

Учреждение российской академии наук
Институт биоорганической химии
им. академиков М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова РАН

на правах рукописи

Мишина Наталия Михайловна

**ИССЛЕДОВАНИЕ СИГНАЛЬНОЙ ФУНКЦИИ
ПЕРОКСИДА ВОДОРОДА С ПОМОЩЬЮ ГЕНЕТИЧЕСКИ КОДИРУЕМЫХ
ФЛУОРЕСЦЕНТНЫХ ИНДИКАТОРОВ**

специальность – 03.01.03 – молекулярная биология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание учёной степени

кандидата биологических наук

Москва 2011

Работа выполнена в лаборатории молекулярных технологий Института биоорганической химии им. академиков М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова РАН

Научный руководитель:

кандидат биологических наук Всеволод Вадимович Белоусов

Официальные оппоненты:

Зарайский Андрей Георгиевич, доктор биологических наук, заведующий лабораторией молекулярных основ эмбриогенеза Института биоорганической химии имени академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН.

Минин Александр Александрович, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник группы клеточной биологии Института белка РАН.

Ведущая организация:

Институт физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова

Защита состоится 26 октября 2011 г. в 10:00 на заседании диссертационного совета Д.002.019.01 при Институте биоорганической химии им. академиков М.М.Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН по адресу: 117871, ГСП-7, Москва В-437, ул. Миклухо-Макля, д. 16/10.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН.

Автореферат разослан «23» сентября 2011 г.

Учёный секретарь диссертационного совета,

доктор физико-математических наук



В. А. Олейников

ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. За последние годы представления о роли активных форм кислорода (АФК) в регуляции внутриклеточных процессов существенно расширились. Показано участие АФК в регуляции клеточной пролиферации, миграции, дифференцировки, а также экспрессии генов. АФК играют важную роль в таких процессах, как иммунные реакции, эмбриогенез, разнообразные патологии на организменном уровне.

Из всех АФК только пероксид водорода (H_2O_2) обладает всеми необходимыми свойствами для выполнения функции вторичного мессенджера, действуя путем специфичного обратимого окисления редокс-активных тиоловых групп в остатках цистеинов некоторых белков.

Предполагают, что внутриклеточные сигнальные эффекты H_2O_2 осуществляются в соответствии с моделью компартиментализованной окислительно-восстановительной передачи сигнала, когда белок-мишень и источник H_2O_2 находятся в непосредственной близости друг от друга. Однако до сих пор оставалось не известным, какие именно внутриклеточные мембранные компартменты ответственны за продукцию H_2O_2 при активации сигнальных каскадов.

Благодаря появлению генетически кодируемых индикаторов на основе флуоресцентных белков стало возможным исследовать сигнальную роль H_2O_2 на уровне индивидуальных живых клеток. Особый научно-практический интерес представляет возможность использования таких индикаторов для изучения внутриклеточной локальной продукции и динамики изменения концентрации H_2O_2 , что ранее представлялось невозможным из-за отсутствия адекватных методов.

Ввиду растущей значимости исследования сигнальных каскадов с участием H_2O_2 разработка новых подходов использования генетически кодируемых индикаторов представляется актуальной задачей. Не менее важным является изучение базовых принципов организации окислительно-восстановительной передачи сигнала в клетке.

Продукция H_2O_2 специализированными ферментативными системами является частью сложных сигнальных каскадов, в которых задействовано множество ферментов и вторичных мессенджеров. Так, например, окислительно-восстановительная передача сигнала тесно взаимосвязана с продукцией липидных мессенджеров – фосфорилированных форм фосфатидилинозитола. Поэтому важной задачей является разработка методов одновременной регистрации активностей нескольких сигнальных систем в одной клетке.

Нарушения нормальной внутриклеточной продукции H_2O_2 связаны с тяжелыми нейродегенеративными и сосудистыми заболеваниями, с патологиями иммунной системы. Таким образом, понимание функций эндогенного H_2O_2 в клеточных процессах важно как для фундаментальных исследований процессов внутриклеточной передачи сигнала, так и для биомедицинских исследований.

Цель и задачи работы. Целью данной работы было изучение внутриклеточной локализации и динамики изменения концентрации H_2O_2 в различных цитоплазматических субкомпартаментах клетки при активации сигнальных каскадов. В рамках сформулированной цели были поставлены следующие задачи:

1. Создать флуоресцентные индикаторы на основе биосенсора $HuPer$ с локализацией в различных цитоплазматических субкомпартаментах клетки.
2. Исследовать с помощью полученных индикаторов локализацию и динамику изменения уровня эндогенного H_2O_2 в ответ на активацию тирозинкиназных рецепторов.
3. Создать генетически кодируемый флуоресцентный индикатор для одновременной детекции H_2O_2 и активности фосфатидилинозитол-3'-киназы для использования в многопараметрической флуоресцентной микроскопии сигнальных процессов в живой клетке.

Научная новизна и практическая ценность работы. Предложен новый подход к исследованию распределения и динамики изменения концентрации H_2O_2 в различных цитоплазматических субкомпартаментах живой клетки с помощью вариантов белка-индикатора $HuPer$. Используя данный подход, удалось впервые визуализировать локальную продукцию H_2O_2 в индивидуальных живых клетках в ответ на физиологическую стимуляцию ростовыми факторами. Полученные данные подтверждают гипотезу компарментализованной окислительно-восстановительной сигнализации, а также позволяют лучше понять роль H_2O_2 в клетках в нормальном физиологическом состоянии. Разработан и оптимизирован генетически кодируемый флуоресцентный индикатор, позволяющий одновременно следить за изменением концентраций H_2O_2 и фосфатидилинозитол-3,4,5-фосфата. Показано, что полученный «двойной» индикатор $VtkPH-E41K-HuPer$ можно использовать для прижизненной многопараметрической визуализации внутриклеточных процессов с помощью флуоресцентной микроскопии. С помощью $VtkPH-E41K-HuPer$ удалось впервые зарегистрировать локальную продукцию H_2O_2 и активацию фосфатидилинозитол-3'-киназы при формировании иммунологического синапса в $CD4^+$ T_H -лимфоцитах. Полученный индикатор может быть использован в качестве прототипа для разработки других многопараметрических биосенсоров, что в дальнейшем позволит расширить возможности использования флуоресцентных индикаторов в фундаментальных и прикладных биомедицинских исследованиях.

Структура диссертации. Диссертационная работа изложена на 110 страницах и состоит из введения, обзора литературы, экспериментальной части, результатов и их обсуждения, выводов и списка цитируемой литературы, включающего 225 ссылок. Диссертация содержит 32 рисунка и 3 таблицы.

Апробация работы. Работа прошла апробацию на Международной Конференции в честь 75-летия со дня рождения академика Ю.А. Овчинникова (Москва, 2009), на школе-

семинаре по проблемам организации внутриклеточного транспорта, цитоскелета и путей передачи сигнала (Санкт-Петербург, 2009), на XXIII Международной зимней молодежной научной школе «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии» (Москва, 2011), а также на международном EMBO|EMBL Симпозиуме «Seeing is Believing – Imaging the Processes of Life» (Гейдельберг, Германия, 2011).

Публикации. По материалам диссертации опубликовано четыре статьи в рецензируемых журналах.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

1. Динамика продукции H_2O_2 в отдельных внутриклеточных компартментах в процессе активации тирозинкиназных рецепторов

Ростовые факторы стимулируют клеточный ответ через активацию тирозинкиназных рецепторов (ТКР), локализованных на плазматической мембране (ПМ). Связывание ростового фактора приводит к олигомеризации рецептора и активации его тирозинкиназного домена и последующей индукции каскадов фосфорилирования. ТКР, связанные с лигандом, как правило, интернализуются в составе эндосомы и далее либо деградируют, либо рециклируются обратно на плазматическую мембрану. Протеиновые тирозинфосфатазы (РТР – от Protein Tyrosine Phosphatase) ответственны за терминацию передачи сигнала путем дефосфорилирования активного ТКР. Так как большинство РТР конститутивно активны в клетке, для успешного прохождения каскадов фосфорилирования важным условием является ингибирование РТР. Эндогенный H_2O_2 участвует в контроле активности РТР через реакцию обратимого окисления тиолатов в активных центрах этих ферментов. В результате, временная инактивация РТР смещает динамическое равновесие фосфорилирования/дефосфорилирования ТКР в сторону реакции фосфорилирования.

Тирозинфосфатаза РТР-1В отвечает за дефосфорилирование многих активированных ТКР, в том числе рецепторов эпидермального фактора роста (EGFR – от Epidermal Growth Factor Receptor) и тромбоцитарного фактора роста (PDGFR – от Platelet-Derived Growth Factor Receptor). РТР-1В локализуется на цитоплазматической стороне эндоплазматического ретикулума (ЭПР) с помощью С-концевого домена, заякоренного в мембране ЭПР. РТР-1В дефосфорилирует EGFR и PDGFR в участках контакта ЭПР с мембранами, содержащими активированный рецептор, и таким образом терминирует сигнальный каскад. Несмотря на то, что инактивация РТР-1В пероксидом водорода была показана *in vivo* и *in vitro*, механизм окисления этого фермента и других РТР остается загадкой. Не ясно, как РТР, которые имеют константу скорости реакции с пероксидом водорода $10 - 10^3 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, способны эффективно конкурировать с пулом пероксиредоксинов (Prx), белков-антиоксидантов, реагирующих с H_2O_2 с константой скорости $10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$.

