Молекулярная биология

Автореферат диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Работа выполнена в Отделе метаболизма и редокс-биологии Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук (ИБХ РАН).

**Научный руководитель:**

кандидат биологических наук **Билан Дмитрий Сергеевич**

**Официальные оппоненты:**

**Александр Павлович Савицкий**, профессор, доктор химических наук, заведующий Лабораторией физической биохимии Института биохимии им. А.Н. Баха Федерального исследовательского центра «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук

**Алексей Викторович Соколов**, доктор биологических наук, заведующий Лабораторией биохимической генетики Отдела молекулярной генетики Федерального государственного бюджетного научного учреждения "Институт экспериментальной медицины" Министерства науки и высшего образования Российской Федерации

**Ведущая организация:**

**Федеральное государственное бюджетное научное учреждение Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук**

Защита состоится 15 февраля 2023 года в 11:00 часов на заседании диссертационного совета 24.1.037.01 при Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук по адресу: 117997, г. Москва, ул. Миклухо-Маклая, д. 16/10.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук, а также на сайте института [www.ibch.ru](http://www.ibch.ru).

Автореферат разослан «...».....2022 г

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



## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ.

### *Актуальность исследования.*

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

(Псевдо)гипогалогенные кислоты представляют собой небольшие молекулы, которые выступают, пожалуй, самыми мощными двухэлектронными окислителями в живых системах. Традиционно их ассоциируют с функционированием иммунной системы, в рамках которого они служат для уничтожения патогенных микроорганизмов. Однако, в последние годы убедительно показано, что многие социально-значимые заболевания (в первую очередь, сердечно-сосудистые и нейродегенеративные) сопровождаются признаками асептического воспаления. Так, для них характерны инфильтрация нейтрофилов и макрофагов в очаг патологии, повышенная продукция про-воспалительных цитокинов, а также редокс-стресс. Сейчас уже не возникает сомнений, что (псевдо)гипогалогенные кислоты не просто вовлечены в эти процессы, но и, в некоторых случаях, лежат в их основе. К сожалению, современные аналитические техники не позволяют совершить прорыв и значительно продвинуться в установлении конкретных аспектов метаболизма данных молекул. В большинстве случаев исследователям остается полагаться на непрямые методы, такие как *in vitro* измерение активности ферментов, синтезирующих активные формы (псевдо)галогенов, либо же на детекцию вторичных продуктов (псевдо)гипогалогенного стресса, которая сопряжена с низкой чувствительностью протоколов. И хотя каждый год появляются публикации, описывающие

создание низкомолекулярных флуоресцентных индикаторов для регистрации НОС1, их использование сталкивается со множеством проблем, вызванных, в первую очередь, сложностями с доставкой в ткани.

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

#### *Цель и задачи исследования.*

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

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

1. Разработать дизайн генетически кодируемого сенсора для визуализации (псевдо)гипогалогенных кислот и их производных.
2. Охарактеризовать свойства полученного сенсора, прежде всего – спектральные характеристики, селективность, чувствительность и кинетические параметры.
3. Охарактеризовать сенсор в эукариотических системах экспрессии, в частности, на модели фагоцитоза бактерий первичными нейтрофилами человека.
4. При помощи созданного сенсора зарегистрировать *in vivo* динамику гипогалогенного стресса в модели воспаления ткани *Danio rerio*, вызванного ампутацией хвостового плавника.

#### *Научная новизна работы.*

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

Nurocrates обладает необычными кинетическими свойствами – очищенный белок демонстрирует достаточно высокую константу скорости реакции с N-хлоротаурином ( $\sim 6.1 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ). Таким образом, согласно нашим данным, Nurocrates является самой реакционноспособной молекулой в отношении хлораминов, описанной на текущий момент.

Мы также расшифровали пространственную структуру мутантной версии сенсора, НурocratesCS, содержащей замену ключевого остатка Cys355, ответственного за взаимодействие с целевыми аналитами. НурocratesCS представляет собой первый редокс-сенсор на основе кругового пермутанта флуоресцентного белка, для которого известна пространственная укладка.

Наконец, при помощи разработанного нами индикатора мы смогли зарегистрировать (псевдо)гипогалогенный стресс, с которым сталкиваются клетки *Escherichia coli*, поглощаемые первичными нейтрофилами человека, в режиме реального времени. Мы показали, что бактерии испытывают масштабное окисление цитоплазмы с первых секунд после попадания в полость фагосомы. До этого подобные эксперименты осуществляли с использованием неселективных методов, либо техник, не обладающих достаточным пространственно-временным разрешением. Нам также удалось зарегистрировать *in vivo* динамику (псевдо)гипогалогенных кислот в модели ампутации хвостового плавника *Danio rerio*. Этот результат является еще одним подтверждением гипотезы о том, что градиент пероксида водорода, возникающий в области раны, конвертируется в активные формы галогенов прибывающими лейкоцитами. В предыдущих работах авторы приводили лишь косвенные доказательства протекания данного процесса в физиологических условиях.

#### *Теоретическая и практическая значимость.*

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

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

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

#### *Степень достоверности результатов.*

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

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

В опытах с использованием культур эукариотических клеток и живых мальков *Danio rerio*, мы всегда сравнивали сигнал *Nurocrates* с сигналом контрольной версии сенсора, *NurocratesCS*. В некоторых случаях мы дополнительно задействовали рН-индикатор (*SynHer3s*). Минимальное количество независимых повторностей для экспериментов с линией HeLa составляло 1 (обычно, 3), при этом минимальное количество обсчитываемых клеток равнялось 25. Для экспериментов с нейтрофилами количество независимых экспериментов равнялось 3, и общее количество исследованных клеток составляло 35. Мы считаем, что такие размеры выборок являются достаточными, поскольку измеряемые параметры индивидуальных клеток характеризовались дисперсиями существенно меньшими, нежели сила исследуемых эффектов. В целом, подобные объемы выборок являются общепринятыми в данной сфере.

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

Статистический анализ свидетельствует о том, что зарегистрированные нами различия являются достоверными.

#### *Структура диссертации.*

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

#### *Апробация работы.*

Основные результаты работы были представлены на 3 конференциях. По материалам диссертации опубликовано 6 статей в рецензируемых журналах.

### ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ.

#### **1. Обзор литературы.**

Обзор литературы состоит из четырех основных разделов. Первый посвящен химическим свойствам и биологическим эффектам (псевдо)гипогалогенных кислот, а также современным методам их детекции в живых системах. Во втором разделе обсуждаются строение, биофизические параметры и разнообразие флуоресцентных белков. Третий раздел описывает основные классы генетически кодируемых сенсоров и общие принципы их функционирования. Наконец, последний раздел обобщает уже предпринятые попытки исследования (псевдо)гипогалогенного стресса при помощи данных инструментов.

#### **2. Экспериментальная часть.**

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

На первом этапе работы нам предстояло выбрать белок, который бы выступил в качестве сенсорного модуля разрабатываемого инструмента. На момент 2017 года в литературе были описаны четыре полипептида, демонстрирующие относительную селективность в отношении (псевдо)гипогалогенных кислот: NurT, NurR, RclR и NemR (Табл. 1). Несмотря на то, что механизмы чувствительности были известны для всех перечисленных молекул, лишь NemR соответствовал всем необходимым требованиям для участия в разработке сенсора. Использование NurT и RclR существенно осложнилось тем фактом, что их пространственные структуры не были расшифрованы. Таким образом, мы не знали, демонстрируют ли они достаточную конформационную подвижность при взаимодействии с целевыми аналитами, а также то, какие регионы полимеров претерпевают наибольшие перестройки. Что же касается NurR, основным его недостатком являлась чувствительность к активным электрофилам по типу хинонов, которая препятствовала достижению высокой селективности инструмента.

В ходе исследования биохимических свойств NemR Gray и соавторы установили, что воздействие HOCI приводит к формированию обратимой сульфенамидной связи между остатками Cys106 и Lys175. При этом рентгеноструктурные данные предполагают, что сближение боковых цепей упомянутых аминокислот сопровождается выраженными

конформационными перестройками петли, представленной 97-105-ыми позициями белка. Таким образом, мы посчитали, что описанный процесс способен выступать в качестве молекулярного переключателя, сопрягающего сенсорный и репортерный домены генетически кодируемого индикатора. Более того, Gray и соавторы показали, что в условиях *in vivo* ни пероксид водорода, ни супероксид-анион, ни оксид азота не вызывают экспрессию *nemR*-оперона. Таким образом, мы могли ожидать, что NemR<sup>C106</sup> (вариант NemR, содержащий единственный остаток цистеина, достаточный для взаимодействия с HOCl) является селективным в отношении активных галогенов, но не активных форм азота или кислорода.

