

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

На правах рукописи

Билан Дмитрий Сергеевич

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

специальность – 03-01-03 – молекулярная биология

Диссертация на соискание учёной степени

кандидата биологических наук

**Научный руководитель:**  
Доктор биологических наук  
Белоусов Всеволод Вадимович

Москва 2014

# ОГЛАВЛЕНИЕ

<b>ВВЕДЕНИЕ.....</b>	<b>4</b>
<b>1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....</b>	<b>6</b>
<b>1.1. Активные формы кислорода (АФК) и их роль в клетке.....</b>	<b>6</b>
1.1.1. Основные типы АФК и их источники в клетках.....	6
1.1.2. Участие АФК в клеточном сигналинге.....	13
1.1.3. Антиоксидантные системы клеток.....	17
1.1.4. Химические методы регистрации АФК.....	25
<b>1.2. Основные редокс пары клетки.....</b>	<b>33</b>
1.2.1. Соотношение НАД <sup>+</sup> /НАДН.....	34
1.2.1.1. Структурные особенности НАД, синтез и транспорт.....	34
1.2.1.2. Роль НАД <sup>+</sup> и НАДН в энергетическом метаболизме клеток.....	38
1.2.1.3. Другие функции соотношения НАД <sup>+</sup> /НАДН.....	39
1.2.1.4. Транскрипционный фактор Rex – природный сенсор соотношения НАД <sup>+</sup> /НАДН.....	44
1.2.1.5. Методы регистрации НАД <sup>+</sup> и НАДН.....	47
1.2.2. Соотношение НАДФ <sup>+</sup> /НАДФН.....	50
1.2.3. Соотношение GSSG/GSH.....	51
<b>1.3. Флуоресцентные белки.....</b>	<b>52</b>
1.3.1. Общие структурные особенности флуоресцентных белков.....	52
1.3.2. Сенсоры на основе флуоресцентных белков.....	54
1.3.3. Флуоресцентные сенсоры для регистрации окислительно-восстановительных процессов.....	58
<b>ЦЕЛИ И ЗАДАЧИ.....</b>	<b>62</b>
<b>2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.....</b>	<b>63</b>
<b>2.1. Оборудование.....</b>	<b>63</b>
<b>2.2. Материалы.....</b>	<b>63</b>
<b>2.3. Методы.....</b>	<b>66</b>
2.3.1. Методы молекулярного клонирования.....	66
2.3.2. Методы работы с белком.....	69
2.3.3. Культура эукариотических клеток.....	71
2.3.4. Разведение и трансгенез <i>Danio rerio</i> .....	72
2.3.5. Микроскопия.....	72

<b>3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ.....</b>	<b>75</b>
<b>3.1. Усовершенствование генетически кодируемого биосенсора HyPer,</b>	
<b>    созданного для регистрации пероксида водорода.....</b>	<b>75</b>
3.1.1 HyPer-3 – версия биосенсора, сочетающая в себе полезные качества HyPer и HyPer-2.....	76
3.1.2. Сравнение аффинности и скорости реакции полученного HyPer-3 с HyPer и HyPer-2.....	79
3.1.3. Сравнение спектральных характеристик HyPer-3 с HyPer и HyPer-2.....	80
3.1.4. Сравнение олигомерного состояния HyPer-3 с HyPer и HyPer-2 .....	80
3.1.5. HyPer с объединенными мутациями A406V и H34Y.....	81
3.1.6. Тестирование HyPer-3 <i>in vivo</i> .....	82
3.1.7. Использование HyPer-3 и HyPer в FLIM микроскопии.....	83
<b>3.2. Создание генетически кодируемого флуоресцентного биосенсора для</b>	
<b>    регистрации соотношения НАД<sup>+</sup>/НАДН.....</b>	<b>86</b>
3.2.1. Конструкция и спектральные характеристики RexYFP.....	86
3.2.2. Определение чувствительности RexYFP.....	89
3.2.3. Подбор рН-контроля при работе с биосенсором RexYFP в живых системах.....	91
3.2.4. Использование RexYFP в клетках эукариот.....	92
3.2.5. Сравнение окислительно-восстановительного состояния пула НАД в цитоплазме и матриксе митохондрий с помощью RexYFP.....	94
3.2.6. RexYFP по отношению к другим биосенсорам, регистрирующим соотношение НАД <sup>+</sup> /НАДН.....	96
<b>ВЫВОДЫ.....</b>	<b>98</b>
<b>ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....</b>	<b>99</b>
<b>СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....</b>	<b>102</b>
<b>СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....</b>	<b>105</b>

## ВВЕДЕНИЕ

Окислительно-восстановительные процессы играют ключевую роль в клетках любых организмов. Широкий спектр биохимических реакций зависит от тонкой регуляции окислительно-восстановительных систем клетки. Некоторые из таких систем, как, например, дыхательная цепь митохондрий, на сегодняшний день довольно подробно изучены. Однако исследования последних десятилетий показали, что многочисленные окислительно-восстановительные преобразования внутри клеток в ответ на разные стимулы формируют очень сложную сеть взаимодействующих компонентов и требуют их дальнейшего изучения. Окислительно-восстановительные процессы подразумевают направленные потоки электронов, в переносе которых участвуют самые различные соединения. Некоторые соединения, представленные в клетке параллельно в окисленном и восстановленном состояниях, формируют универсальные сопряженные окислительно-восстановительные или, так называемые, активные редокс пары. Среди таких редокс пар следует отметить НАД<sup>+</sup>/НАДН, НАДФ<sup>+</sup>/НАДФН и окисленный/восстановленный глутатион (GSSG/GSH). Универсальность этих редокс пар заключается в том, что они участвуют в регуляции самых разнообразных клеточных процессов, поэтому соотношение окисленной и восстановленной форм этих соединений являются важными клеточными показателями.