В настоящий момент для решения этого парадокса предложена модель компартиментализованной окислительно-восстановительной сигнализации. Эта модель предполагает, что тиолаты белка-мишени (например, РТР) окисляются H_2O_2 , продуцированным ферментами, находящимися в том же внутриклеточном компартменте, что и белок-мишень. В таком случае, локальная концентрация H_2O_2 может быть настолько высока, что позволит полностью окислить окружающие Ргх, а вслед за ними и остальные мишени. Однако предложенная модель требует экспериментального подтверждения. Для определения локализации активированных NADPH-оксидаз, продуцирующих H_2O_2 , существенным является наблюдение в реальном времени за динамикой H_2O_2 в различных внутриклеточных компартментах в ходе активации ТКР каскадов в живой клетке. Эндосомы, ПМ и мембрана ЭПР потенциально могут быть местом продукции H_2O_2 , так как известно, что каждый из этих субкомпарментов содержит NADPH-оксидазы.

До настоящего времени детекция продукции АФК в клетке осуществлялась с применением необратимо взаимодействующих с АФК красителей. Однако такие методы имеют ряд ограничений, не позволяющих наблюдать за динамикой продукции АФК в отдельной живой клетке. С другой стороны, продукция H_2O_2 в клетке может быть эффективно детектирована с помощью генетически кодируемых флуоресцентных белков-сенсоров. Преимуществами генетически кодируемых сенсоров на основе GFP являются обратимый ответ, низкая токсичность для клеток, возможность локализации в различных внутриклеточных компартментах. Так, биосенсор НуPer, созданный ранее в нашей лаборатории, позволяет с высокой специфичностью детектировать субмикромольные концентрации H_2O_2 в клетке.

НуPer представляет собой химерный флуоресцентный белок, состоящий из чувствительного к H_2O_2 и флуоресцентного доменов. Входящий в состав НуPer регуляторный домен транскрипционного фактора *E. coli* OxyR (OxyR-RD) содержит в активном центре два цистеиновых остатка, образующих под действием H_2O_2 дисульфидную связь, приводящую к изменению конформации всего домена. OxyR-RD обладает высокой селективностью к H_2O_2 , в отсутствие H_2O_2 дисульфидная связь быстро восстанавливается тиол-восстанавливающими системами клетки, происходит реактивация НуPer. Флуоресцентный домен НуPer представляет собой вариант жёлтого флуоресцентного белка cpYFP с двумя пиками поглощения (420 нм и 500 нм) и эмиссией при 510 нм. cpYFP интегрирован в OxyR-RD с помощью двух коротких полипептидных линкеров. Образование дисульфидной связи в OxyR-RD под действием H_2O_2 приводит к изменению соотношения двух пиков поглощения cpYFP: интенсивность поглощения хромофора cpYFP при 500 нм (F500) растёт пропорционально уменьшению поглощения при 420 нм (F420). Сигнал НуPer определяют как отношение двух величин F500/F420, поэтому он не зависит от уровня экспрессии сенсора в клетке.

Однако пространственное разрешение метода с использованием НуPer не позволяет детектировать локальные повышения концентрации H_2O_2 в клетке, так как из-за быстрой диффузии биосенсора в цитоплазме происходит «размывание» сигнала (Рис.1).

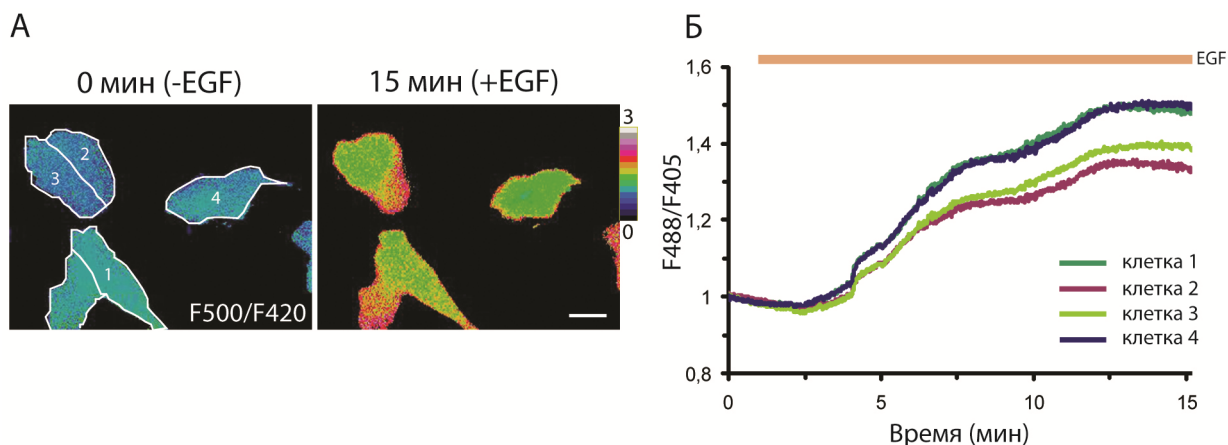


Рис. 1. Продукция H_2O_2 в клетках линии HeLa-Kyoto в ответ на стимуляцию EGF.

(А) Микрофотографии представляют распределение сигнала HyPer (F500/F420) в клетках линии HeLa-Kyoto, экспрессирующих *pHyPer-cyto*. Первое изображение соответствует нулевой точке до добавления EGF, второе изображение демонстрирует те же клетки через 15 мин после добавления EGF. Границы клеток на первом изображении обведены. Масштабная линейка: 15 мкм. Шкала цветов отражает отношение F500/F420 (чёрный-0; белый-3).

(Б) Графики отражающие изменение концентрации H_2O_2 в отмеченных клетках на микрофотографии А. EGF добавлен через 1 мин.

В данной работе для увеличения пространственного разрешения сигнала биосенсора HyPer был локализован в пределах нескольких субкомпарментов цитоплазмы живой клетки. Мы предположили, что продукция H_2O_2 в клетке должна колокализироваться либо с активированным рецептором, либо с РТР-1В, либо с обоими белками. Мы поставили перед собой задачу создать конструкции, позволяющие локализовать биосенсор HyPer на цитоплазматической стороне плазматической, ретикулярной и эндосомальной мембран, т.е. в тех же субкомпартаментах, в которых локализованы основные участники ТКР сигнализации. В качестве экспериментальной модели в данной работе был использован процесс активации тирозинкиназных каскадов в клетках линий HeLa-Kyoto и NIH-3T3 в ответ на стимуляцию факторами роста EGF и PDGF, соответственно.

1.1. Динамика продукции H_2O_2 вблизи плазматической мембраны и эндосом при активации тирозинкиназных рецепторов в живой клетке

Создание сенсора EGFR-HyPer

Для локализации биосенсора HyPer на ПМ и мембране эндосом была создана генетическая конструкция, кодирующая химерный белок, в котором С-конец EGFR через короткий линкерный полипептид связан с N-концом HyPer. Данная конструкция была создана на основе ранее опубликованной конструкции *pEGFR-YFP*. С помощью методов молекулярного клонирования в исходном векторе *pEGFR-YFP* нуклеотидная

последовательность, кодирующая YFP, была заменена на нуклеотидную последовательность, кодирующую биосенсор HyPer (Рис. 2А).

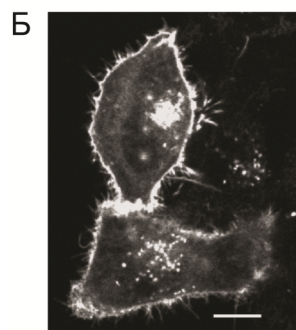


Рис. 2. Схема белка EGFR-HyPer (А) и его внутриклеточная локализация (Б) в клетках линии HeLa-Kyoto после 3 часов инкубации в бессывороточной среде. Масштабная линейка – 10 мкм.

Полученная генетическая рекомбинантная конструкция *pEGFR-HyPer* была экспрессирована в клетках линии HeLa-Kyoto. После продолжительной инкубации в бессывороточной среде в течение 2-4 часов флуоресцентный сигнал в клетках был локализован преимущественно на ПМ (Рис. 2Б). HyPer в составе химерного белка сохранял свойства биосенсора и реагировал на добавление экзогенного H_2O_2 ростом соотношения F500/F420.

Исследование динамики продукции H_2O_2 с помощью химерного белка EGFR-HyPer в клетках линии HeLa-Kyoto

Клетки линии HeLa-Kyoto, экспрессирующие *pEGFR-HyPer*, перед экспериментом инкубировали в бессывороточной среде в течение 2-4 часов. При инкубации в бессывороточной среде в клетках приостанавливаются основные сигнальные процессы. В ходе микроскопии таких клеток в ответ на стимуляцию ростовым фактором EGF, в течение 10 минут наблюдали перераспределение флуоресцентного сигнала с ПМ в цитоплазматические гранулы, что соответствует процессу интернализации активированного тирозинкиназного рецептора в составе эндосом (Рис. 3А). Необходимо отметить, что в то же время в этих клетках часть флуоресцентного сигнала оставалась на ПМ, что отражало фракцию неинтернализованного рецептора. При анализе полученных изображений мы обнаружили, что существенный рост уровня H_2O_2 происходил в эндосомальной фракции и начинался через 7-10 минут после стимуляции клеток EGF. Рост концентрации H_2O_2 выходил на плато в течение следующих 5-10 мин, после чего начиналась вторая волна продукции H_2O_2 (Рис. 3В).

Однако, в то же время фракция биосенсора, которая осталась на ПМ, демонстрирует падение отношения F500/F420, то есть HyPer становится более восстановленным. Этот процесс может быть связан либо с терминацией продукции H_2O_2 на ПМ, либо с транслокацией H_2O_2 -продуцирующей системы из ПМ в мембраны эндосом.