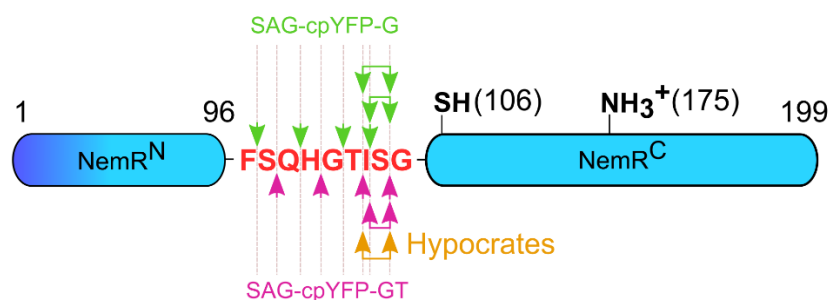
**Таблица 1.** Некоторые свойства редокс-активных белков, которые могут быть использованы в качестве сенсорных доменов генетически кодируемого индикатора для регистрации HOCl. Данные указаны по состоянию на 2017 год. Апостроф обозначает образование межсубъединичной связи.

Название	Организм	Год	Механизм	Селективность	Структура	Подвижность
HypT	<i>E. coli</i>	2012	Окисление Met123, Met206 и Met230	?	–	?
HypR	<i>B. subtilis</i>	2012	Дисульфидная связь (Cys14-Cys49')	–	+	Слабая
RclR	<i>E. coli</i>	2013	Дисульфидная связь (Cys21-Cys89)	+	–	?
NemR	<i>E. coli</i>	2013	Сульфенамидная связь (Cys106-Lys175)	+	+	Умеренная

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

Поскольку под действием гипогалогенных кислот NemR<sup>C106</sup> демонстрирует хоть и выраженное, но очень локальное изменение конформации, которое не затрагивает общую архитектуру белка или положение его N- и C-концов, мы пришли к выводу о том, что наиболее оптимальной стратегией разработки сенсора будет интеграция сrFP в область подвижной петли. При этом в качестве репортерного домена мы решили использовать сrYFP, который отлично зарекомендовал себя при создании генетически кодируемых индикаторов. В общей сложности мы создали двенадцать молекулярно-генетических конструкций, в рамках которых вставка сrYFP покрывает всю область подвижной петли NemR<sup>C106</sup> (Рис. 1). Поскольку эффективность сопряжения сенсорного и репортерного доменов сильно зависит от физического контакта между ними, мы задействовали две пары гибких линкеров (SAG/GT и SAG/G). Первичные версии индикатора тестировали путем добавления NaOCl либо к суспензии бактерий, экспрессирующей инструмент, либо к очищенному препарату белка. Среди двенадцати вариантов лишь 104-105 (SAG/GT), 103-105 (SAG/G), 103-105 (SAG/GT), 102-105 (SAG/G) и 102-105 (SAG/GT) продемонстрировали относительно выраженное изменение оптических свойств в результате гипохлорит-опосредованного окисления. Во всех случаях мы наблюдали рост правого пика, а также падение левого пика возбуждения флуоресценции. Таким образом, сигнал NemR<sup>C106</sup>-сrYFP может быть рассчитан как Ex500/Ex425. Наибольшей амплитудой ответа (около 1.6 раза) характеризовалась версия 102-105 (SAG/GT), с которой мы





**Рисунок 1.** Позиции вставки cpYFP в область подвижной петли NemR<sup>C106</sup>, которые мы тестировали в своей работе. Числа соответствуют порядковым номерам аминокислотных остатков согласно последовательности NemR<sup>C106</sup>. Красные буквы соответствуют подвижной петле. Одиночные и двойные стрелки соответствуют вставкам, которые сопровождалась и не сопровождалась делециями.

продолжили дальнейшую работу. Данный белок получил название **Нурократес** (от **Нуроклорит** **Радиометрич** **Сенсор**), что является созвучным с именем великого древнегреческого врача Гиппократ (англ. Hippocrates), который был одним из первых людей в истории, изучавших воспаление как медицинский феномен.

Очищенный препарат **Нурократес** обладает двумя максимумами возбуждения флуоресценции (424 нм и 500 нм), которым соответствует единый пик эмиссии, расположенный в области 517 нм. Для каждого из двух пиков возбуждения мы оценили молярные коэффициенты поглощения и квантовые выходы флуоресценции в окисленном и в восстановленном состояниях (**Табл. 2**). Это позволило показать, что формирование ответа на NaOCl вовлекает изменение обоих параметров, хотя молярный коэффициент поглощения и вносит существенно больший вклад. Яркость **Нурократес** составляет примерно 7%-22% от яркости EYFP, который был использован в качестве контроля.

**Таблица 2.** Оптические свойства **Нурократес** в полностью восстановленном (DTT) и окисленном (N-хлоротаурин) состояниях. Яркость вычисляли как произведение квантового выхода флуоресценции и молярного коэффициента поглощения.

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

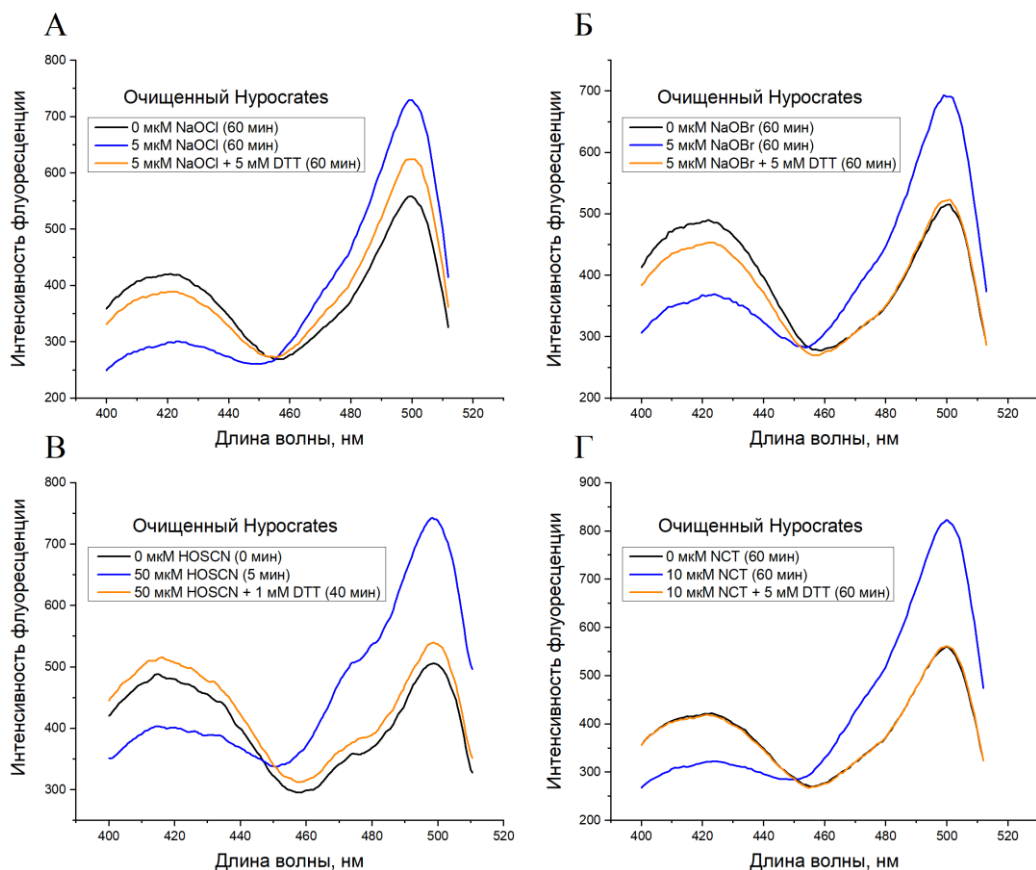
### 2.3. Взаимодействие **Нурократес** с (псевдо)гипогалогенными кислотами и их производными.