Для аэробных организмов кислород занимает важнейшее место в регуляции жизненно необходимых внутриклеточных процессов, в том числе и окислительно-восстановительных. В дыхательных электронтранспортных цепях, производящих энергию, именно кислород служит конечным акцептором электронов. На этом роль кислорода в живых клетках не ограничивается. К настоящему времени накопилось достаточно данных, на основании которых можно утверждать о сигнальных функциях кислорода, которые осуществляются через его активные формы (АФК). АФК образуются в ходе протекания многих биохимических процессов как спонтанно, так и целенаправленно. На раннем этапе АФК приписывали негативную роль, поскольку они способны вызывать окислительные повреждения макромолекул. По этой причине они вовлечены в формирование многих патологических состояний, а также в процессы старения. Но оказалось, что АФК образуются и при нормальном физиологическом состоянии клеток, при этом их концентрация и время жизни строго контролируются специализированными системами. Особое внимание уделяют пероксиду водорода, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, который активирует клеточные сигнальные каскады и выступает в качестве вторичного мессенджера.

Но до недавнего времени изучение окислительно-восстановительных процессов в живых системах в режиме реального времени было невозможным, поскольку отсутствовали подходящие методы. Для регистрации АФК существуют различные синтетические красители. Применение некоторых из этих красителей возможно лишь в условиях *in vitro*, что, естественно, не отображает реальную картину. Красители, способные проникать внутрь клеток, как правило, не являются специфичными, а их реакции необратимы. Кроме того, на сигналы таких индикаторов часто накладываются артефакты, связанные с наличием побочных реакций. Не существовало методов и для изучения в живых клетках активных редокс пар.

Многие проблемы были решены благодаря созданию генетически кодируемых биосенсоров на основе флуоресцентных белков. На сегодняшний день создание генетически кодируемых биосенсоров является стремительно развивающейся и очень перспективной областью науки. В настоящее время биосенсоры нового поколения позволяют в режиме реального времени и в живых системах регистрировать исследуемые вещества, в том числе и некоторые виды АФК. НуPer является первым флуоресцентным генетически кодируемым сенсором, который позволяет регистрировать динамику изменения внутриклеточного  $H_2O_2$  на уровне целостного организма, клетки или отдельного клеточного компартмента. Реакция НуPer является обратимой и специфичной для  $H_2O_2$ . Однако, для многих биологических моделей, в которых концентрация  $H_2O_2$  меняется незначительно, динамический диапазон сенсора является недостаточным.

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

# ГЛАВА 1

## ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

### 1.1. АКТИВНЫЕ ФОРМЫ КИСЛОРОДА (АФК) И ИХ РОЛЬ В КЛЕТКЕ

Поскольку АФК играют важную роль в регуляции многих окислительно-восстановительных процессов в клетке, данную часть главы мы посвящаем АФК. А именно, какие типы АФК существуют, как они образуются в клетке, каким образом они могут осуществлять те или иные функции. Окислительно-восстановительные процессы подразумевают собой строго контролируемый и обратимый механизм, мы рассмотрим ключевые компоненты антиоксидантных систем клетки. Кроме того, рассмотрим наиболее популярные методы изучения АФК до появления генетически кодируемых индикаторов.

#### 1.1.1. Основные типы АФК и их источники в клетках

В результате биохимических процессов, а также в качестве побочных продуктов, в клетках живых организмов постоянно образуются АФК. Образование АФК происходит в результате переноса электронов на молекулярный кислород, постоянно присутствующий в клетках аэробных организмов. В результате одноэлектронного восстановления молекулярного кислорода  $O_2$  образуется супероксид анион радикал (далее "супероксид")  $O_2^{\cdot-}$  (уравнение 1), который лежит в основе образования всех прочих типов АФК.

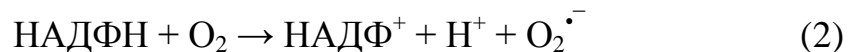


Работа клеточных электронтранспортных цепей является одним из источников образования  $O_2^{\cdot-}$  в клетках [1, 2]. У млекопитающих это происходит за счет работы электронтранспортной цепи митохондрий. В норме поток электронов последовательно перемещается по цепи трансмембранных белковых комплексов митохондрий. Этот процесс сопряжен с перекачиванием протонов через мембрану, что вызывает генерацию протонного потенциала. В дальнейшем АТФ-синтаза использует этот потенциал для преобразования энергии в молекулы АТФ. Однако на уровне комплексов I и III дыхательной цепи митохондрий может происходить утечка электронов, которые восстанавливают доступный кислород, что и приводит к образованию супероксида [1, 3]. Предполагают, что от 0,15 до 2 % электронов от общего их потока через дыхательную цепь митохондрий приходится на генерацию супероксида [3, 4].