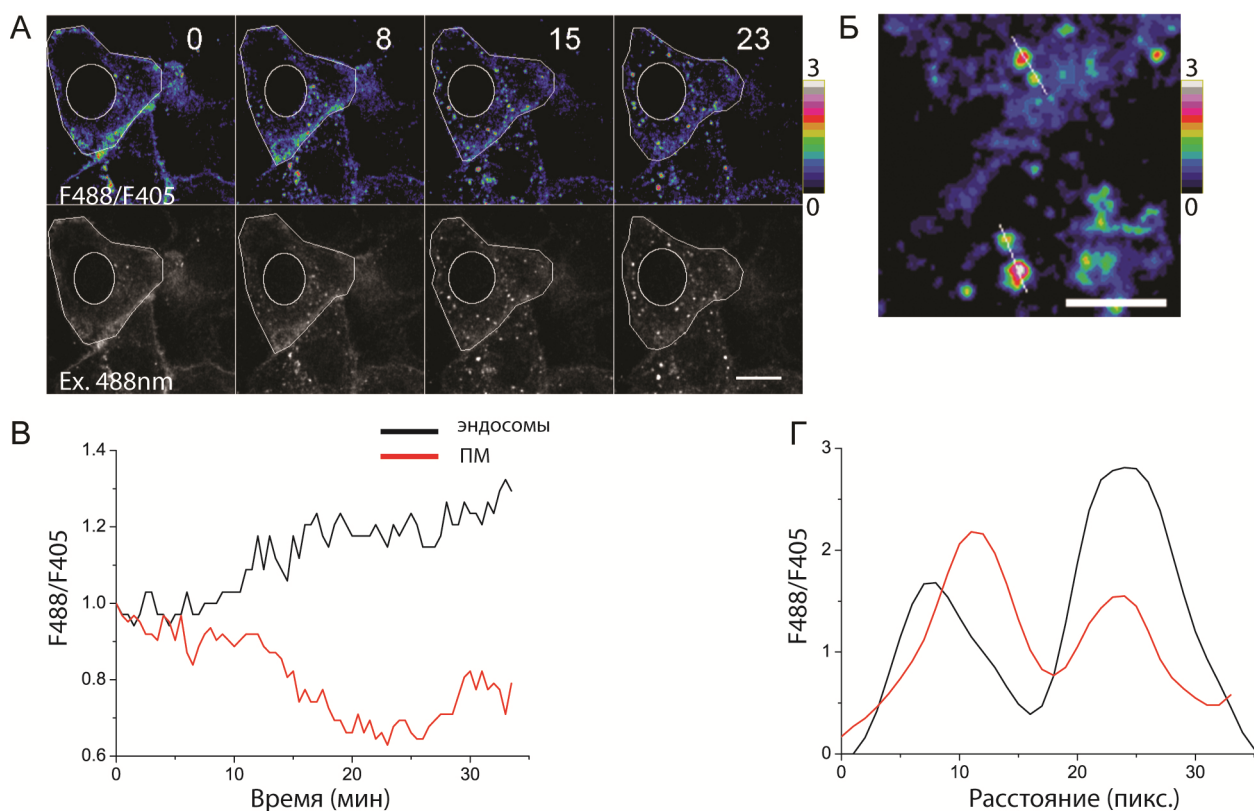


Рис. 3. Динамика изменения внутриклеточной концентрации H_2O_2 в ответ на стимуляцию EGF.

(А) Серия конфокальных изображений клеток линии HeLa-Kyoto, экспрессирующих *pEGFR-HyPer*. Клетки стимулированы EGF (50 нг/мл) в начальный момент серии (0 мин), соответствующие временные точки в минутах отмечены на каждом изображении. Верхний ряд серии изображений представляет внутриклеточное распределение отношения F500/F420. Нижний ряд серии изображений представляет внутриклеточное распределение флуоресцентного сигнала EGFR-HyPer (в канале с возбуждением флуоресценции при 488 нм). Границы и ядро одной из клеток обведены. Масштабная линейка: 15 мкм. Шкала цветов отражает отношение F500/F420 (чёрный-0; белый-3).

(Б) Конфокальное рациометрическое изображение выделенной внутриклеточной области, содержащей интернализированный EGFR-HyPer. Интенсивность сигнала вдоль линий показана на графике (Г). Масштабная линейка: 5 мкм.

(В) Графики, отражающие изменение концентрации H_2O_2 на ПМ (красный) и эндосомах (черный) клеток, изображенных на панели (А).

(Г) Распределение отношения F500/F420 сигналов HyPer вдоль верхней (красный) и нижней (черный) линий, отмеченных на изображении (Б).

Можно предположить, что эндосомы, содержащие интернализированный рецептор, являются компартментом, ответственным за генерацию H_2O_2 . Добавление дифенилениодониума (DPI), ингибитора NADPH-оксидазы, в концентрации 5 мкМ, приводило к быстрому снижению продукции H_2O_2 , что свидетельствует о NADPH-оксидазе как о наиболее вероятном источнике АФК в эндосомах (Рис. 4).

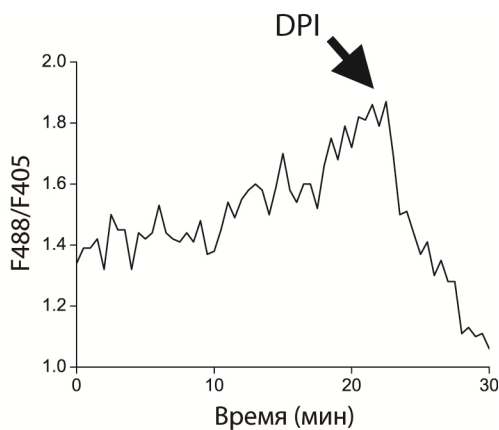


Рис. 4. DPI ингибирует продукцию H_2O_2 на мембране эндосом, содержащих интернализированный рецептор. График, отражающий изменение концентрации H_2O_2 вблизи мембран эндосом, содержащих интернализированный EGFR-HyPer в клетках линии HeLa-Kyoto после стимуляции 50 нг/мл EGF (начальная точка) и последующего добавления 5 мкМ DPI (отмечено стрелкой).

Отсутствие окисления EGFR-HyPer, ассоциированного с ПМ, свидетельствует о том, что, во-первых, в этом процессе нет активации NADPH-оксидазы и продукции АФК на ПМ, и, во-вторых, что диффузионное расстояние H_2O_2 ограничено несколькими микрометрами. Действительно, если бы H_2O_2 диффундировал в цитоплазме свободно, то EGFR-HyPer, ассоциированный с ПМ, был бы окислен H_2O_2 , продуцированным на эндосомах. Важно заметить, что значение F500/F420 для EGFR-HyPer отличается даже для соседних эндосом (Рис. 3Б, Г), что также свидетельствует о том, что диффузия H_2O_2 в цитоплазме клетки строго ограничена. На основании полученных данных мы предполагаем, что клеточная антиоксидантная система нейтрализует H_2O_2 до того, как H_2O_2 диффундирует в другие компартменты за пределом места генерации.

Создание сенсора PDGFR-HyPer

Пероксид водорода продуцируется в ответ на активацию многих ТКР, однако не известными остаются отличия в динамике и локализации продукции H_2O_2 между типами клеток, экспрессирующими различные тирозинкиназные рецепторы. Мы исследовали динамику продукции H_2O_2 при активации другого тирозинкиназного рецептора, PDGFR, в клетках линии NIH-3T3 при стимуляции их тромбоцитарным ростовым фактором (PDGF). Известно, что мышинные фибробласты NIH-3T3 обладают выраженным физиологическим ответом на стимуляцию PDGF.

Для исследования продукции H_2O_2 вблизи PDGFR мы создали генетическую конструкцию PDGFR-HyPer на базе опубликованной конструкции PDGFR-GFP. В результате, полученная конструкция *pPDGFR-HyPer* кодирует химерный белок (Рис. 5А), в котором С-конец PDGFR через короткий линкерный полипептид связан с N-концом HyPer.

А



Б

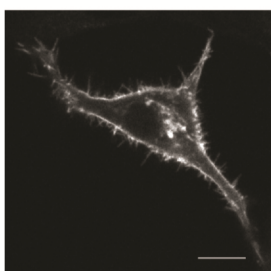


Рис. 5. Схема химерного белка PDGFR-HyPer (А) и его внутриклеточная локализация (Б) в клетках линии NIH-3T3 после 2 часов голодания в бессывороточной среде. Масштабная линейка – 10 мкм.

При экспрессии *pPDGFR-HyPer* в фибробластах линии NIH-3T3 после продолжительного голодания в течение 2-4 часов флуоресцентный сигнал был преимущественно локализован на ПМ (Рис. 5Б). HyPer в составе химерного белка PDGFR-HyPer сохранял свои сенсорные свойства и реагировал на добавление экзогенного H_2O_2 ростом соотношения F500/F420.

Исследование динамики продукции H_2O_2 с помощью химерного белка PDGFR-HyPer в клетках линии NIH-3T3

Мышьиные фибробласты NIH-3T3, экспрессирующие *pPDGFR-HyPer*, перед экспериментом инкубировали в бессывороточной среде в течение 2-4 часов. После стимуляции клеток ростовым фактором PDGF мы наблюдали интенсивное формирование филоподий и изменение формы клеток. В отличие от аналогичного эксперимента на клетках линии HeLa-Kyoto, в клетках NIH-3T3, экспрессирующих *pPDGFR-HyPer*, основная продукция H_2O_2 была ассоциирована с ПМ, особенно в филоподиях (Рис. 6А, Б). Концентрация H_2O_2 начинала расти через 1 мин после добавления PDGF (Рис. 6Г, Д) и достигала максимума через 10 минут. В течение следующих 10 минут происходило частичное восстановление сенсора, и начиналась вторая волна генерации H_2O_2 (Рис. 6Г).