На следующем этапе работы мы решили охарактеризовать взаимодействие **Нурократес** с целевыми аналитами. Для этого мы обрабатывали очищенный препарат белка аликвотами NaOCl, NaOBr и HOscn и регистрировали изменения, происходящие в спектре возбуждения флуоресценции (**Рис. 2**). Кроме того, мы проверили, способен ли сенсор

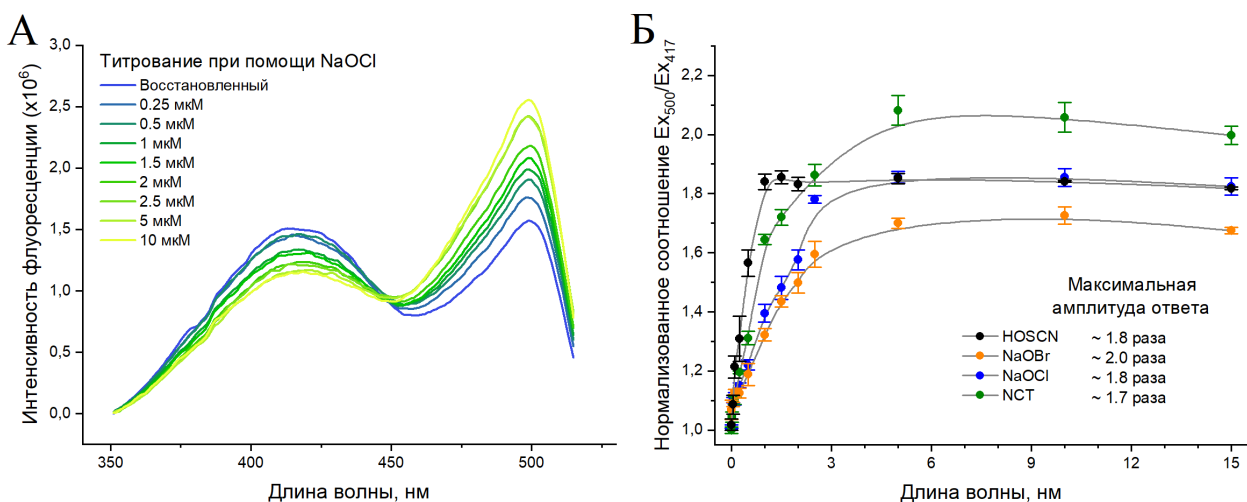
чувствовать производные гипогалогенных кислот. В качестве тестового соединения, мы задействовали N-хлоротаурин (NCT), поскольку известно, что активированные нейтрофилы производят достаточно высокие концентрации данного хлорирующего агента. Оказалось, что во всех случаях окисленный препарат демонстрировал характерный радиометрический сдвиг оптических свойств. Таким образом, Hurocrates может быть описан как сенсор, регистрирующий общую силу (псевдо)гипогалогенного стресса. Отметим, что мы не считаем данное свойство недостатком инструмента и не интерпретируем его как «низкую селективность». Во-первых, в физиологических условиях миелопероксидаза и родственные белки синтезируют сложную смесь (псевдо)гипогалогенных кислот, которые, к тому же, претерпевают неферментативную конверсию друг в друга. Во-вторых, едва ли HOCl и HOBr оказывают свои биологические эффекты напрямую. Дело в том, что клетки содержат высокие концентрации нуклеофильных групп, которые способны вытеснить окислитель и превратиться во вторичные производные. Таким образом, если бы сенсор улавливал лишь гипогалогенные кислоты, но не их производные, он бы визуализировал узкие участки активности соответствующих ферментов, но не общую зону окислительного стресса.

Мы также проверили, является ли ответ Hurocrates обратимым, для чего инкубировали окисленные препараты сенсора в присутствии DTT (**Рис. 2**). Оказалось, что во всех случаях спектр белка сдвигается в сторону исходного состояния. Интересно, что полная обратимость ответа была зарегистрирована лишь для HOSCN и NCT, что, по всей видимости, связано с их меньшей реакционной способностью и большей селективностью в отношении остатков цистеина. Для того, чтобы косвенно проверить это предположение, мы обработали препараты Hurocrates крайне высокими концентрациями NaOCl, NaOBr и NCT в молярном соотношении 1:200. В то время как в последнем случае спектр белка остался неизменным и соответствовал максимально окисленному состоянию, первые два агента привели к выраженному выгоранию эмиссии, что свидетельствует о большем количестве повреждающих модификаций.

Важным свойством любого генетически кодируемого сенсора является его динамический диапазон ответа, поскольку он задает область концентраций аналита, которые могут быть визуализированы при помощи инструмента. Для того, чтобы оценить обсуждаемый параметр у Hurocrates, мы проводили титрование очищенного препарата белка возрастающими концентрациями окислителей (**Рис. 3**). Согласно полученным результатам, максимальная амплитуда ответа инструмента находится в диапазоне от 1.7 раза до 2.0 раз и зависит от используемого окислителя. Hurocrates достигает насыщения при молярном соотношении окислителя и белка ~9:1 для NaOCl, NaOBr, NCT, и ~2:1 для HOSCN. По всей видимости, полученный результат может быть объяснен в свете более высокой селективности HOSCN к остаткам цистеина по сравнению с другими агентами. Наконец, мы решили установить, какие минимальные концентрации аналитов могут быть достоверно обнаружены сенсором в используемой нами системе (пределы детекции). Полученные значения составили ~100 нМ для NaOBr, ~120 нМ для HOSCN, ~290 нМ для NCT и ~330 нМ для NaOCl. Поскольку концентрации (псевдо)гипогалогенных кислот в очагах воспаления могут достигать миллимолярных значений, мы можем утверждать, что динамический диапазон Hurocrates является достаточным для его использования *in vivo*.



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



**Рисунок 3.** Титрование очищенного препарата Hurocrates возрастающими концентрациями специфических окислителей. Изменение спектров возбуждения флуоресценции сенсора на примере NaOCl (А). Кривые титрования Hurocrates (Б). Концентрация белка составляет 500 нМ. Данные представлены как среднее  $\pm$  SEM,  $n \geq 2$ .

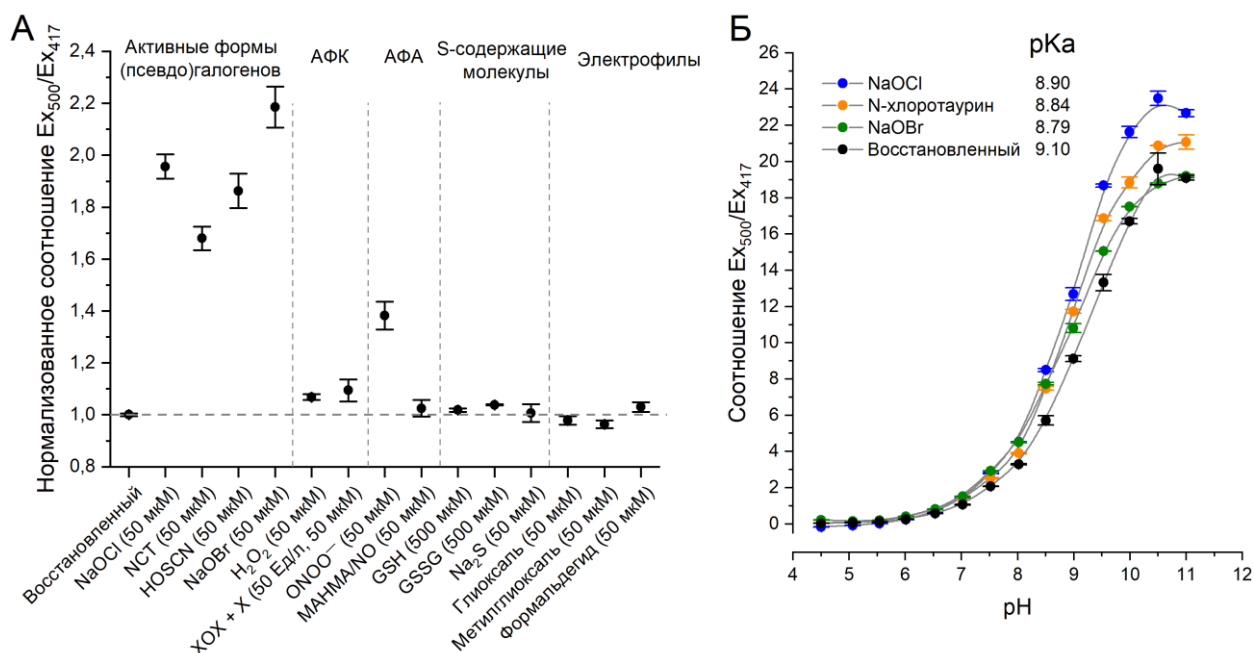
#### 2.4. Кинетические параметры *Hypocrates*.

Тот факт, что (псевдо)гипогалогенные кислоты и их производные, представляют собой высоко реакционноспособные молекулы и характеризуются крайне малыми временами жизни в физиологических условиях, накладывает определенные кинетические ограничения на инструменты для их визуализации. Сенсор будет надежно регистрировать (псевдо)гипогалогенный стресс лишь в том случае, если он будет взаимодействовать со своими мишенями с достаточно высокими константами скоростей. Для оценки обсуждаемого параметра мы произвели измерение кинетических свойств *Hypocrates* методом остановленной струи. Необходимые эксперименты были поставлены совместно с нашими коллегами из лаборатории профессора Joris Messens (Брюссель, Бельгия). Полученные данные свидетельствуют о том, что *Hypocrates* взаимодействует с NaOBr ( $\sim 4.5 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ) и NaOCl ( $\sim 1.4 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ) примерно в 100 раз быстрее, чем с NCT ( $\sim 6.1 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ). Поскольку кинетические свойства *NemR* или его мутантов не описаны в литературе, мы решили проверить, сохранил ли сенсор параметры родительского белка. *NemR*<sup>C106</sup> также является более селективным в отношении NaOCl ( $\sim 3.0 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ) по сравнению с NCT ( $\sim 4.4 \times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ).