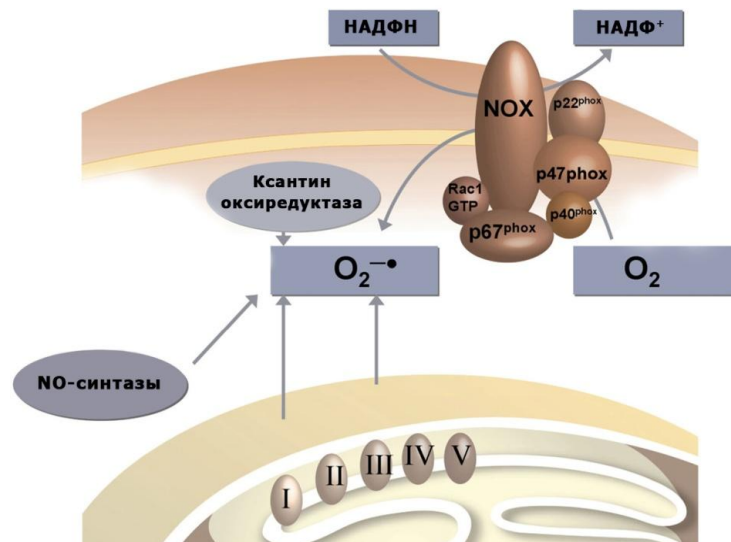
Ферментативная система ксантинооксидоредуктазы, играющая важную роль в катализме пуринов, является еще одним источником супероксид аниона в клетке. Этот фермент был обнаружен в двух формах, одна из которых является ксантиндегидрогеназой, а вторая претерпевает посттрансляционные модификации и называется ксантинооксидазой [5]. Было изучено, что при окислении пуринов именно ксантинооксидаза способствует образованию  $O_2^{\cdot-}$  [6].

Синтазы оксида азота (NO-синтазы, NOS), осуществляющие синтез NO в клетке, также могут в качестве побочного продукта реакции служить источниками  $O_2^{\cdot-}$  [7, 8].

Одним из главных источников  $O_2^{\cdot-}$  в клетке является реакция, осуществляемая белками семейства NOX (nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidases), которые по своей природе являются трансмембранными НАДФН-оксидазами. Используя НАДФН в качестве донора, эти ферментные комплексы осуществляют перенос электронов через биологические мембраны. Кислород служит акцептором электронов, что и приводит к образованию большого количества супероксид аниона [9, 10] (уравнение 2).



На рисунке 1 представлено схематичное изображение основных источников образования  $O_2^{\cdot-}$  в клетках эукариот.



**Рисунок 1. Основные источники внутриклеточного супероксид аниона  $O_2^{\cdot-}$**

Ассоциированный с мембраной ферментативный комплекс НАДФН-оксидазы осуществляет одноэлектронное восстановление  $O_2$  до  $O_2^{\cdot-}$ . Для стабилизации комплекса NOX каталитическая субъединица связывает регуляторные. На схеме представлены и другие источники  $O_2^{\cdot-}$ : ксантинооксидоредуктаза, NO-синтазы и дыхательная цепь митохондрий на уровне комплексов I и III. Адаптировано из [11].

Белки семейства NOX заслуживают особого внимания и более подробного рассмотрения. Дело в том, что именно благодаря изучению этих сложных комплексов

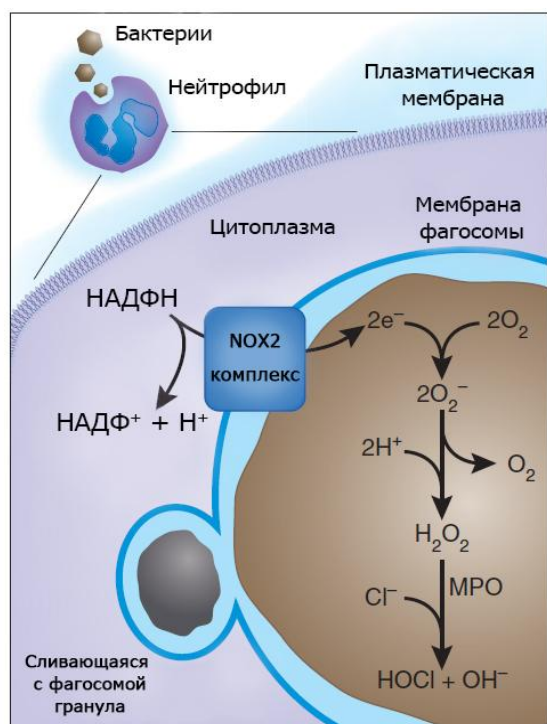
стало понятно, что роль АФК в самых разнообразных клетках очень обширна, и эта роль не ограничивается одним лишь повреждающим фактором, как считалось ранее.

Еще до открытия НАДФН-оксидаз были независимо описаны явления дыхательного или, по-другому, окислительного взрыва для различных типов клеток из разных источников [9]. Дыхательный взрыв представляет собой генерацию АФК в клетке при некоторых ее состояниях. В частности, давно известно, что дыхательный взрыв фагоцитов связан с генерацией  $\text{H}_2\text{O}_2$  [12]. Однако лишь позднее было установлено, что изначальным продуктом дыхательного взрыва является  $\text{O}_2^{\cdot-}$ , а не  $\text{H}_2\text{O}_2$  [13].

Важным толчком в понимании механизма дыхательного взрыва послужило изучение редкого генетического заболевания хронического грануломатоза. Оказалось, что для фагоцитов больных этим заболеванием характерно отсутствие дыхательного взрыва, но при этом фагоциты сохраняют способности к фагоцитозу и хемотаксису [14-16]. Уже позднее был определен белковый комплекс, отсутствие которого в фагоцитах являлось причиной возникновения этого заболевания. Каталитическая субъединица этого нового комплекса, оказавшегося НАДФН-оксидазой, была названа gp91<sup>phox</sup> или NOX2 по новой номенклатуре [17-19].

В фагоцитирующих клетках NOX2 является одним из важнейших компонентов для борьбы с патогенами [20, 21]. Процесс фагоцитоза активирует комплекс NOX2, расположенный в мембране фагосом. NOX2 осуществляет перенос электронов внутрь фагосомы с цитоплазматической стороны клетки, используя НАДФН в качестве донора. Это приводит к мощной генерации  $\text{O}_2^{\cdot-}$  внутри фагосомы, быстро превращающегося в  $\text{H}_2\text{O}_2$ . В случае нейтрофилов, благодаря миелопероксидазе с участием  $\text{H}_2\text{O}_2$  образуется еще более реактивное соединение – хлорноватистая кислота, которая является эффективным противомикробным агентом [22]. На рисунке 2 представлена схема генерации АФК в фагосоме нейтрофила при его борьбе с патогенными микроорганизмами.