Флуоресценция PDGFR-HyPer, ассоциированного с эндомембранами (внутриклеточными мембранами, содержащими PDGFR-HyPer), в течение первых 20 минут после стимуляции клеток оставалась практически без изменений, а затем начинала расти (Рис. 6Г). Таким образом, при стимуляции NIH-3T3 пул активных NADPH-оксидаз локализован в ПМ.

Отсутствие диффузии H_2O_2 от ПМ к эндомембранам свидетельствует о быстрой деградации H_2O_2 внутриклеточной антиоксидантной системой. При добавлении к пре-стимулированным фибробластам NIH-3T3 ингибитора NADPH-оксидаз, DPI, происходило быстрое падение концентрации H_2O_2 , что подтверждает роль NADPH-оксидаз как главных источников АФК.

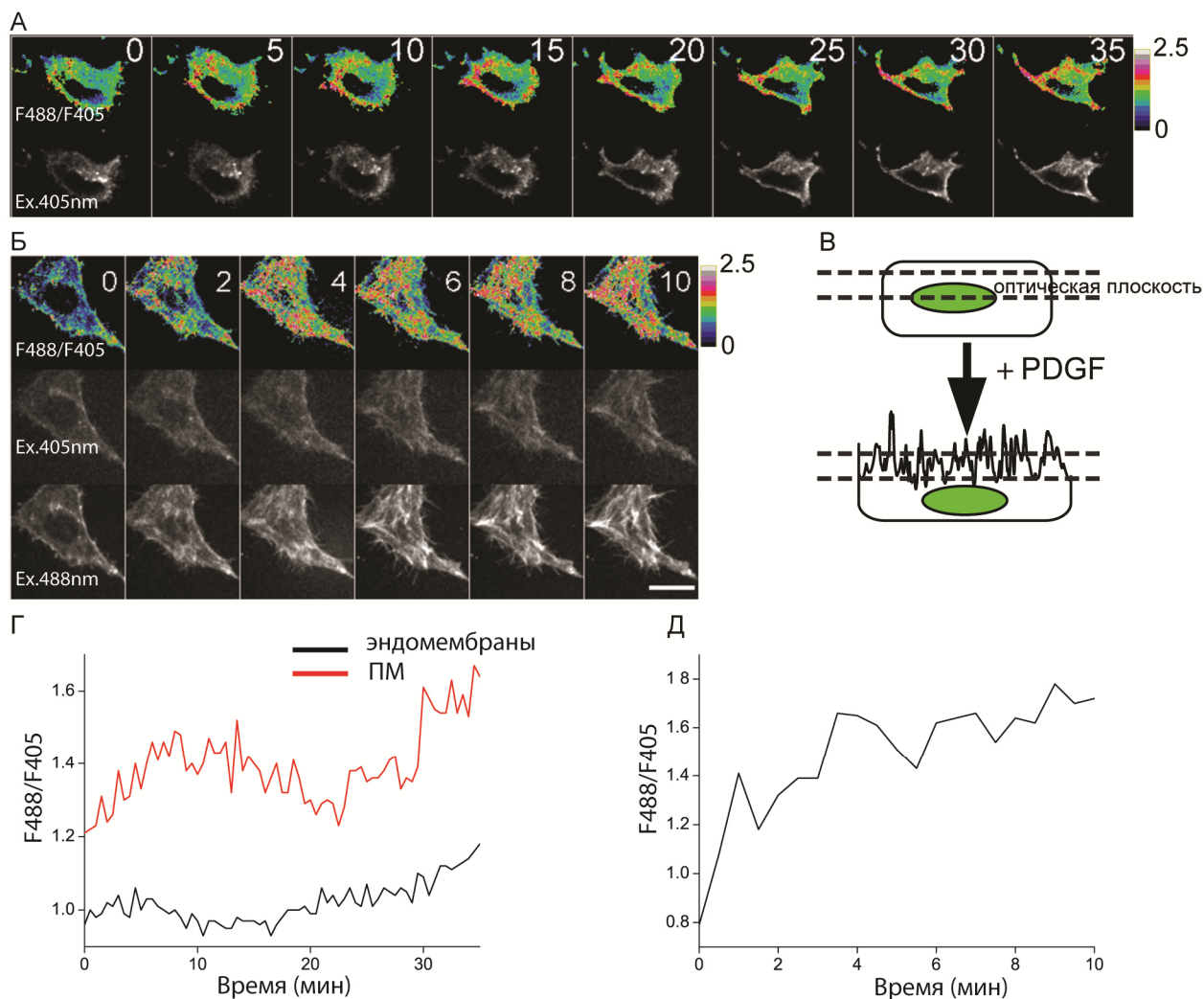


Рис. 6. Динамика изменения внутриклеточной концентрации H_2O_2 в ответ на стимуляцию PDGF.

(А) Серия конфокальных изображений клеток линии NIH-3Т3, экспрессирующих *pPDGFR-HyPer*. Клетки стимулированы PDGF (10 нг/мл) в начальный момент серии (0 мин). Масштабная линейка: 15 мкм.

(Б) Продукция H_2O_2 в филоподиях в клетке линии NIH-3Т3, экспрессирующей *pPDGFR-HyPer*, в ответ на стимуляцию PDGF (10 нг/мл). Масштабная линейка: 15 мкм. Шкала цветов отражает отношение F500/F420 (чёрный-0; белый-2,5).

(В) Иллюстрация событий, показанных в (Б): в ответ на добавление PDGF клетка начинает менять свою форму, что приводит к смещению клеточного ядра из конфокальной оптической плоскости и появление в ней «дорзальной» ПМ. Видно интенсивное формирование филоподий на ПМ, а также продукция H_2O_2 .

(Г) Графики, отражающие изменение концентрации H_2O_2 на ПМ (красный) и эндомембранах (черный) клетки, изображенной на панели (А).

(Д) График продукции H_2O_2 в филоподиях клетки, изображенной на панели (Б).

1.2. Динамика продукции H_2O_2 вблизи мембраны ЭПР при активации тирозинкиназных рецепторов в живой клетке

Известно, что в процессе активации ТКР фосфатаза РТР-1В окисляется пероксидом водорода. Ранее было показано, что мембраны, содержащие активированный EGFR и PDGFR контактируют с микродоменами мембраны ЭПР, которые содержат РТР-1В. В таких контактирующих участках происходит дефосфорилирование рецептора. Источником H_2O_2 , окисляющего РТР-1В могут служить NADPH-оксидазы, как колокализированные с активированным ТКР, так и локализованные на мембране ЭПР, вблизи РТР-1В. Мы предположили, что регистрация динамики изменения концентрации H_2O_2 вблизи мембраны ЭПР даст информацию о том, являются ли NADPH-оксидазы, локализованные на ЭПР, источниками окислителя в процессе активации ТКР.

Создание сенсора HyPer-TA

Для детекции H_2O_2 на цитоплазматической стороне ЭПР мы создали генетическую конструкцию *pHyPer-TA* (TA = tail anchor), кодирующую белок-слияния сенсора с С-концевой последовательностью РТР-1В, позволяющей заякорить белок в мембране ЭПР (Рис. 7А). При экспрессии *pHyPer-TA* в клетках HeLa-Kyoto и NIH-3T3 локализация флуоресцентного сигнала при сопоставлении с локализацией ранее описанного белка EYFP-РТР1В, соответствовала мембране ЭПР (Рис. 7Б).

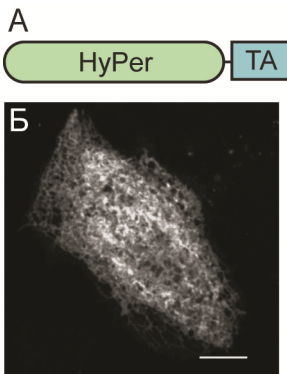


Рис. 7. Схема белка HyPer-TA (А) и его внутриклеточная локализация (Б) в клетках линии HeLa-Kyoto после 3 часов в бессывороточной среде. Масштабная линейка – 10 мкм.

Исследование динамики продукции H_2O_2 с помощью химерного белка *pHyPer-TA* в клетках линии HeLa-Kyoto и NIH-3T3

При добавлении EGF к клеткам HeLa-Kyoto, экспрессирующим *pHyPer-TA*, мы детектировали рост концентрации H_2O_2 вблизи мембраны ЭПР (Рис. 8А). Однако динамика роста концентрации отличалась от той, которую мы наблюдали в эксперименте с EGFR-HyPer.