Проведенные кинетические эксперименты позволяют сделать несколько интересных наблюдений. Первое состоит в том, что по неизвестной нам причине, *Hypocrates* является более реакционноспособным, нежели родительский белок. Данный факт оказывается особенно неожиданным в свете того, что, как правило, искусственное внедрение чужеродных доменов в естественные полипептиды без последующей оптимизации ухудшает их свойства. Во-вторых, гипогалогенные кислоты взаимодействуют, что с сенсором, что с исходным белком, примерно на два-три порядка медленнее, чем со свободным цистеином или его низкомолекулярными аналогами. В то же самое время измеренные значения для констант скоростей в отношении NCT оказываются необычно большими. Таким образом, мы можем заключить, что микроокружение в существенной мере модулирует кинетические свойства ключевого остатка цистеина в составе *NemR*<sup>C106</sup> и *Hypocrates*, делая его более селективным в отношении галаминов, нежели гипогалогенных кислот. Учитывая ограниченную способность последних мигрировать через биологические жидкости, кажется привлекательной гипотеза о том, что подобные свойства позволяют *NemR* эффективно чувствовать невысокие концентрации галаминов и, тем самым, запускать адаптационную программу в кратчайшие сроки после наступления окислительного стресса. Соответственно, мы предполагаем, что в физиологических условиях основными мишенями *Hypocrates* выступают не гипогалогенные кислоты как таковые, а их вторичные производные.

#### 2.5. Селективность *Hypocrates*.

С целью установления селективности *Hypocrates* мы подвергли очищенные препараты белка воздействию широкой панели биологических окислителей различной природы (Рис. 4А). Пероксид водорода (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), супероксид-анион (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>), оксид азота (NO<sup>•</sup>) и окисленный глутатион (GSSG) вызвали лишь незначительные сдвиги в спектре возбуждения флуоресценции пробы. Поскольку родительский белок (*NemR*) является природным сенсором на активные электрофилы, мы решили проверить влияние соединений данной группы на *Hypocrates*. Ни глиоксаль, ни метилглиоксаль, ни формальдегид не



**Рисунок 4.** (А) Диаграмма селективности Nurocrates. Концентрация белка составляла 2 мкМ. NCT – N-хлоротаурин. XOX – ксантиноксидаза. X – ксантин. GSH – восстановленный глутатион. GSSG – окисленный глутатион. АФК – активные формы кислорода. АФА – активные формы азота. (Б) Зависимость сигнала сенсора от pH буфера. Значения представлены как средние ± SEM, n ≥ 3.

оказали никакого эффекта на его оптические свойства. Полученные результаты не являются неожиданными, так как NemR<sup>C106</sup>, который был использован в качестве сенсорного домена, не содержит редокс-активных остатков Cys21 и Cys116, участвующих в детекции карбонильных соединений. Однако, Nurocrates оказался чувствительным к пероксинитриту (NaONOO). Поскольку селективность NemR в отношении данного агента никогда не изучали, сложно сказать, является ли данный результат следствием того, что интеграция srYFP привела к «поломке» белка, или же это его естественное свойство. В любом случае, мы можем сделать вывод, что, если в конкретной экспериментальной модели ожидается выраженная продукция активных форм азота, применение Nurocrates возможно лишь в сочетании с грамотно-поставленными контролями (например, ингибиторами NO-синтаз).

Все флуоресцентные белки в той или иной мере демонстрируют pH-чувствительность, связанную со смещением равновесия в реакции депротонирования хромофора в зависимости от кислотности окружающей среды. Для того, чтобы оценить чувствительность Nurocrates в отношении обсуждаемого параметра мы помещали очищенные препараты белка в буферы с фиксированными значениями pH, после чего строили зависимость сигнала индикатора от кислотности (Рис. 4Б). Анализ данных свидетельствуют о том, что восстановленный сенсор характеризуется pK<sub>a</sub> величиной 9.1, при этом его окисление селективными агентами приводит к падению данного значения. Соответственно, мы можем заключить, что Nurocrates является pH-чувствительным в физиологическом диапазоне, и эксперименты с его участием должны сопровождаться тщательными pH-контролями. Мы также решили более внимательно изучить влияние кислотности буфера на специфический ответ Nurocrates, для чего проводили титрование очищенного белка при помощи NCT в растворах со значениями pH от 6.7 до 8.2. Несмотря на то, что максимальная амплитуда ответа незначительно падает в областях кислых и

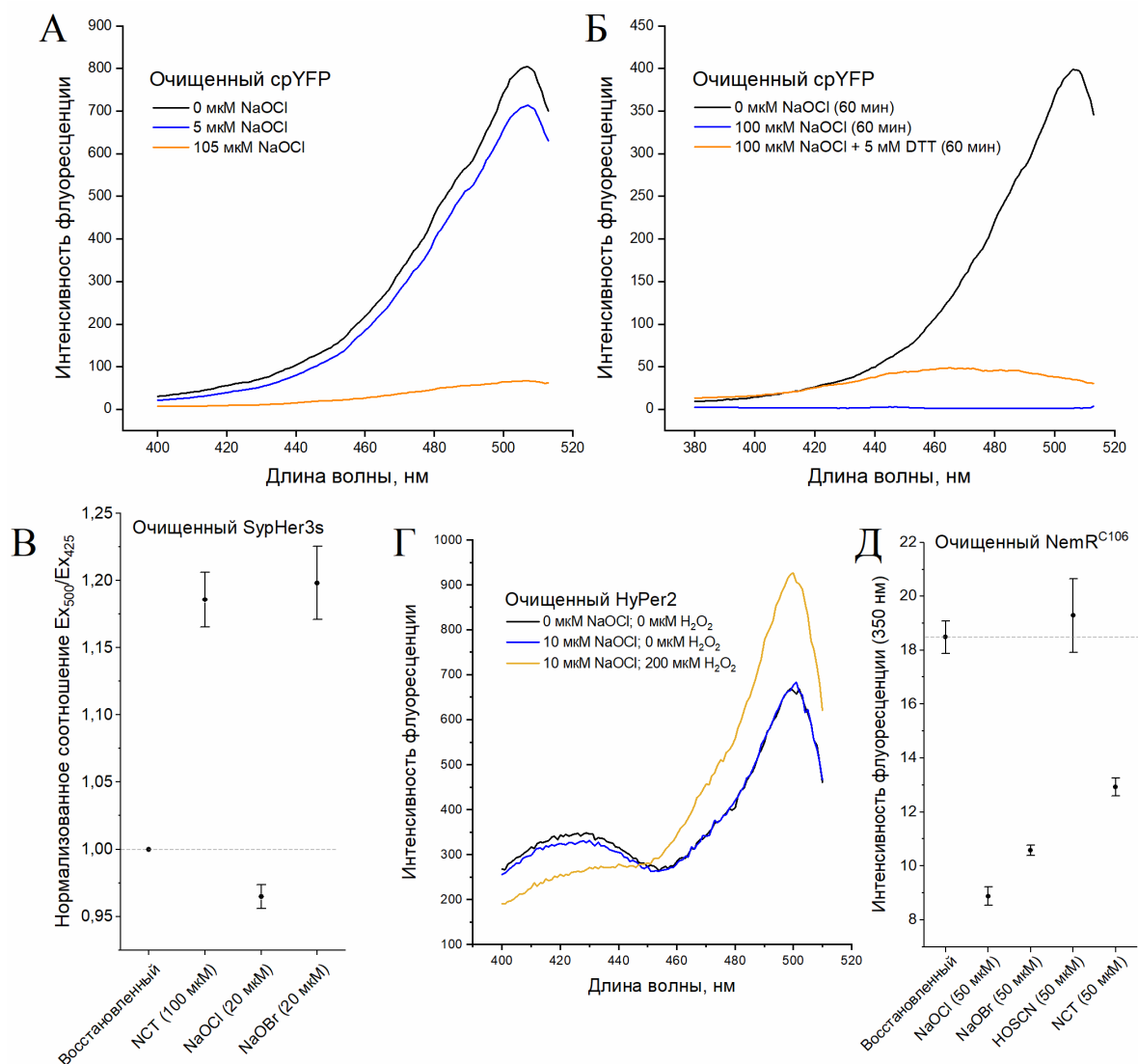
щелочных значений, можно с уверенностью утверждать, что разработанный нами инструмент подходит для использования в протестированных условиях.

Еще в ранних работах по описанию химических и физических свойств GFP было показано, что его оптические свойства зависят от температуры окружающей среды. Для оценки влияния обсуждаемого параметра на Hurocrates, мы зафиксировали его спектральные параметры до и после нагрева. Рост температуры приводит к сдвигам, которые напоминают окисление. Данный эффект сохраняется в условиях бактериальной цитоплазмы, свидетельствуя о том, что белковое окружение не оказывает никакого стабилизирующего воздействия. Важно отметить, что при 37°C максимальная амплитуда ответа инструмента снижается до 1.3 раза. Таким образом, в текущем виде Hurocrates не до конца оптимизирован для использования в теплокровных организмах.