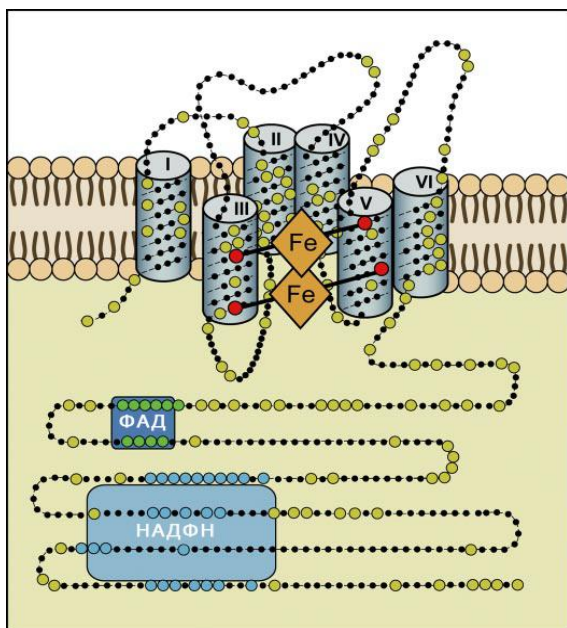
Позднее генерация АФК была обнаружена и в других типах клеток. Самое интересное, что большинство из этих клеток не имеют никакого отношения к фагоцитозу. Впоследствии были найдены и изучены гомологи NOX2. Первым найденным таким гомологом стал NOX1 [23, 24]. За NOX1 практически сразу последовали открытия NOX3 [25, 26], NOX4 [27, 28], NOX5 [26, 29], а также DUOX1 и DUOX2 [30, 31].



**Рисунок 2. Механизм генерации АФК НАДФН-оксидазой в нейтрофилах при фагоцитозе**

В фагосоме нейтрофила происходит окислительный взрыв. При фагоцитозе активируется трансмембранный комплекс NOX2, который переносит электроны с цитоплазматического НАДФН на кислород внутрь фагосомы через ее мембрану. Одноэлектронное восстановление O<sub>2</sub> приводит к образованию O<sub>2</sub><sup>-</sup>, который быстро дисмутирует в H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Миелопероксидаза (MPO) катализирует реакцию образования HOCl [32].

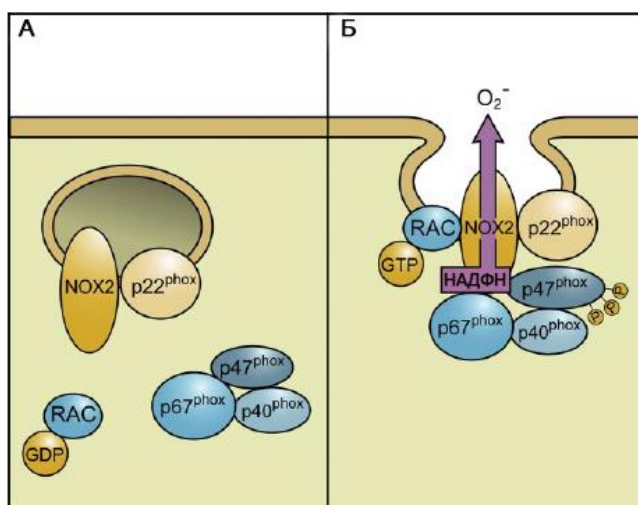
Поскольку все представители семейства NOX являются трансмембранными НАДФН-оксидазами и осуществляют перенос электронов через мембраны, для них характерны некоторые общие структурные особенности (рисунок 3). В частности, у всех представителей NOX каталитическая субъединица содержит НАДФН-связывающий участок на С-конце, а также область связывания кофермента ФАД. Трансмембранная часть представлена шестью консервативными доменами, в составе третьего и пятого доменов располагаются по два высоко консервативных гистидиновых остатка. У разных представителей семейства может быть характерно наличие дополнительных доменов или структурных особенностей [9].



**Рисунок 3. Общие структурные особенности каталитической субъединицы представителей семейства NOX**

Трансмембранная часть состоит из шести консервативных доменов. III и V домены участвуют в связывании двух ассиметричных гемов, благодаря наличию в структурах каждого из этих доменов двух гистидиновых остатков. На цитоплазматическом С-конце расположены домены для связывания НАДФН и ФАД [9].

Помимо трансмембранной части, в состав комплекса NOX часто входят различные регуляторные субъединицы, которые специфичны для разных представителей этого семейства. Наиболее изученным среди всех NOX комплексов является NOX2 фагоцитов. НАДФН-оксидазу этого типа часто рассматривают как прототип всего семейства. При активации NOX2 происходит сборка сложного комплекса, основанная на белок-белковых взаимодействиях. На рисунке 4 схематично продемонстрировано как происходит активация данного комплекса. NOX2 или по-другому gp91<sup>phox</sup> ассоциирован с белком p22<sup>phox</sup> в мембране фагосом. Активация NOX2 требует присоединения дополнительных факторов к комплексу NOX2/p22<sup>phox</sup> со стороны цитоплазмы [9]. Перед началом сборки активного комплекса происходит фосфорилирование цитоплазматического белка p47<sup>phox</sup>, который претерпевает конформационные изменения, в результате чего может взаимодействовать с белком p22<sup>phox</sup> [33]. Белки p67<sup>phox</sup> и p40<sup>phox</sup> контактируют с мембранным комплексом через взаимодействие с p22<sup>phox</sup>. Еще один важный этап активации NOX2 заключается в присоединении к общему комплексу белка Rac с ГТФ-азной активностью [9]. В такой сборке комплекс NOX2 становится функционально активным.