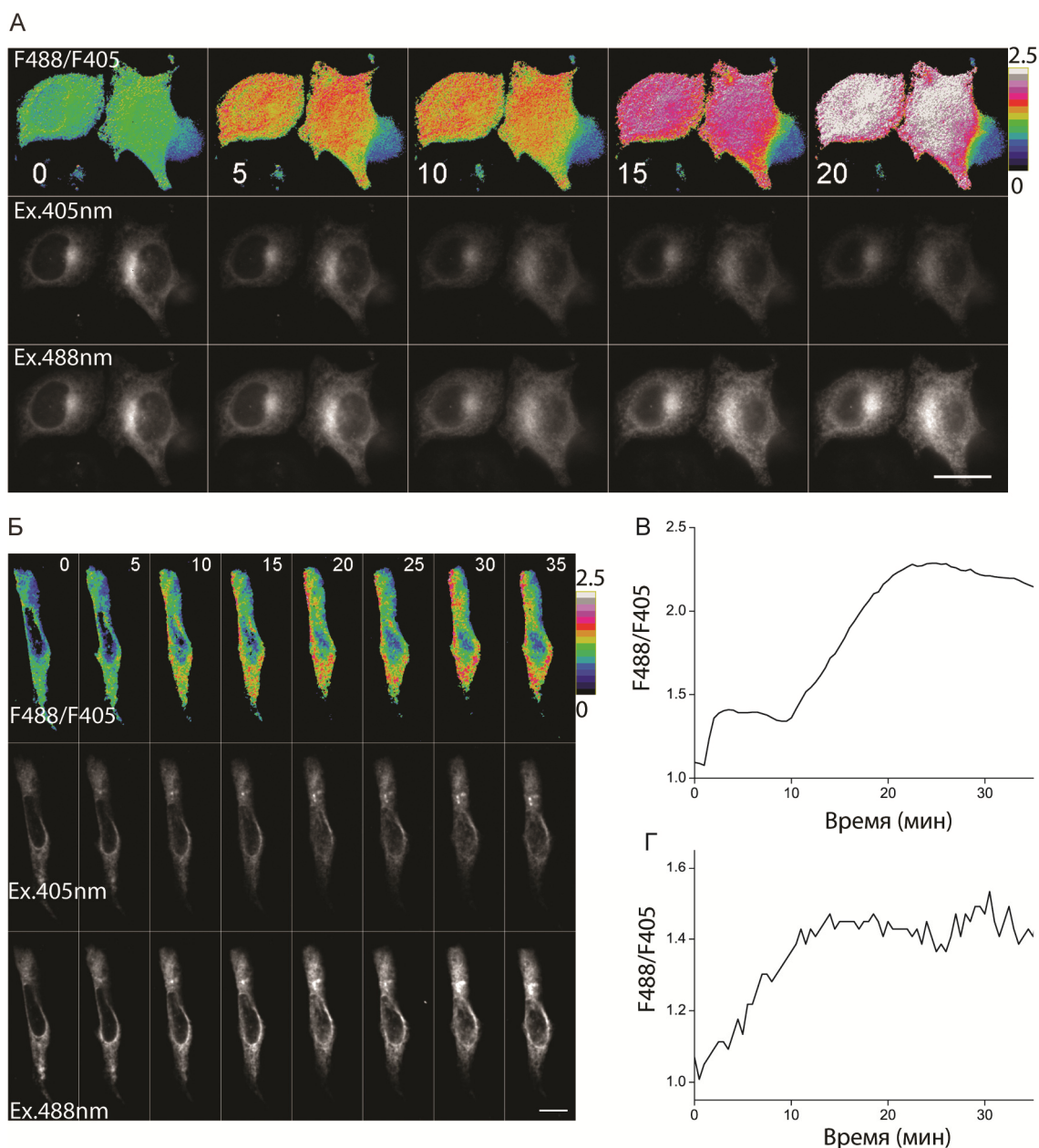


Рис. 8. Динамика изменения концентрации H_2O_2 у цитоплазматической поверхности мембраны ЭПР в ответ на стимуляцию клеток факторами роста.

(А) Серия флуоресцентных микрофотографий клеток HeLa-Kyoto, экспрессирующих *pHyPer-TA*. Клетки стимулированы EGF (50 нг/мл) в начальный момент серии (0). Масштабная линейка: 15 мкм.

(Б) Конфокальные изображения клетки линии NIH-3T3, экспрессирующей *pHyPer-TA*, при стимуляции PDGF (10 нг/мл). Масштабная линейка: 10 мкм.

(В) График изменения концентрации H_2O_2 в клетках на панели (А).

(Г) График изменения концентрации H_2O_2 в клетке на панели (Б).

Первая волна роста концентрации H_2O_2 началась через минуту после стимуляции клеток и продолжалась в течение 10-15 минут до начала второй волны роста концентрации H_2O_2 (Рис. 8В). Вероятно, вторая волна окисления HyPer-TA в клетках HeLa-Kyoto отражает либо прямую продукцию H_2O_2 на ЭПР, либо пул H_2O_2 , продуцированного на мембранах эндосом. Первая волна роста концентрации H_2O_2 на мембране ЭПР начиналась сразу после стимуляции клеток, еще до того, как пул эндосомального H_2O_2 может быть

зарегистрирован с помощью EGFR-HyPer. Это свидетельствует о том, что активация продукции H_2O_2 на мембранах ЭПР происходит быстрее, чем появление H_2O_2 , который продуцируется на эндосомах.

В аналогичном эксперименте с клетками NIH-3T3, экспрессирующими *pHyPer-TA*, стимуляция PDGF приводила к значительному росту отношения F500/F420 биосенсора, что отражает интенсивную продукцию H_2O_2 у мембраны ЭПР в фибробластах (Рис. 8Б). При сопоставлении графиков, отражающих продукцию H_2O_2 вблизи мембраны ЭПР (Рис. 8Г) и ПМ (Рис. 6Г), видно, что они сходны по форме и амплитуде.

Таким образом, в первые минуты после стимуляции клеток мы наблюдали отсутствие окисления HyPer в PDGFR-содержащих эндомембранах, но, вместе с тем, накопление окисленной формы HyPer-TA на ЭПР и PDGFR-HyPer на ПМ, что подкрепляет вывод об ограниченной диффузии H_2O_2 в цитоплазме.

Сопоставление динамики окисления HyPer-TA, EGFR-HyPer и PDGFR-HyPer позволяет предположить существование двух (эндосомальной и ретикулярной) независимо регулируемых систем продукции H_2O_2 в клетках HeLa-Kyoto и единой для ПМ и ЭПР системы в клетках NIH-3T3.

2. Создание индикатора для многопараметрической флуоресцентной микроскопии

Разнообразие флуоресцентных белков, сенсоров и химических красок различных цветов позволяют визуализировать многие сигнальные процессы в живой клетке. Комбинация флуорофоров, имеющих различные спектры, в одной клетке позволяет осуществить многопараметрическое исследование, т.е. визуализацию несколько клеточных процессов одновременно.

Внутриклеточная передача сигнала с участием фосфорилированных форм фосфатидилинозитола (PI), фосфоинозитидов (PIP), запускается в ответ на активацию рецепторов на плазматической мембране, таких как тирозинкиназные рецепторы, рецепторы, сопряженные с G-белками, и интегрины. Различные формы PIP находятся во всех внутриклеточных мембранах и участвуют в регуляции многих сигнальных процессов, как правило, через привлечение белков с PIP-взаимодействующими доменами. Эти домены отличаются друг от друга по специфичности к разным формам PIP. PI и PIP могут быть фосфорилированы фосфатидилинозитолкиназами и дефосфорилированы липидными фосфатазами. Одним из наиболее изученных липидных вторичных мессенджеров является фосфатидилинозитол-3,4,5-трифосфат (PIP_3). Фосфатидилинозитол-3-киназа (PI-3K) фосфорилирует фосфатидилинозитол-4,5-дифосфат с образованием PIP_3 , который в дальнейшем может быть дефосфорилирован липидной фосфатазой PTEN.

Образование в мембране липидных мессенджеров может быть обнаружено с помощью химерных флуоресцентных белков, слитых с PIP-чувствительными белковыми доменами. Такие флуоресцентные белки-слияния транслоцируются из цитоплазмы на мембрану в

ответ на появление PIP. По распределению интенсивности флуоресценции между цитоплазмой и мембраной можно оценивать пространственно-временной характер действия липидных киназ и фосфатаз.

Существуют свидетельства того, что продукция пероксида водорода NADPH-оксидазами и сигнализация с участием липидов являются кооперативными процессами. Так, известно, что сборка компонентов комплекса NADPH-оксидазы на мембране и ее активация зависят от появления в мембране продуктов активности PI-3K. В свою очередь, H₂O₂, продуцируемый NADPH-оксидазами, способен окислять тиолат в активном центре фосфатазы PTEN, временно ингибируя ее, что тем самым увеличивает время жизни продуктов PI-3K. Таким образом, исследование взаимосвязи липидной и окислительно-восстановительной сигнализации требуют появления стратегии одновременного наблюдения за динамикой PIP₃ и продукцией H₂O₂.

2.1 Создание индикатора с комбинированными свойствами

Для создания индикатора с комбинированными свойствами мы использовали PH-домен тирозинкиназы Btk (Bruton's tyrosine kinase). Данный PH-домен специфично взаимодействует с PIP₃ и позволяет тирозинкиназе Btk в ответ на активацию PI-3K транслоцироваться из цитоплазмы к ПМ. На основе ранее опубликованного конструкта eGFP-BtkPH нами был создан генетический конструкт, кодирующий белок-слияния, в котором N-конец биосенсора HyPer через короткий полипептидный линкер связан с PH-доменом Btk (BtkPH). Известно, что мутантный вариант протеинкиназы Btk с заменой в PH-домине E41K имеет повышенное сродство к PIP₃. Поэтому для увеличения аффинности биосенсора к PIP₃ в последовательность, кодирующую BtkPH, с помощью направленного мутагенеза была внесена мутация E41K (Рис. 9А). Полученный вектор *pBtkPH-E41K-HyPer* далее был экспрессирован в клетках линии NIH-3T3. В клетках флуоресцентный сигнал был равномерно распределен между цитоплазмой и ядром. При добавлении к клеткам H₂O₂ (200 мкМ) наблюдался значительный рост отношения F500/F420, что свидетельствует о том, что биосенсор HyPer в составе химерного белка BtkPH-E41K-Hyper не потерял свои сенсорные свойства.