## **2.6. Механизм функционирования Hurocrates.**

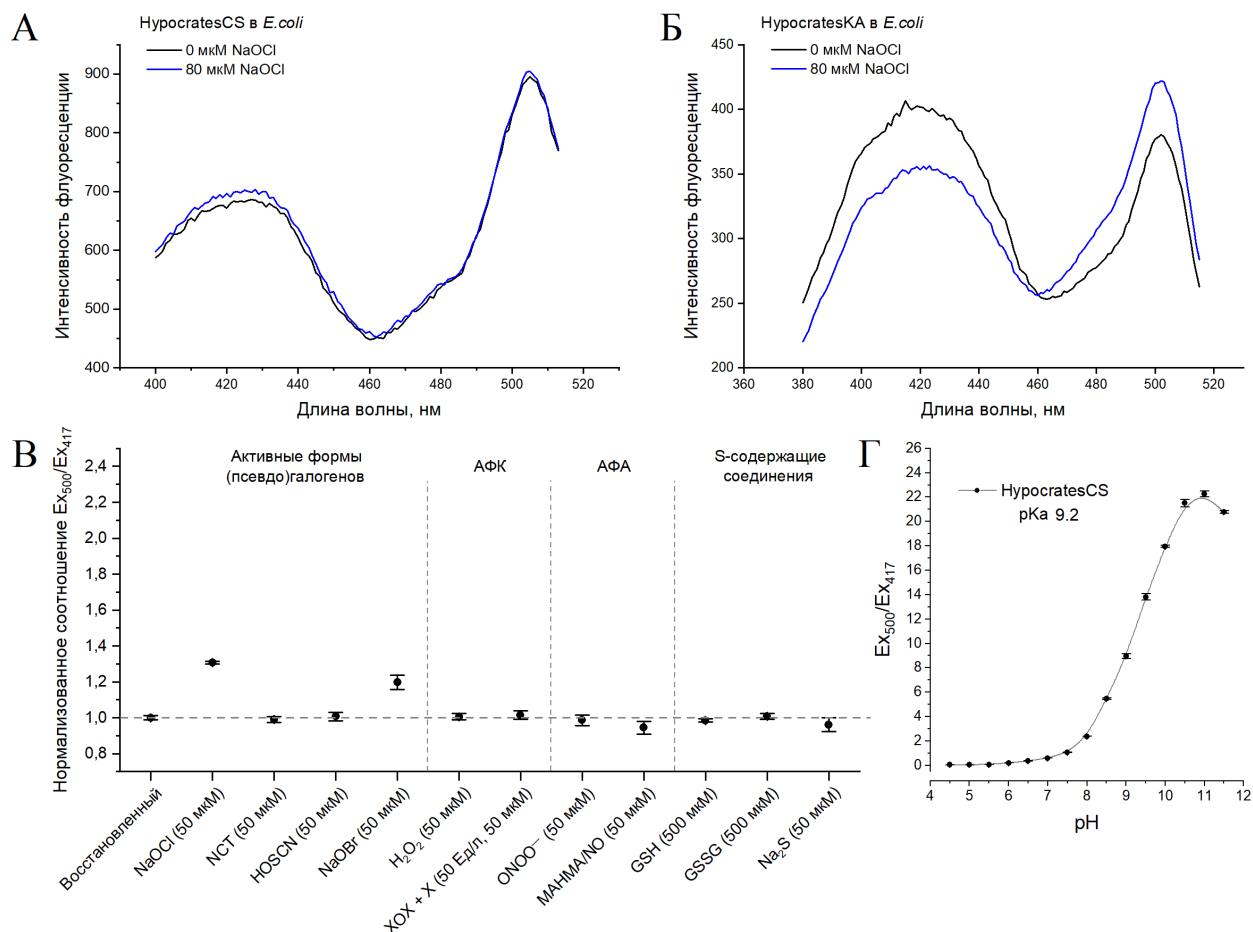
Важным этапом описания нового генетически кодируемого сенсора является установление конкретного молекулярного механизма, который лежит в основе его функционирования. В первую очередь, мы решили убедиться, что оптические сдвиги Hurocrates опосредованы взаимодействием активных форм галогенов с доменом, происходящим из NemR<sup>C106</sup>. Для этого мы обрабатывали очищенные препараты интактного *srYFP*, а также двух сенсоров на его основе (*SyrHer3s* и *HuPer2*) аликвотами NaOCl. В случае *srYFP* мы наблюдали падение интенсивности флуоресценции, которое не могло быть нивелировано под действием DTT (**Рис. 5А, Б**). Таким образом, мы можем заключить, что выгорание Hurocrates в присутствии высоких концентраций NaOCl и NaOBr, по всей видимости, связано, в первую очередь, с повреждением именно *srYFP*, но не NemR<sup>C106</sup>. Ни рН-индикатор *SyrHer3s*, ни сенсор на H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> *HuPer2* не демонстрировали каких-либо существенных спектральных сдвигов в ответ на воздействие гипохлорита (**Рис. 5В, Г**). Мы также показали, что, в то время как NaOCl, NaOBr и NCT вызывают значительное изменение сигнала, регистрируемого от остатка тирозина в составе NemR<sup>C106</sup>, HOSCN не оказывает никакого эффекта на тестируемый препарат (**Рис. 5Д**). Соответственно, способность чувствовать данный аналит является свойством, которое NemR<sup>C106</sup> приобрел в результате вставки *srYFP*.

Gray и соавторы установили, что способность NemR взаимодействовать с HOCl полагается на образование обратимой сульфенамидной связи между остатками Cys106 и Lys175. Для того, чтобы проверить участие соответствующих аминокислот в функционировании Hurocrates, мы получили мутантные версии сенсора, в которых обсуждаемые позиции заменены на реакционно-инертные группы. При экспрессии в бактериях, HurocratesCS (мутант Cys355Ser) не продемонстрировал ощутимых сдвигов в спектре возбуждения флуоресценции (**Рис. 6А**). Однако, поведение HurocratesKA (мутант Lys424Ala) не отличалось от исходного индикатора (**Рис. 6Б**). Таким образом, полученные нами данные позволяют заключить, что даже если в молекуле Hurocrates и образуется сульфенамидная связь под действием специфических аналитов, она не является необходимой для развития ответа. Интересно, что очищенный препарат HurocratesCS сохраняет некоторую чувствительность к NaOCl и NaOBr, но не к NCT и HOSCN (**Рис. 6В**). Это свидетельствует о том, что прямое воздействие агрессивных окислителей способно изменять конформацию сенсора даже в отсутствие Cys355. Тот факт, что мы не наблюдаем



**Рисунок 5.** (А) Высокие количества NaOCl приводят к выраженному выгоранию интактного cpYFP. (Б) Данные изменения оптических свойств не могут быть устранены обработкой восстанавливающими агентами. Другие сенсоры на основе cpYFP (pH-индикатор SypHer3s, В; индикатор пероксида водорода HyPer2, Г) не отвечают или слабо отвечают на активные формы галогенов. Концентрация белка во всех случаях составляла 500 нМ. На панели В данные представлены как среднее  $\pm$  SEM,  $n = 3$ . (Д) Изменение флуоресценции остатков триптофана NemR<sup>C106</sup> под действием NaOCl, NaOBr, HOSCN и NCT. Концентрация белка составляла 2 мкМ. Данные представлены как среднее  $\pm$  SEM,  $n \geq 2$ .

ответа CS-версии на NaOCl при экспрессии в бактериях, очевидно, связан с тем обстоятельством, что в цитоплазме клеток почти весь окислитель конвертируется во вторичные производные, которые не взаимодействуют с инструментом. В свете изложенной информации мы считаем, что HyProcatesCS может выступать в качестве контроля артефактов измерений, поскольку концентрации NaOCl, вызывающие насыщение HyProcates в бактериях, не приводят даже к слабому сдвигу оптических свойств CS-мутанта. Тем более, его  $pK_a$ , установленная путем pH-титрования, принимает значение 9.2, которое крайне близко к аналогичному параметру исходного сенсора (Рис. 6Г).