**Рисунок 4. Комплекс NOX2 в неактивном (А) и активном (Б) состояниях**

А – в неактивном состоянии комплекса каталитическая субъединица NOX2 ассоциирована с белком p22<sup>phox</sup>. Необходимые для активации комплекса регуляторные белки находятся в цитоплазме в свободном виде. Б – активация NOX2 требует сборки сложного мембранного комплекса. Фосфорилирование p47<sup>phox</sup> способствует его взаимодействию с p22<sup>phox</sup>, через который к комплексу присоединяются p40<sup>phox</sup> и p60<sup>phox</sup>. В составе функционально активного комплекса NOX2 находится также ГТФ-аза Rac. NOX2 связывает НАДФН и начинает перенос электронов на кислород [9].

В составе такого сложного белкового комплекса NOX2 проявляет НАДФН-оксидазную активность. На первом этапе электрон переносится с НАДФН на ФАД, после чего сначала на внутренний, а затем и внешний гемы. Внешний гем связывает кислород, что создает энергетически выгодное состояние и облегчает перенос электронов на конечный акцептор [9, 34, 35].

Многоэтапная активация NOX2 позволяет осуществлять контроль АФК, которые продуцируются данной системой.

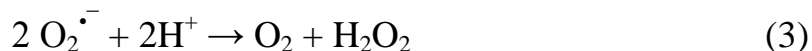
Гомологи NOX2 широко представлены в клетках различных тканей, и зачастую функции этих клеток не связаны с фагоцитарной активностью. Например, экспрессия NOX1 хорошо выражена в клетках толстого кишечника [36], а также обнаружена в гладкомышечных клетках кровеносных сосудов [23, 37], эндотелиальных клетках [38], в остеокластах [39] и некоторых других. НАДФН-оксидаза, которая была обнаружена во внутреннем ухе, оказалась еще одним представителем семейства и была названа NOX3 [40]. В почках наблюдается высокий уровень экспрессии NOX4 [27], этот гомолог был найден и в других источниках, в том числе в остеокластах, эндотелиальных клетках, нейронах и других [9]. Каталитические субъединицы NOX1,2,3 эволюционно очень близкие белки, NOX4 несколько отличается по своей структуре от прототипа NOX2, но и этот представитель семейства объединяют вместе с NOX1-3 в условную подгруппу. Все они устроены по схожему принципу, для функциональности каждого из них необходим  $p22^{\text{phox}}$ . Интересная особенность характерна для NOX4, не требующей дополнительных цитоплазматических субъединиц для регуляции активности [9, 27]. NOX5 отличается от других гомологов семейства присутствием  $\text{Ca}^{2+}$ -связывающего домена на N конце. Для NOX5 также не характерно взаимодействия с какими-либо цитоплазматическими субъединицами, выступающими в роли активаторов [29]. Кроме того, в отличие от NOX1-4, для нормального функционирования NOX5 не требуется  $p22^{\text{phox}}$  [9].  $\text{Ca}^{2+}$ -связывающий домен претерпевает конформационные изменения в ответ на колебания  $\text{Ca}^{2+}$  в клетке. Предполагается, что конформационные изменения этого домена благодаря внутримолекулярным белок-белковым взаимодействиям и регулируют активность NOX5 [41]. Ферменты группы DUOX также относят к семейству NOX. Их особенностью является наличие дополнительного трансмембранного домена, N-конец которого связан с доменом гомологичным пероксидазам. В некоторых работах сообщается, что этот домен действительно функционирует как пероксидаза. Однако после детального анализа было обнаружено, что в этом домене отсутствуют некоторые аминокислотные остатки, которые ранее были определены как ключевые для

функционирования пероксидаз [9]. Самый высокий уровень экспрессии DUOX наблюдается в щитовидной железе [30], но встречается и в других органах [9]. Еще до открытия этих белков было установлено, что эпителиальные клетки щитовидной железы производят  $\text{H}_2\text{O}_2$ . После обнаружения белков DUOX считается, что механизм образования  $\text{H}_2\text{O}_2$  в данном случае происходит не прямым образом, а через генерацию  $\text{O}_2^{\cdot-}$ , как первичного продукта всех NOX.  $\text{O}_2^{\cdot-}$ , в свою очередь, служит источником образования  $\text{H}_2\text{O}_2$  [9].

Разнообразие NOX и их повсеместное распространение в клетках с очень разнообразными функциями лишний раз доказывает значимую роль АФК в жизни всех клеток. Для белков NOX, участвующих во многих физиологических процессах, характерна сложная система регуляции. На сегодняшний день известно, что NOX, как и целенаправленно производимый ими  $\text{O}_2^{\cdot-}$ , участвуют в клеточном сигналинге. Например, генерация  $\text{O}_2^{\cdot-}$  происходит в ответ на некоторые ростовые факторы и цитокины [9].

Помимо основных источников образования  $\text{O}_2^{\cdot-}$ , описанных выше, в незначительной степени вносить вклад могут и некоторые другие клеточные реакции, в которых  $\text{O}_2^{\cdot-}$  может образовываться в качестве побочного продукта.

Большая часть всего образовавшегося внутри клетки  $\text{O}_2^{\cdot-}$  практически сразу спонтанно или благодаря специализированному ферменту супероксиддисмутазе превращается в пероксид водорода  $\text{H}_2\text{O}_2$  (уравнение 3) [42].