2.2 Многопараметрическое исследование с помощью биосенсора BtkPH-E41K-HyPer в живой клетке

Активация PI-3K и продукция H₂O₂ в клетках NIH-3T3 при активации PDGFR

Работа биосенсора BtkPH-E41K-HyPer была протестирована в клетках линии NIH-3T3 в ответ на стимуляцию ростовым фактором PDGF. Добавление PDGF (10 нг/мл) к фибробластам NIH-3T3 инициировало транслокацию биосенсора на ПМ, и приводило к росту соотношения F500/F420, что отражает активацию PI-3K и рост концентрации H₂O₂ в области ПМ (Рис. 9Б).

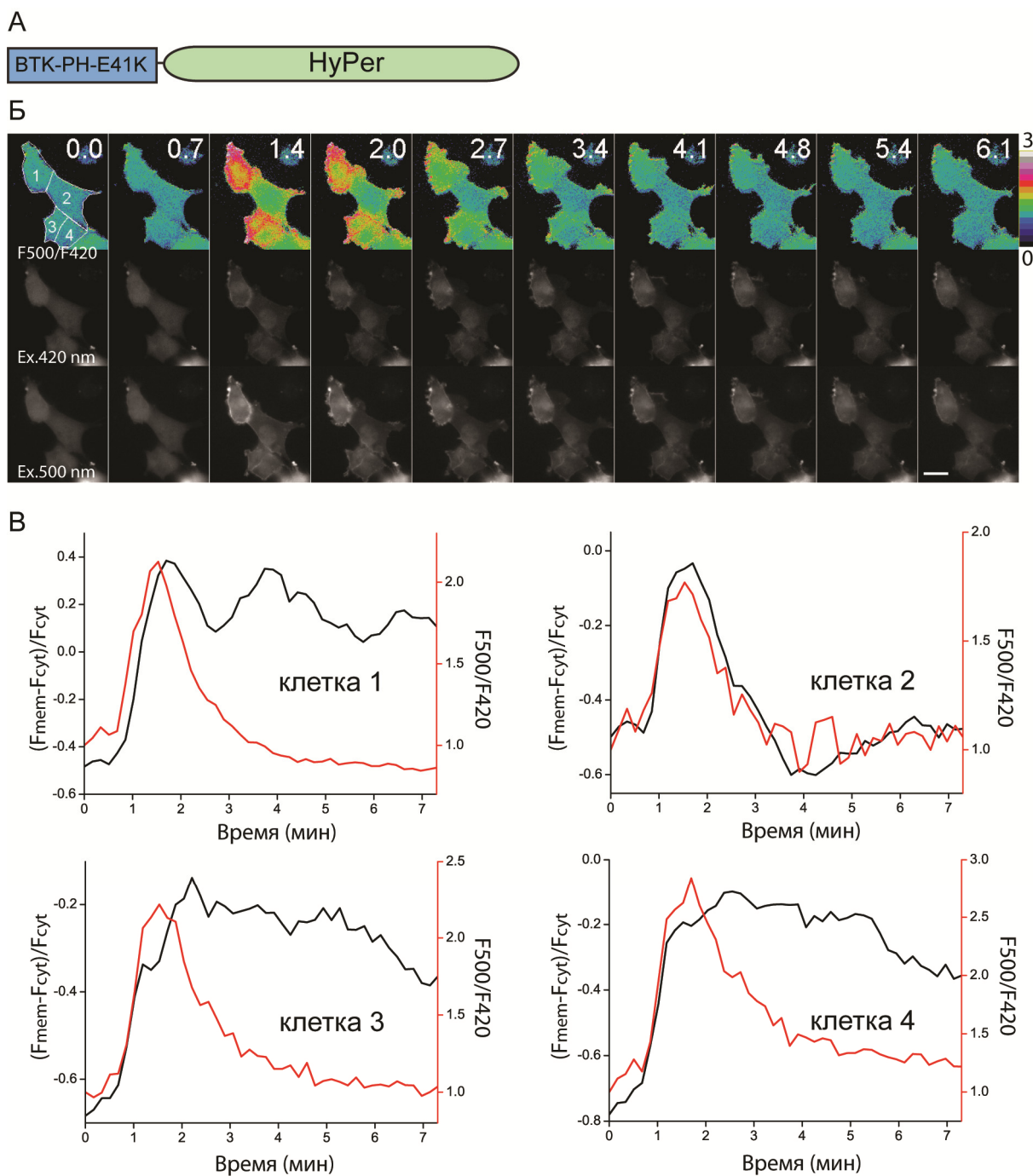


Рис. 9. Динамика изменения концентрации H_2O_2 и PIP_3 у цитоплазматической поверхности плазматической мембраны в ответ на стимуляцию клеток PDGF.

(А) Схема конструктора белка BtkPH-E41K-HyPer.

(Б) Серия флуоресцентных микрофотографий клеток NIH-3T3, экспрессирующих *pBtkPH-E41K-HyPer*, сразу после стимуляции PDGF (10 нг/мл). Соответствующие временные точки в минутах отмечены на каждом изображении. Верхний ряд серии изображений является рациометрическим и представляет внутриклеточное распределение отношения F500/F420, отражающего изменения концентрации H_2O_2 . Средний и нижний ряды изображений демонстрирует внутриклеточное распределение BtkPH-E41K-HyPer. На первом изображении из верхнего ряда обведены отдельные клетки и пронумерованы 1-4. Масштабная линейка: 15 мкм.

(В) Графики отражающие активацию PI-3K и изменение концентрации H_2O_2 в каждой отдельной клетке на панели (Б). Черным цветом показано изменение распределения PIP_3 , красным цветом – изменение концентрации H_2O_2 в клетке.

Для количественной оценки продукции PIP_3 и H_2O_2 мы проанализировали динамику процессов в отдельных клетках (Рис. 9В). Степень транслокации была рассчитана по формуле $T=(F_{mem} - F_{cyto})/F_{cyto}$ (где F_{mem} – интенсивность флуоресценции на ПМ, F_{cyto} – интенсивность флуоресценции в цитоплазме).

Анализ динамики флуоресцентных сигналов обоих процессов в отдельных клетках показал, что оба сигнала изначально ведут себя высоко кооперативно, что является ожидаемым, т.к. активация PI-3К предшествует активации NADPH-оксидаз.

Однако, хотя появление PIP_3 и H_2O_2 регистрируются одновременно, в дальнейшем падение концентрации H_2O_2 происходит независимо от накопления PIP_3 , который является более продолжительным во времени. Это может свидетельствовать о том, что оба процесса необязательно сопряжены друг с другом в течение длительного периода.

Следует заметить, что в процессе транслокации часть биосенсора всегда оставалась в цитоплазме, что позволяло сравнивать изменения соотношения F500/F420 между ПМ и цитоплазмой. Из Рис. 9Б. видно, что продукция H_2O_2 в фибробластах NIH-3T3 происходит преимущественно на ПМ, а диффузия H_2O_2 вглубь клетки ограничена, что согласуется с наблюдениям, полученным в первой части работы.

Так как активация PI-3К предшествует активации NADPH-оксидаз, мы проверили, приводит ли ингибирование PI-3К также к снижению продукции H_2O_2 . Преинкубация клеток с вортманнином в течение 20 минут приводила к ингибированию и PI-3К и продукции H_2O_2 (Рис. 10А).

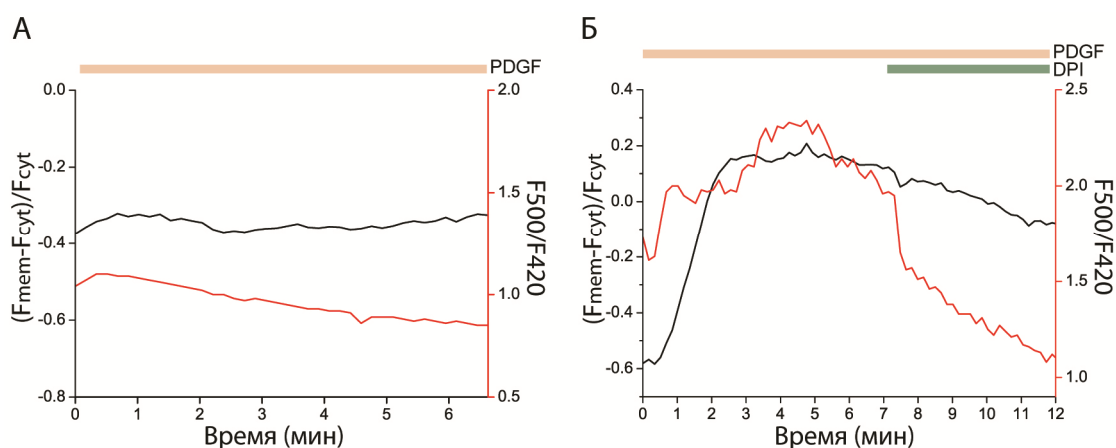


Рис. 10. Графики отражающие изменение распределения PIP_3 (черный) и концентрации H_2O_2 (красный) в клетках NIH-3T3 ответ на (А) пре-инкубацию клеток с вортманнином (500 мкМ) и последующую стимуляцию PDGF (0 мин) и (Б) стимуляцию PDGF и добавление DPI (60 мкМ).