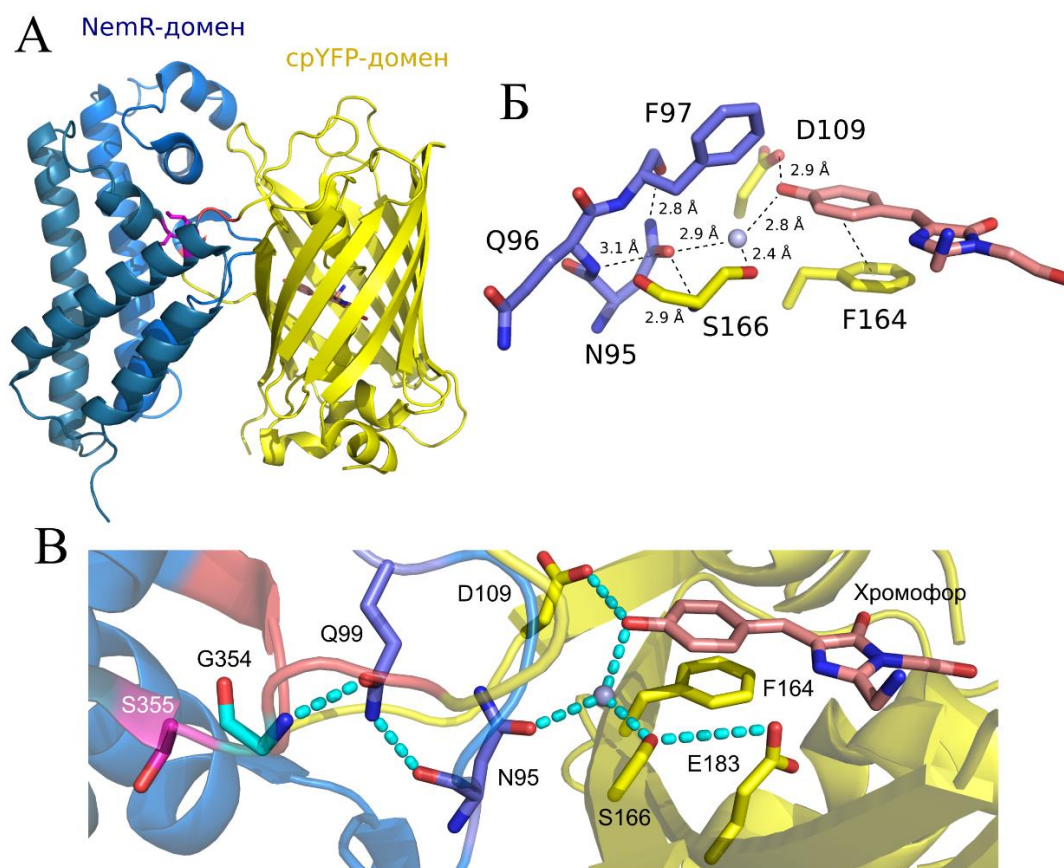


**Рисунок 6.** (А) Спектр возбуждения флуоресценции HurocratesCS устойчив к воздействию NaOCl в цитоплазме бактериальных клеток. (Б) Версия HurocratesKA отвечает на добавку NaOCl в условиях цитоплазмы бактериальных клеток. (В) Диаграмма селективности очищенного препарата HurocratesCS. Концентрация белка составляла 2 мкМ. NCT – N-хлоротаурин. XOХ – ксантиноксидаза. X – ксантин. GSH – восстановленный глутатион. GSSG – окисленный глутатион. АФК – активные формы кислорода. АФА – активные формы азота. Данные представлены как среднее  $\pm$  SEM,  $n \geq 3$ . (Г) Зависимость сигнала очищенного препарата HurocratesCS от pH буфера. Данные представлены как среднее  $\pm$  SEM,  $n = 3$ .

### 2.7. Расшифровка пространственной структуры HurocratesCS.

В литературе описано множество примеров, когда расшифровка пространственной структуры генетически кодируемых сенсоров позволяла установить механистические аспекты их функционирования и открывала путь для направленной оптимизации инструментов. Совместно с коллегами из лаборатории профессора Joris Messens (Брюссель, Бельгия) мы попытались получить структуры для Hurocrates в восстановленном и окисленном состояниях, а также для HurocratesCS. Лишь CS-версия образовывала орторомбические кристаллы (C2221,  $a = 90.242$ ,  $b = 95.447$ ,  $c = 106.278$ ,  $\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$ ), содержащие одну молекулу сенсора на асимметричную единицу, с достаточным качеством дифракции (разрешение 2.1 Å). Наложение структур NemR<sup>C106</sup> и сенсорного домена из HurocratesCS ярко демонстрирует схожесть пространственных организаций, характеризующуюся средним квадратичным отклонением 0.506 Å для 159 атомов. Таким образом, интеграция srYFP оказала лишь минимальный структурный эффект на общую укладку домена, происходящего из NemR (**Рис. 7А**).





**Рисунок 7.** Пространственная структура HucratesCS. (А) Общий вид укладки белка. Регионы, представленные остатками 1-7, 40-42 и 193-207, отсутствуют. (Б) Остаток Asn95 сопрягает сенсорный и репортерный домены индикатора через скоординированную молекулу воды. (В) Предполагаемый механизм сопряжения ключевого остатка Cys355 и хромофора. Голубой цвет – N-концевая часть NemR<sup>S106</sup>. Синий – С-концевая часть NemRS106. Желтый – cpYFP. Красный – линкеры. Розовый – ключевые остатки Ser355 и Lys424. Циановый – остов остатка Gly354. Голубая сфера отображает молекулу воды.

HucratesCS является вторым cpYFP-содержащим белком с расшифрованной пространственной структурой, а также первым редокс-сенсором на основе cpFP, для которого известна подобная информация. Asn95, расположенный на N-конце подвижной петли, представляет собой аминокислоту, которая химически сопрягает сенсорный домен индикатора с хромофорным окружением репортерного домена. Помимо этого, обсуждаемая позиция образует контакты с полипептидным остовом, принадлежащим Gln96 и Phe97, также расположенным вплотную к подвижному региону. Еще одним партнером Asn95 выступает Ser166 – консервативный остаток, участвующий в организации пути переноса протона в возбужденном состоянии (**Рис. 7Б**). Конформационные перестройки, происходящие в области подвижной петли под действием NaOCl, могут влиять на положение Asn95 и тем самым модулировать параметры его взаимодействия с хромофорным окружением. Рентгеноструктурные данные позволяют предполагать, что остов Asn95 образует водородную связь с боковой цепью Gln99, который, в свою очередь, взаимодействует с пептидной группой Gly354 (**Рис. 7В**). Интересно, что данная аминокислота находится в непосредственном контакте с ключевым остатком Cys355. В этом свете кажется привлекательной гипотеза о том, что описанная сеть водородных связей

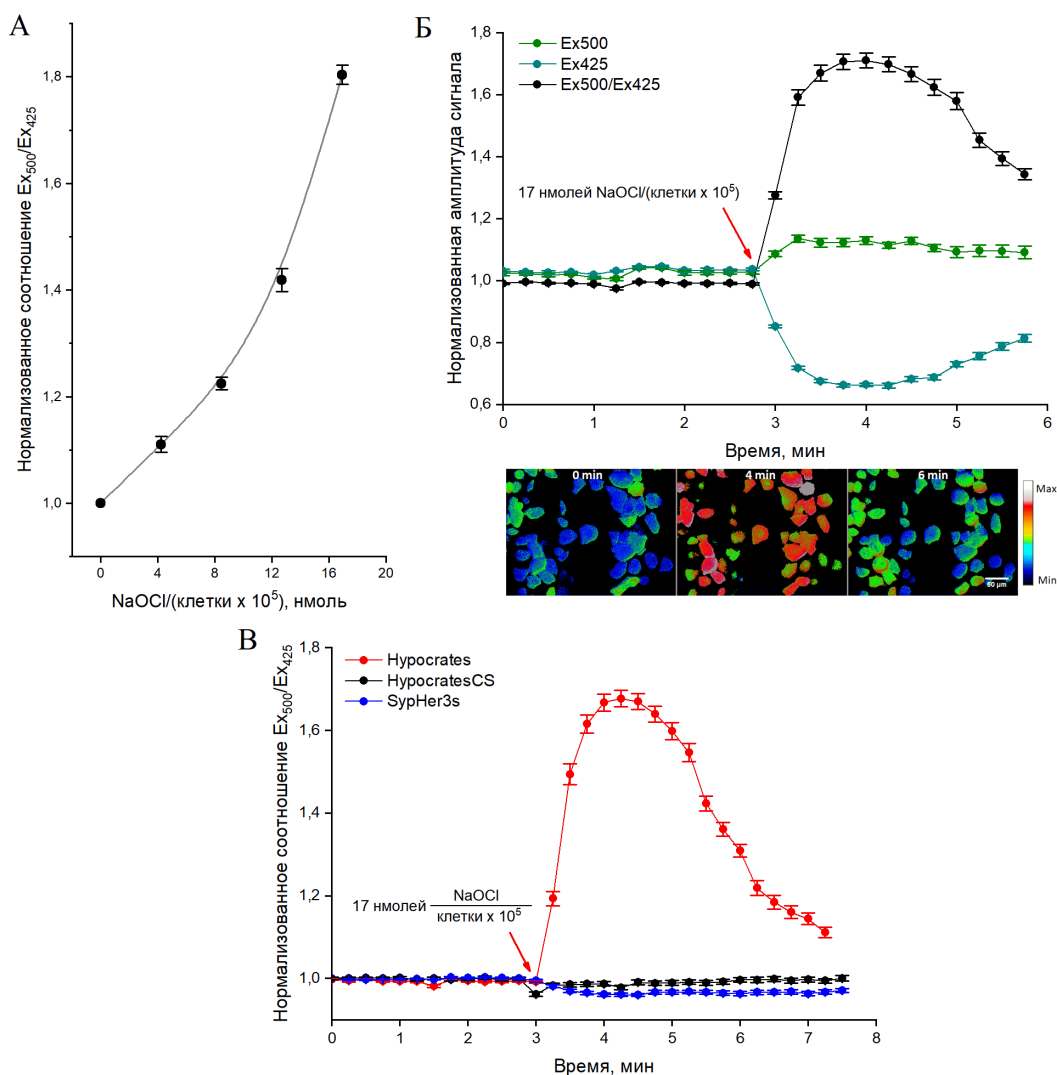
представляет собой путь передачи химической информации от сайта распознавания аналита до хромофора, отвечающего за генерацию оптического сигнала.