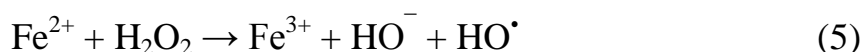


Время жизни  $\text{O}_2^{\cdot-}$  внутри клеток крайне мало, реакция его дисмутации в  $\text{H}_2\text{O}_2$  предотвращает губительное воздействие этого радикала. Однако, некоторая часть  $\text{O}_2^{\cdot-}$  все же может миновать реакцию дисмутации и прореагировать, например, с оксидом азота NO с образованием очень сильного окислителя пероксинитрита  $\text{ONOO}^-$  (уравнение 4) [43].



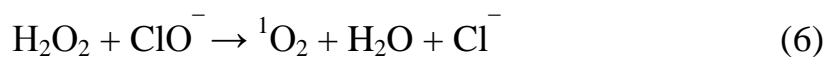
Наиболее изученной формой АФК является  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Помимо основной реакции дисмутации  $\text{O}_2^{\cdot-}$  пероксид водорода может в гораздо меньшей степени образовываться в качестве побочного продукта некоторых реакций, например, в реакции, катализируемой моноаминоксидазой А/В [44].

$\text{H}_2\text{O}_2$  может привести к образованию иных форм АФК. В присутствии ионов переходных металлов  $\text{H}_2\text{O}_2$  вступает в реакцию Фентона (Fenton), в ходе которой образуется очень активный гидроксильный радикал  $\text{HO}^{\cdot}$  (уравнение 5) [45].



Как и прочие формы АФК,  $\text{H}_2\text{O}_2$  токсичен для клеток, и его содержание строго контролируется в норме. Сейчас уже точно известно, что  $\text{H}_2\text{O}_2$  участвует также в специфичной и обратимой регуляции активности некоторых белков, главным образом за счет модификации их тиоловых групп [46, 47]. Пожалуй, среди всех АФК только  $\text{H}_2\text{O}_2$  можно с уверенностью назвать сигнальной молекулой.

Особой формой АФК является синглетный кислород  $^1\text{O}_2$ , отличающийся от основного состояния более высокой энергией. Образование  $^1\text{O}_2$  в клетке происходит не ферментативным путем, чаще всего он образуется фотохимически при участии фотосенсибилизаторов, например, порфирина [48], или метаболическим путем, как в случае нейтрофилов. В этом случае гипохлорит, который образуется каталитическим путем с помощью фермента миелопероксидазы, взаимодействует с избыточным при окислительном взрыве количеством  $\text{H}_2\text{O}_2$ , образуя  $^1\text{O}_2$  (уравнение 6) [49].



### 1.1.2. Участие АФК в клеточном сигналинге

На сегодняшний день известно, что АФК являются не просто побочными продуктами клеточных окислительно-восстановительных реакций, но и могут участвовать в регуляции многих сигнальных путей клетки. И во многих случаях генерация АФК является не случайным, а вполне контролируемым процессом.

Внутриклеточный  $\text{O}_2^{\cdot-}$ , который не подвергся реакции дисмутации, способен прореагировать с различными ферментами, например, с аконитазой [50], гуанилатциклазой [51], рибонуклеотидредуктазой [52] и рядом других. Известным примером, где  $\text{O}_2^{\cdot-}$  действительно участвует в регуляции клеточного сигнала, является его взаимодействие с бактериальным транскрипционным фактором SoxR [53]. SoxR функционирует в виде гомодимера, в котором каждая субъединица содержит [2Fe-2S] кластер [54, 55]. Одноэлектронное окисление [2Fe-2S] кластера этого белка в результате его реакции с  $\text{O}_2^{\cdot-}$  приводит к конформационным изменениям, благодаря которым SoxR активирует транскрипцию другого белка SoxS [56, 57]. SoxS по своей природе является транскрипционным фактором, ответственным за регуляцию экспрессии ряда белков антиоксидантных систем. При отсутствии  $\text{O}_2^{\cdot-}$  [2Fe-2S] кластер SoxR довольно быстро восстанавливается, в результате чего уровень экспрессии SoxS снижается [56-58]. Этот пример демонстрирует, что появление  $\text{O}_2^{\cdot-}$  в живой системе, в данном случае бактерий, приводит к быстрому и эффективному распространению сигнала, активирующего сложные комплексы защиты клетки против окислительного стресса. Но до сих пор остаются плохо изученными возможные взаимодействия других

белков с  $O_2^{\cdot-}$ . Из-за высокой скорости реакций клеточных супероксиддисмутаза (константа скорости более  $10^9 M^{-1} s^{-1}$ )  $O_2^{\cdot-}$  очень быстро дисмутирует в  $H_2O_2$  [59]. Есть основания предполагать, что в клеточном сигналинге  $O_2^{\cdot-}$  является лишь промежуточным звеном для образования  $H_2O_2$ , который уже по праву можно отнести к категории вторичных клеточных мессенджеров.

$H_2O_2$  участвует в передаче сигнала окислительно-восстановительных процессов благодаря своему свойству обратимо и специфично модифицировать некоторые аминокислотные остатки в составе ключевых белков. Чаще всего такими остатками являются цистеины, но модификациям со стороны  $H_2O_2$  могут подвергаться и другие. Обратимые модификации могут существенно влиять на конформацию белков, изменяя их функциональность или взаимодействия с партнерами [60].

В бактериальных клетках были обнаружены транскрипционные факторы, которые под воздействием  $H_2O_2$  регулируют экспрессию некоторых белков антиоксидантных систем [57]. К подобным регуляторам относится хорошо изученный транскрипционный фактор *E. coli* OxyR [61]. В присутствии  $H_2O_2$  в структуре OxyR происходят конформационные изменения за счет образования внутримолекулярной дисульфидной связи между цистеинами в положениях 199 и 208, в окисленном состоянии OxyR активирует транскрипцию некоторых белков [61, 62].