Добавление к пре-стимулированным фибробластам ингибитора NADPH-оксидаз, дифенилениодониума (DPI) приводило к быстрому падению отношения F500/F420 индикатора VtkPH-E41K-HyPer, что отражает снижение продукции H_2O_2 (Рис. 10Б).

Активация PI-3K и продукция H_2O_2 в T_H -лимфоцитах при активации TCR

«Двойной» биосенсор VtkPH-E41K-HyPer был использован для изучения липидной и окислительно-восстановительной сигнализации в человеческих $CD4^+$ T-хэлперных лимфоцитах в процессе формирования иммунологического синапса. T-лимфоциты становятся активными в результате взаимодействия с антиген-презентирующими клетками (АПК). T-клеточный рецептор (TCR – от T-Cell Receptor) взаимодействует со своим лигандом - процессированным антигеном, связанным с главным комплексом гистосовместимости на поверхности АПК. Во время активации T-лимфоцит поляризуется и формирует плотный контакт, т. н. иммунологический синапс (ИС), с АПК. В исследованиях *in vitro* формирование ИС может быть смоделировано с помощью инкубации клеток с микросферами, покрытыми антителами анти-CD3/анти-CD28. Известно, что формирование ИС приводит к активации PI-3K и, как следствие, повышению концентрации PIP_3 и в области ИС, и в остальных частях ПМ. Также известно, что активация TCR способствует продукции АФК в клетке.

Однако динамика изменения концентрации в реальном времени и локализация продукции H_2O_2 при формировании ИС не была изучена. Для одновременной визуализации PI-3K активации и продукции H_2O_2 были использованы VtkPH-E41K-HyPer.

При экспрессии в T_H -лимфоцитах человека флуоресцентный сигнал был распределен между цитоплазмой и ядром. Однако во многих клетках еще до стимуляции рецептора часть флуоресцентного сигнала уже была локализована на ПМ, что свидетельствует о некотором базовом уровне активности PI-3K. Стимуляция T_H -лимфоцитов, экспрессирующих VtkPH-E41K-HyPer, с помощью микросфер, покрытых анти-CD3/анти-CD28 антителами, приводила к быстрому появлению контакта между T_H -лимфоцитами и микросферами (Рис. 11А).

Мы наблюдали мгновенное и значительное перераспределение флуоресцентного индикатора в область ИС на ранних этапах формирования контакта: большая часть индикатора локализовалась в области ИС и оставалась там в течение всего эксперимента (до 1 ч). Важно заметить, что активность PI-3K снизилась на остальных участках мембраны активированных клеток, что отражалось отсутствием выраженной локализации флуоресцентного сигнала на других участках ПМ (Рис. 11А).

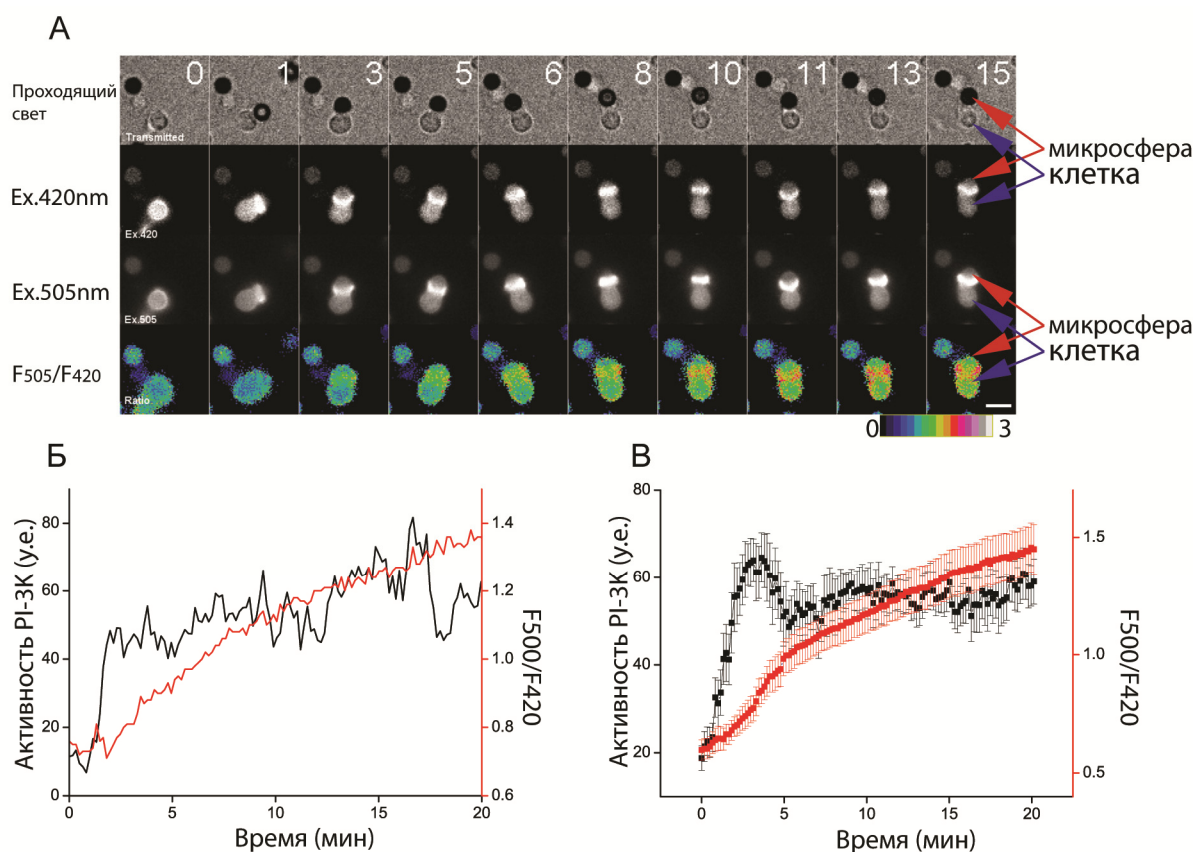


Рис. 11. Динамика изменения концентрации H_2O_2 и PI_3K у цитоплазматической поверхности плазматической мембраны T_H -лимфоцитов при формировании иммунологического синапса (ИС).

(А) Серия флуоресцентных микрофотографий T_H -лимфоцита, формирующего ИС с микросферой, покрытым анти-CD3/анти-CD28, (добавлен в начальное время). Верхний ряд изображений – клетка и две микросферы в канале проходящего света (микросферы черные), следующие два ряда демонстрируют распределение флуоресценции в двух каналах с возбуждением при 420 нм и 505 нм, нижний ряд – отношение F505/F420, что отражает распределение H_2O_2 в клетке. Масштабная линейка: 10 мкм.

(Б) График, отражающий активацию PI_3K и распределение H_2O_2 в T_H -лимфоците. Черным цветом показано изменение распределения PI_3K , красным цветом – изменение концентрации H_2O_2 в клетке.

(В) Среднее значение активности PI_3K и продукции H_2O_2 по 28 T_H -клеткам из трех экспериментов (стандартная ошибка среднего).

Эксперименты были проведены в университете Саарланда (Германия) на микроскопе Zeiss Cell Observer HS.

Мы исследовали продукцию H_2O_2 T_H -лимфоцитами по изменению отношения F500/F420 в процессе активации клеток. Формирование ИС сопровождалось быстрым ростом концентрации H_2O_2 через ~ 1 мин. после транслокации биосенсора в ИС (Рис.11 Б-В). Часть цитоплазмы, ассоциированная с ПМ, демонстрировала более высокий уровень концентрации H_2O_2 . Добавление к стимулированным T_H -лимфоцитам DPI приводило к быстрому ингибированию продукции H_2O_2 (Рис. 12А), что свидетельствует о наличии ассоциированной с ПМ NADPH-оксидазы в качестве источника H_2O_2 .

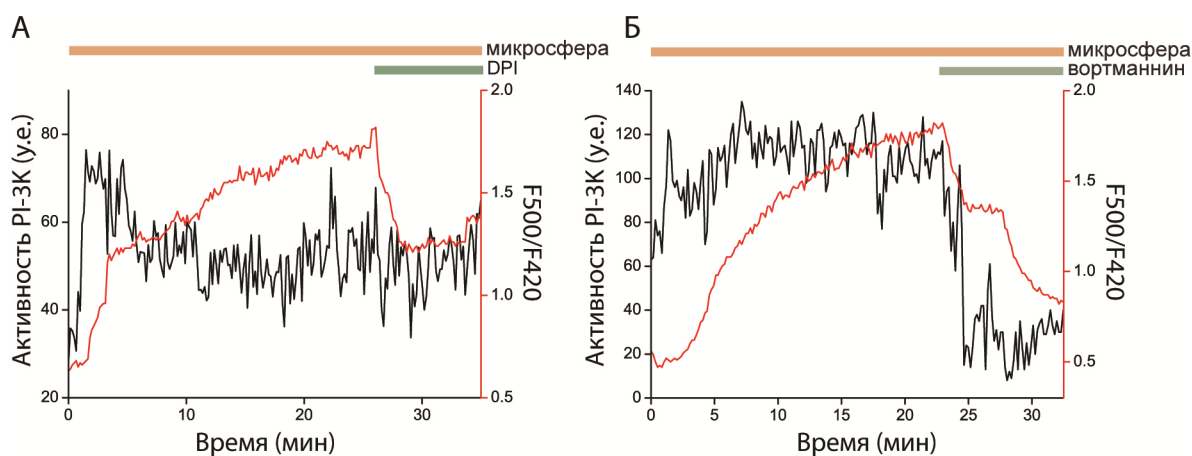


Рис. 12. Графики, отражающие изменение распределения PI_3K (черный) и концентрации H_2O_2 (красный) в T_H -лимфоцитах в ответ на добавление ингибиторов.