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

### **2.8. Тестирование Hurocrates в культурах эукариотических клеток.**

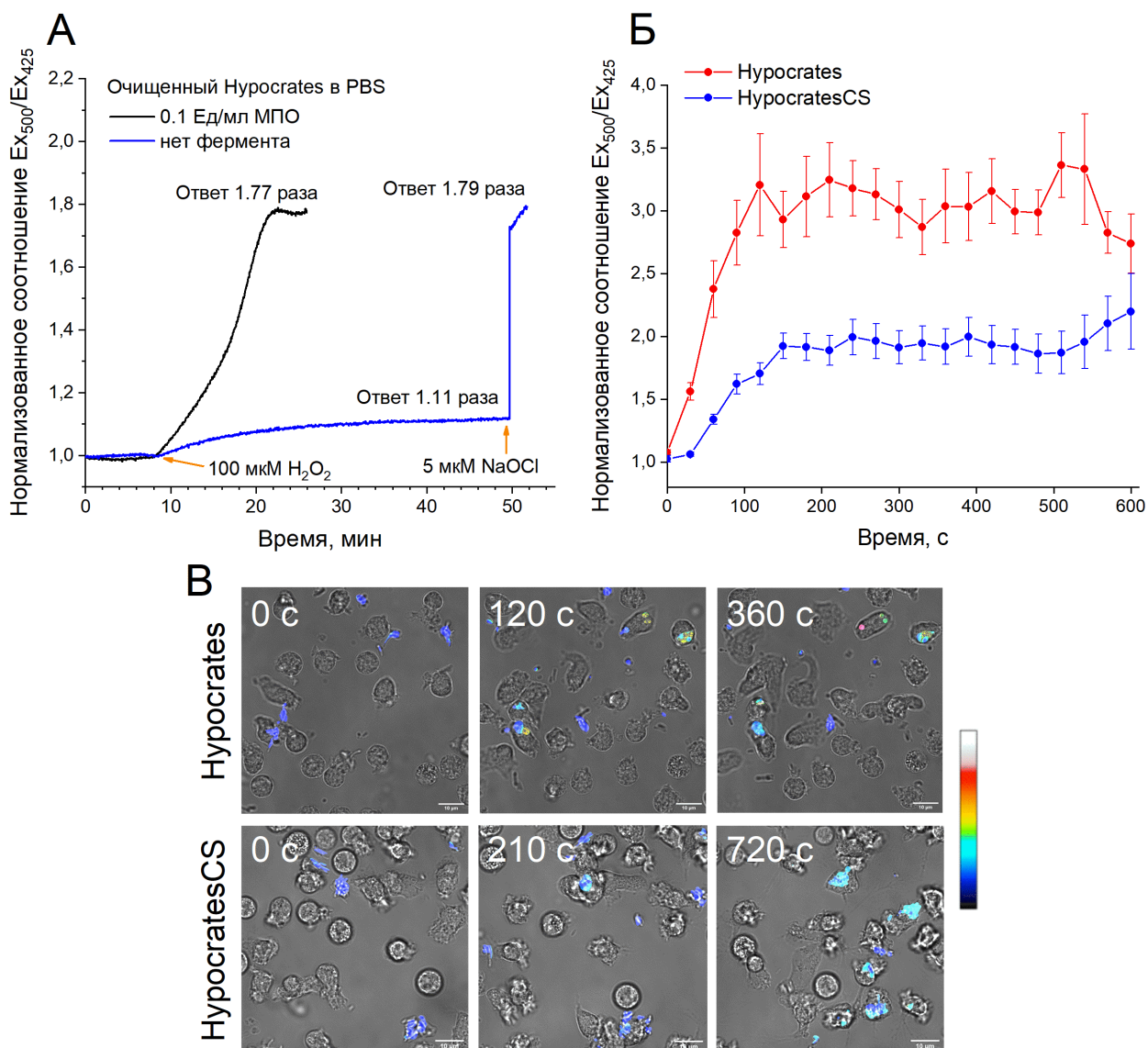
После детального описания основных биохимических свойств Hurocrates, мы решили проверить, является ли разработанный нами инструмент функциональным в эукариотических системах экспрессии. Для этого мы трансфецировали клетки линии HeLa Kyoto плазмидой, кодирующей сенсор, после чего подвергали их экзогенной добавке NaOCl. Минимальный достоверно детектируемый ответ мог быть обнаружен при воздействии NaOCl в количестве  $\sim 4.2$  нмоля/( $10^5$  клеток). Когда тестируемая величина достигала 17 нмолей/( $10^5$  клеток), амплитуда ответа возрастала до 1.8 раза (**Рис. 8А**). При более высоких концентрациях окислителя сигнал начинал падать за счет выраженного выгорания флуоресцентного домена. В эукариотических клетках ответ инструмента оказался обратимым. Уже через одну минуту после внесения добавки, спектр сенсора начинает возвращаться к исходному состоянию, свидетельствуя о том, что Hurocrates способен взаимодействовать с антиоксидантными системами клетки (**Рис. 8Б**). Мы также продемонстрировали, что индикатор пригоден для визуализации нескольких последовательных актов окисления и восстановления. Следует отметить, что в аналогичных экспериментах ни HurocratesCS, ни *SyrHer3s* не демонстрировали сдвигов в оптических свойствах (**Рис. 8В**). Это свидетельствует о том, что зарегистрированная нами динамика соответствует именно гипохлоритному стрессу.

Вообще, в физиологических условиях клетки едва ли сталкиваются с разовыми импульсами высоких концентраций HOCl. В большинстве случаев они испытывают на себе воздействие окислителя, возникающего в режиме плавной генерации активированными лейкоцитами. Поэтому мы решили проверить, пригоден ли Hurocrates для использования в моделях эндогенной продукции гипохлорита. В первую очередь мы сконцентрировались на *in vitro* системе, состоящей из миелопероксидазы,  $H_2O_2$  и хлорид-анионов (**Рис. 9А**). Мы показали, что сигнал сенсора начинает расти с первых моментов после внесения фермента, после чего постепенно выходит на плато с финальной амплитудой около 1.8 раза. Таким образом, несмотря на то, что в молекуле Hurocrates существует множество сайтов, способных взаимодействовать с HOCl, реакционной способности ключевого остатка Cys хватает для регистрации даже низких доз аналита. На следующем этапе работы мы перешли к модели фагоцитоза *E. coli*, экспрессирующих Hurocrates или его контрольную CS-версию, первичными нейтрофилами человека. Как только бактерия оказывалась в фагосоме лейкоцита, сигнал, регистрируемый от сенсора, начинал резко расти, после чего выходил на плато в среднем через две минуты (**Рис. 9Б, В**). Подобная динамика соответствует известным данным, опубликованным в литературе. Впрочем, важно отметить, что все они были получены при помощи куда менее селективных инструментов. Интересно, что в наших экспериментах HurocratesCS также демонстрировал ответ, однако, по амплитуде он



**Рисунок 8.** Тестирование Hurocrates на культуре клеток HeLa Kyoto. **(А)** Кривая титрования Hurocrates в цитоплазме клеток HeLa Кыто возрастающими концентрациями NaOCl. Данные представлены как среднее  $\pm$  SEM, N = 2 эксперимента, n  $\geq$  25 клеток на эксперимент. **(Б)** Изменение оптических параметров сенсора после разовой добавки NaOCl. Данные представлены как среднее  $\pm$  SEM, N = 2 эксперимента, n  $\geq$  30 клеток на эксперимент. Под графиком приведена раскадровка одного из экспериментов, где псевдоцвет соответствует соотношению Ex500/Ex425. **(В)** Сравнение сигналов Hurocrates, HurocratesCS и SypHer3s в цитоплазме клеток HeLa Kyoto в присутствии экзогенной добавки NaOCl. Данные представлены как среднее  $\pm$  SEM, N = 3 эксперимента для Hurocrates и HurocratesCS, N = 2 эксперимента для SypHer3s, n  $\geq$  28 клеток на эксперимент.