$H_2O_2$  участвует в регуляции и некоторых других белков. В тирозинфосфатазах модификация активного центра приводит к ингибированию ферментативной активности, это приводит к тому, что фосфорилированное состояние, например, рецепторов ростовых факторов, пролонгируется [63, 64]. Даже регуляция некоторых ионных каналов происходит с участием  $H_2O_2$  [65, 66].  $H_2O_2$  активирует некоторые тирозинкиназы, запуская, таким образом, сложные каскады сигнальных реакций. В качестве примера можно привести тирозинкиназу Src, которая в присутствии  $H_2O_2$  активируется благодаря окислению двух цистеиновых остатков в ее структуре [67]. Известны и другие примеры, в которых  $H_2O_2$  участвует в регуляции самых разнообразных белков.

Доступность цистеиновых остатков в структуре белков, а также степень депротонирования их тиольных групп являются основными факторами, лимитирующими взаимодействие  $H_2O_2$  с белками. Доступность цистеинов для взаимодействия с  $H_2O_2$  зависит от структурных особенностей того или иного белка. Как правило, в белках, которые взаимодействуют с  $H_2O_2$  и участвуют в клеточном сигналинге, остатки цистеинов экспонированы и доступны для взаимодействия [68]. рН

среды и аминокислотное окружение цистеинового остатка влияют на степень депротонирования тиоловой группы (уравнение 7).

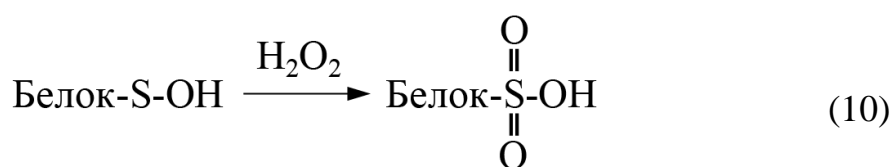
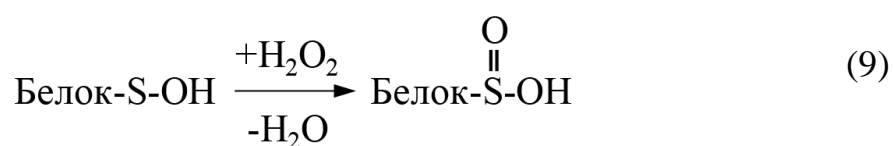


Положительно заряженные аминокислотные остатки, которые располагаются в непосредственной близости от цистеина, стабилизируют отрицательный заряд тиоловой группы и снижают ее  $pK_a$ . Большинство белков, которые вступают в специфическое взаимодействие с  $\text{H}_2\text{O}_2$ , содержат остатки цистеина с более низким значением  $pK_a$  тиоловой группы по сравнению с большинством тиоловых групп, встречающихся в составе различных макромолекул клетки и не участвующих в реакциях с  $\text{H}_2\text{O}_2$  [69]. Некоторые аминокислотные остатки определенных редокс-активных белков могут участвовать в стабилизации переходного состояния. Это служит дополнительным фактором, облегчающим протекание реакции между тиолом и  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Такие аминокислотные остатки были обнаружены в некоторых белках, которые высоко специализированы для взаимодействия с  $\text{H}_2\text{O}_2$ , например, у тиоловых пероксидаз [70].

При взаимодействии  $\text{H}_2\text{O}_2$  с тиолатами белков образуется сульфеновая кислота (уравнение 8).



Однако, данная модификация тиоловой группы неустойчива, она сразу подвергается дальнейшим модификациям или восстанавливается [71]. При избытке  $\text{H}_2\text{O}_2$  сульфеновая кислота окисляется до более стабильной сульфиновой кислоты, которая, в свою очередь, может окисляться до сульфоновой кислоты (уравнения 9, 10).



Обратимое формирование сульфиновой кислоты играет важную роль в регуляции активности пероксиредоксинов и других редокс-активных белков [72, 73]. В клетках эукариот сульфеновая кислота в составе пероксиредоксинов может вновь восстанавливаться до сульфеновой при участии сульфиредоксинов ( $\text{Srx}$ ) и белков семейства сестринов [74, 75]. Окисление сульфиновой кислоты до сульфоновой

необратимо, *in vivo* до сих пор не найдены системы, которые могли бы осуществлять обратную реакцию восстановления.

Сульфенаты белков могут вступать в реакцию с тиолатами низкомолекулярных соединений, например, с глутатионом, цистеином или коэнзимом А с образованием смешанных дисульфидов (уравнение 11).

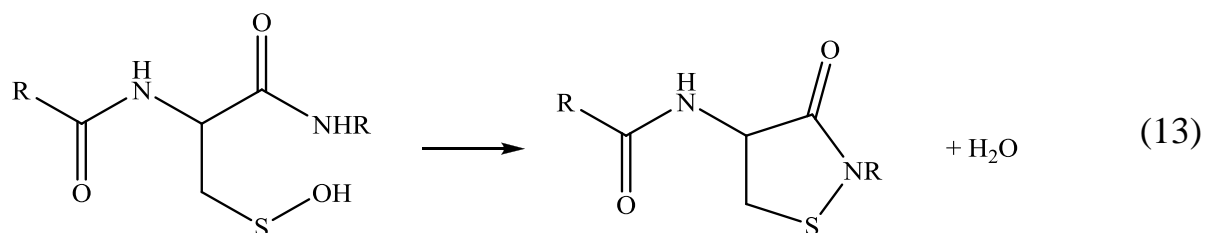


Глутатионирование является наиболее часто встречаемой модификацией в белках из-за высокой концентрации глутатиона в клетке. Регуляция функций многих клеточных белков осуществляется благодаря обратимому глутатионированию [76].