(А) Дифенилениодониум (DPI) ингибирует продукцию H_2O_2 в T_H -лимфоцитах после формирования иммунологического синапса. Анти-CD3/анти-CD28 микросферы добавлены в начальной точке.

(Б) Добавление к T_H -лимфоцитам вортманнина, ингибитора PI_3K , приводит к падению уровня PI_3K и H_2O_2 . Анти-CD3/анти-CD28 микросферы добавлены в начальной точке.

В случае ингибирования PI_3K добавлением вортманнина к пре-стимулированным T_H -лимфоцитам с помощью VtkPH-E41K-HuPer регистрировали снижение активности и PI_3K , и продукции H_2O_2 в области ИС (Рис. 12Б).

Заключение

В настоящей работе были получены варианты биосенсора для детекции пероксида водорода, HuPer, локализованные на мембранах различных внутриклеточных компартментов. Использование данного подхода позволило визуализировать динамику концентраций H_2O_2 с большим пространственным разрешением. С помощью полученных биосенсоров мы впервые продемонстрировали наличие микродоменов продукции H_2O_2 в процессе ТКР сигнализации.

С помощью индикатора EGFR-HuPer в стимулированных ростовым фактором клетках HeLa-Kyoto впервые было показано, что значительная продукция H_2O_2 происходит на эндосомах, а не на плазматической мембране. Можно предположить, что эндосомы, содержащие интернализированный EGFR и продуцирующие H_2O_2 , играют важную роль в поддержании каскада фосфорилирования: активный рецептор фосфорилирует субстраты, а продуцирующийся здесь же, H_2O_2 ингибирует РТР, создавая, таким образом, петлю положительной обратной связи. Кроме того, использование EGFR-HuPer позволило определить, что в цитоплазме стимулированных клеток свободная диффузия H_2O_2 в значительной степени ограничена (до 1-2 мкм).

В фибробластах линии NIH-3T3 с помощью PDGFR-HuPer была показана продукция H_2O_2 , локализованная преимущественно на ПМ. В отличие от клеток HeLa-Kyoto активация NADPH-оксидаз на ПМ в фибробластах свидетельствует о возможных внеклеточных мишенях H_2O_2 , продуцируемого в ответ на активацию PDGFR.

С помощью HyPer-TA в клетках линии HeLa-Kyoto и NIH-3T3 была показана независимая продукция H_2O_2 , быстро активирующаяся на ЭПР в ответ на активацию ТКР. Такой быстрый рост концентрации H_2O_2 на ЭПР сразу после стимуляции клеток может быть необходим для немедленного ингибирования фосфатазы PTP-1B на мембране ЭПР. Окисление HyPer-TA после активации и EGFR и PDGFR может служить моделью для изучения роли ингибирования PTP-1B пероксидом водорода.

Для исследования взаимосвязи продукции H_2O_2 и активации PI-3K был создан «двойной» индикатор VtkPH-E41K-HyPer. Тестирование работы индикатора в фибробластах NIH-3T3 в ответ на стимуляцию ТКР показало возможность одновременной детекции продукции H_2O_2 и PIP_3 . В $CD4^+$ T_H -лимфоцитах с помощью VtkPH-E41K-HyPer удалось впервые показать локальную активность фосфатидилинозитол-3'-киназы и продукцию H_2O_2 в области иммунологического синапса. Важно заметить, что преимуществом «двойного» индикатора является возможность использования всего одной экспрессионной конструкции для детекции двух параметров в клетке. Другим очевидным преимуществом является то, что спектральные свойства VtkPH-E41K-HyPer позволяют одновременно независимо наблюдать также за другими флуоресцентными белками, которые имеют спектр, неперекрывающийся со спектром белка HyPer. Таким образом, можно добавить еще один параметр для исследования в той же клетке, если его белком-репортером будет, например, красный флуоресцентный белок. Полученный индикатор VtkPH-E41K-HyPer может быть использован как прототип для создания других подобных индикаторов с комбинированными свойствами. Подобные многопараметрические генетически кодируемые флуоресцентные индикаторы могут быть востребованы в широком круге задач системной биологии.

ВЫВОДЫ

1. На основе биосенсора HyPer созданы локализованные флуоресцентные индикаторы PDGFR-HyPer, EGFR-HyPer и HyPer-TA для детекции H_2O_2 в близком окружении рецепторов PDGFR и EGFR, а также на цитоплазматической стороне мембраны эндоплазматического ретикулума.
2. С помощью полученных индикаторов впервые визуализирована локальная продукция и динамика H_2O_2 в клетке в ответ на активацию тирозинкиназных рецепторов. Установлено, что в клетках эпителиальной линии HeLa-Kyoto продукция H_2O_2 происходит на мембранах эндосом и эндоплазматического ретикулума. В фибробластах линии NIH-3T3 продукция H_2O_2 локализована на плазматической мембране и мембране эндоплазматического ретикулума. Таким образом, активация тирозинкиназных рецепторов, характерных для клеток разного происхождения, стимулирует различающиеся между собой паттерны генерации H_2O_2 .
3. Диффузия H_2O_2 в цитоплазме эукариотических клеток ограничена 1-2 мкм, то есть мишенью H_2O_2 являются только те белки, которые находятся в непосредственной близости от места его генерации.
4. Создан генетически кодируемый флуоресцентный индикатор VtkPH-E41K-HyPer для одновременной детекции H_2O_2 и активности фосфатидилинозитол-3'-киназы. На клетках линии NIH-3T3 продемонстрирована возможность использования полученного индикатора в многопараметрическом исследовании внутриклеточных сигнальных процессов. С использованием VtkPH-E41K-HyPer впервые показана локальная активность фосфатидилинозитол-3'-киназы и продукция H_2O_2 в области иммунологического синапса в $CD4^+$ T_H -лимфоцитах.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

Статьи

1. **Mishina N.M.**, Tyurin-Kuzmin P.A., Markvicheva K.N., Vorotnikov A.V., Tkachuk V.A., Laketa V., Schultz C., Lukyanov S., Belousov V.V. Does cellular hydrogen peroxide diffuse or act locally? *Antioxid Redox Signal.* 2011, 14 (1), 1-7.
2. Тюрин-Кузьмин П.А., Агаронян К.М., Морозов Я.И., **Мишина Н.М.**, Белоусов В.В., Воротников А.В. НАД(Ф)Н оксидаза регулирует EGF-зависимую пролиферацию клеток по механизму, отличному от активации ERK1/2 MAP-киназ. *Биофизика.* 2010, 55 (6), 1048-1056
3. Markvicheva K.N., Bilan D.S., **Mishina N.M.**, Gorokhovatsky A.Y., Vinokurov L.M., Lukyanov S., Belousov V.V. A genetically encoded sensor for H₂O₂ with expanded dynamic range. *Bioorg Med Chem.* 2010, 19(3):1079-84.
4. Марквичева К.Н., Гороховатский А.Ю., **Мишина Н.М.**, Мудрик Н.Н., Винокуров Л.М., Лукьянов С.А., Белоусов В.В. Сигнальная функция фагоцитарной NADPH-оксидазы: активация MAP-киназных каскадов при фагоцитозе. *Биоорг.химия*, 2010, 36 (1): 133-138.

Тезисы докладов на конференциях

1. Imaging of intracellular hydrogen peroxide localization following activation of tyrosine kinase receptors. **Mishina N.M.**, Tyurin-Kuzmin P., Markvicheva K., Vorotnikov A., Schultz C., Lukyanov S., Belousov V. Abstracts of papers presented at EMBO|EMBL Symposium: "Seeing is Believing – Imaging the Processes of Life". EMBL ATC, Heidelberg, Germany, 2011, page 126.
2. Локализация пероксида водорода в клетке при активации тирозинкиназных рецепторов. **Мишина Н.М.**, Тюрин-Кузьмин П.А., Воротников А.В., Белоусов В.В. Тезисы докладов и стендовых сообщений на XXIII Международной зимней молодежной научной школы "Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии". ИБХ РАН, Москва, 2011, стр. 11.
3. Локализация пероксида водорода в клетке при активации сигнальных каскадов тирозинкиназных рецепторов. **Мишина Н.М.**, Тюрин-Кузьмин П.А., Воротников А.В., Белоусов В.В. Школа-семинар по проблемам организации внутриклеточного транспорта, цитоскелета и путей передачи сигнала. (Санкт-Петербург, Институт цитологии РАН, 2009). Цитология. - 2010. - Том 52, N 3. - С. 262-263.
4. Изучение локализации перекиси водорода в клетке при активации тирозинкиназных рецепторов. Тюрин-Кузьмин П.А., **Сафронова Н.М.**, Воротников А.В., Белоусов В.В. Международная научная конференция по биоорганической химии, биотехнологии и бионанотехнологии, приуроченная к 75-летию со дня рождения академика Ю.А. Овчинникова (Конкурс молодых ученых). ИБХ РАН, Москва, 2009, стр. 247.
5. Создание внутриклеточных белковых биосенсоров нового поколения. Белоусов В.В., Марквичева К.Н., **Сафронова Н.М.**, Воротников А.В., Тюрин-Кузьмин П.А., Калинина Н.И., Коптелова Н.В., Кудряшова Т.В., Макаревич П.И., Ребриков Д.В., Стамбольский Д.В., Шаронов Г.В. Итоговая конференция по результатам выполнения мероприятий за 2009 год в рамках приоритетного направления «Живые системы». ИМБ им. В.А. Энгельгардта РАН, Москва, 2009, стр. 23.