был заметно меньше, чем аналогичный параметр исходного белка. Одно из объяснений заключается в том, что продукция гипогалогенных кислот в нейтрофилах оказывается настолько интенсивной, что они не успевают конвертироваться во вторичные производные и взаимодействуют с CS-мутантом напрямую, как это происходит в условиях *in vitro*. С другой стороны, известно, что показатель pH фагосомы меняется по мере ее созревания. Таким образом, можно предположить, что динамика HurocratesCS по большей части соответствует защелачиванию среды. В целом, мы можем с уверенностью заключить, что разработанный нами сенсор подходит для визуализации эндогенной продукции (псевдо)гипогалогенных кислот и их производных. В частности, он может быть



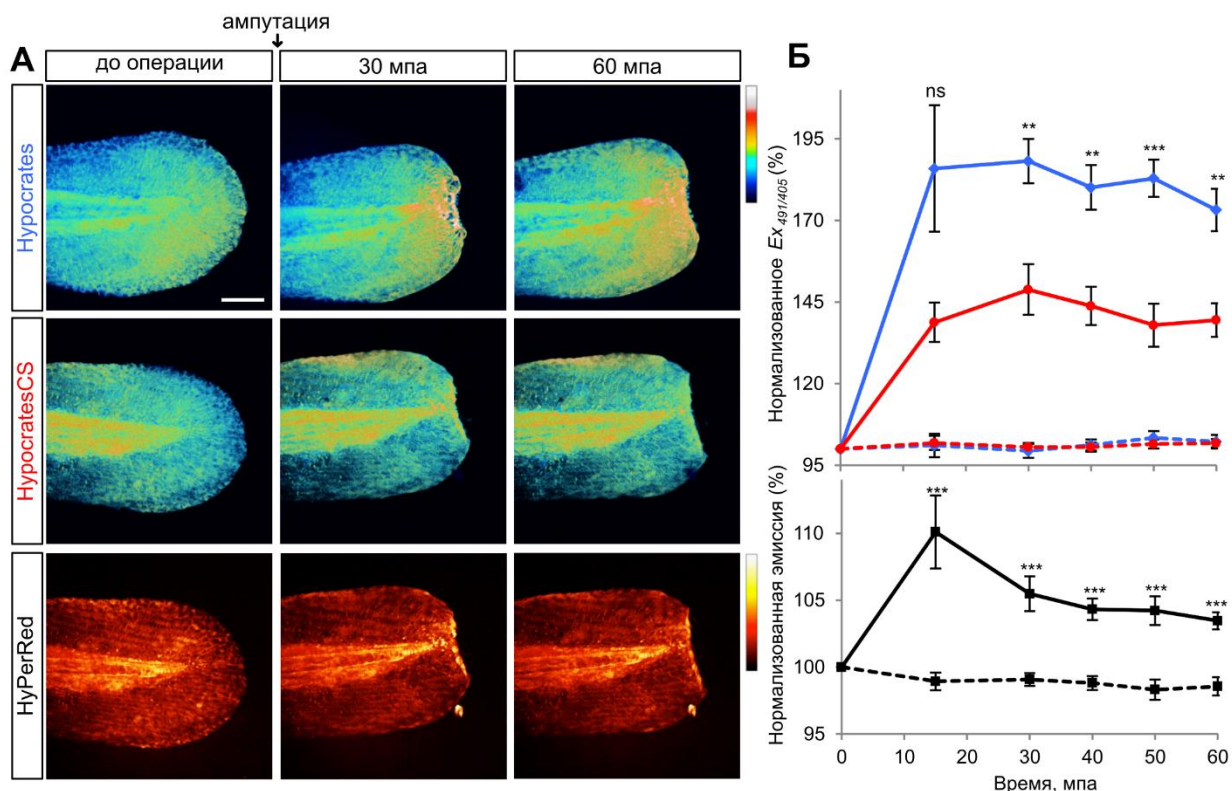
**Рисунок 9.** (А) Временная динамика сигнала очищенного препарата *Hypocrates* в присутствии системы миелопероксидаза- $H_2O_2$ , а также исключительно  $H_2O_2$  без фермента. Концентрация белка составляет 500 мкМ. (Б) Динамика сигналов *Hypocrates* и *HypocratesCS* в цитоплазме бактериальных клеток, фагоцитируемых первичными нейтрофилами человека. Нулевая точка графика соответствует одному кадру до момента фагоцитоза. Данные представлены как среднее  $\pm$  SEM,  $N = 3$  эксперимента,  $n = 35$  клеток. (В) Раскадровки избранных экспериментов, где псевдоцвет соответствует соотношению  $Ex_{500}/Ex_{425}$ .

задействован в высокопроизводительных скринингах, направленных на поиск химических агентов, модулирующих метаболизм нейтрофилов, или же в работах, направленных на изучение взаимодействия патогенных бактерий и иммунной системы.

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

В 2009 году Niethammer и коллеги проверяли гипотезу о том, что  $H_2O_2$  может работать как паракринный регулятор в организме позвоночного, как это происходит у растений в ходе развития ксилемы. При помощи генетически кодируемого сенсора *HuPer*





**Рисунок 10.** (А) Визуализация динамики (псевдо)гипогалогенных кислот и пероксида водорода в модели ампутации хвостового плавника *D. rerio*. Флуоресцентные изображения регистрировали до операции, после чего продолжали съемку вплоть до 60 минут после ампутации (мпа). Псевдоцвета соответствуют сигналам сенсоров. (Б) Временная динамика сигналов Hypocrates, HypocratesCS и HyPerRed. Сигналы нормализовали относительно средних значений, зарегистрированных на первых кадрах съемки. Сплошные линии соответствуют экспериментальным малькам, подвергнутым операции. Пунктирные линии соответствуют контрольным малькам (без ампутации). Синий цвет – Hypocrates, красный цвет – HypocratesCS, черный цвет – HyPerRed. Для проверки статистической значимости наблюдаемых различий использовали двухфакторный дисперсионный анализ, а также тест Тьюки. Данные представлены как среднее  $\pm$  SEM, N=4 эксперимента,  $n \geq 3$  эмбриона (для Hypocrates и HypocratesCS). Данные представлены как среднее  $\pm$  SEM, N=3 эксперимента,  $n \geq 7$  эмбрионов (для HyPerRed). Для Hypocrates статистическую значимость проверяли относительно HypocratesCS. Для HyPerRed статистическую значимость проверяли относительно контрольных эмбрионов. \*\* соответствует  $P < 0.01$ , \*\*\* соответствует  $P < 0,001$ , ns соответствует отсутствию статистической значимости.

авторам удалось убедительно продемонстрировать, что в модели ампутации хвостового плавника *D. rerio* редокс-стресс наступает раньше, чем лейкоциты успевают прибыть в область раны. Аккуратные эксперименты, проведенные с участием ингибиторов ферментов и РНК-интерференции, свидетельствовали о том, что источником  $H_2O_2$  служит DUOX из эпителиальных клеток. Более того, в тех условиях, когда работа белка была нарушена, нейтрофилы переставали мигрировать в сторону повреждения. В последующие годы несколько публикаций поднимали вопрос того, какие факторы влияют на пространственно-временную динамику пероксида в обсуждаемой модели. В частности, при помощи косвенных методов Pase и коллеги предположили, что миелопероксидаза из лейкоцитов, прибывающих в область раны, использует  $H_2O_2$  в качестве субстрата и тем самым разрушает его градиент. Однако, работы, которые бы убедительно демонстрировали

подобную конверсию пероксида водорода в (псевдо)гипогалогенные кислоты, до сих пор отсутствуют. Таким образом, мы поставили перед собой задачу пролить свет на описанную проблему при помощи разработанного нами сенсора.

Необходимые эксперименты были проведены совместно с нашими коллегами из лаборатории профессора Sophie Vriz (Париж, Франция). Для того, чтобы одновременно следить за динамикой  $H_2O_2$  и (псевдо)гипогалогенных кислот мы экспрессировали Нурocrates/НурocratesCS и НурPerRed в тканях мальков *D. rerio*. Далее, мы проводили ампутацию хвостового плавника и визуализировали сигналы, поступающие от сенсоров, в режиме широкопольной флуоресцентной микроскопии (**Рис. 10**). Зарегистрированный пик продукции пероксида водорода приходился на 15-ую минуту съемки, что соответствует данным Niethammer и соавторов. Степень (псевдо)гипогалогенного стресса достигала максимальной амплитуды к тому же моменту времени, однако, демонстрировала иную динамику в дальнейшем. В то время как ответ НурPerRed постепенно снижался, сигнал Нурocrates оставался стабильным в течение всего эксперимента. Следует отметить, что сигнал НурocratesCS также возрастал, однако, в меньшей мере, и статистические тесты подтверждают наличие достоверной разницы. Таким образом, нам удалось подтвердить предположения Pase и доказать, что при ампутации хвостового плавника *D. rerio* область раны является очагом генерации НОС1 и/или родственных соединений. При этом наблюдаемый (псевдо)гипогалогенный стресс оказывается достаточно устойчивым во времени.

## ВЫВОДЫ.

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

## СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ.

### Статьи в рецензируемых журналах:

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

### Выступления на конференциях:

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