Сульфенаты могут взаимодействовать с близкорасположенными тиолатами этого же самого белка или других белков, что приводит к формированию внутримолекулярных или межмолекулярных дисульфидных связей (уравнение 12).



Образование циклического сульфаниламида возможно, если в близком окружении сульфената расположена амидная группа (уравнение 13).



Помимо прямых модификаций цистеиновых остатков различных белков эффект  $\text{H}_2\text{O}_2$  может быть опосредован через регуляцию соотношений восстановленной и окисленной форм глутатиона (GSH/GSSG) и тиоредоксина, которые участвуют в регуляции общего окислительно-восстановительного статуса клетки. Поскольку глутатион содержит тиоловую группу, то все реакции, которые были рассмотрены ранее, характерны и для этого низкомолекулярного соединения. Например, через тиол/дисульфидный обмен глутатиондисульфид может взаимодействовать с тиолатами белков (уравнение 14).



*In vivo* реакции тиол/дисульфидного обмена катализируются специализированным белком глутаредоксином (Grx) [76].

Все модификации белков, вызванные воздействием  $H_2O_2$ , обратимы в условиях *in vivo*, за исключением образования сульфоновой кислоты. Более того, существуют регулируемые клеточные системы, которые осуществляют контроль обратного восстановления этих модификаций. В большинстве случаев это происходит благодаря тиол/дисульфидному обмену с восстановленными глутатионом и тиоредоксином. Поэтому такие клеточные параметры, как соотношения восстановленной и окисленной форм глутатиона или тиоредоксина, и определяют продолжительность существования модификаций тиоловых групп белков.

Таким образом, сигнальная роль  $H_2O_2$  осуществляется благодаря способности этой молекулы обратимо модифицировать различные белки, регулируя тем самым их разнообразные функции. Время существования  $H_2O_2$  внутри клеток ограничено, что достигается благодаря работе специфичных белков антиоксидантных систем. Считается, что  $H_2O_2$  свободно диффундирует через клеточные мембраны. Однако изменения липидного и белкового состава мембран могут влиять на их проницаемость для  $H_2O_2$ , и, таким образом, на доступность биомолекул, с которыми может прореагировать  $H_2O_2$  [77].

Что касается других видов АФК,  $^1O_2$  и  $HO^\bullet$ , то на настоящий момент нет никаких сведений об их участии в клеточном сигналинге. Из-за высокой реакционной способности  $^1O_2$  и  $HO^\bullet$  неспецифично взаимодействуют со многими клеточными компонентами, выступая скорее в роли повреждающих агентов.

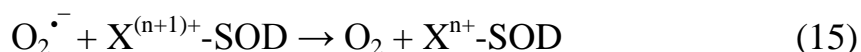
### 1.1.3. Антиоксидантные системы клеток

Антиоксидантные системы защищают клетки от окислительного стресса, который можно охарактеризовать как клеточный дисбаланс между окислителями и антиоксидантами в пользу первых [78]. В результате окислительного стресса в клетке могут происходить существенные изменения различных процессов и даже ее гибель. Но даже при нормальном физиологическом состоянии АФК постоянно образуются в клетках, в том числе и для выполнения регуляторных функций. Под антиоксидантными системами клетки подразумевают набор ферментов, поддерживающих общий окислительно-восстановительный баланс. Рассмотрим некоторые из них.

**Супероксиддисмутазы (SODs)** экспрессируются практически во всех аэробных клетках, как прокариотических, так и эукариотических [79]. Белки этого семейства являются первым рубежом защиты клеток от воздействия АФК, поскольку осуществляют реакцию дисмутации  $O_2^{\bullet -}$  в  $H_2O_2$ . В активном центре любой супероксиддисмутазы в качестве кофактора содержится ион переходного металла. У

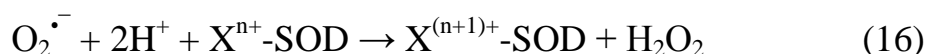
ферментов из разных источников в активном центре могут быть разные типы металлов. Для цитоплазмы эукариот характерна супероксиддисмутаза, содержащая ионы меди и цинка (Cu/Zn-SOD), причем в реакции дисмутации участвует только медь, а цинк нужен для стабилизации конформации белка [80, 81]. Для митохондрий характерен другой тип супероксиддисмутазы, который в активном центре содержит марганец (Mn-SOD) [82]. Прокариотический фермент также содержит марганец, но у прокариот имеется еще и железо-содержащая супероксиддисмутаза (Fe-SOD). Например, в клетках *E. coli* Fe-SOD синтезируется постоянно, в то время как концентрация Mn-SOD может колебаться в зависимости от концентрации кислорода [83, 84]. В клетках цианобактерий и *Streptomyces* обнаружили новую группу супероксиддисмутаз, которые содержат в активном центре никель (Ni-SOD) [85].

Реакция диспропорционирования  $O_2^{\bullet-}$  с участием SOD протекает в два этапа. На первой стадии происходит восстановление супероксидом окисленной формы фермента (уравнение 15)



где **X** обозначает один из возможных металлов в активном центре (Cu, Mn, Fe, Ni), а **n** обозначает его степень окисления.

Далее в присутствии другого  $O_2^{\bullet-}$  и двух  $H^+$  фермент вновь переходит в окисленную форму с образованием  $H_2O_2$  (уравнение 16) [81, 86-88].



Несмотря на то, что все SODs осуществляют катализ одной и той же вышеописанной реакции, разные представители этого класса ферментов не отличаются высокой степенью гомологии по первичной структуре, лишь между Mn-SOD и Fe-SOD существуют некоторые сходства [89].

Реакция дисмутации  $O_2^{\bullet-}$  может протекать более медленно и спонтанным образом без участия фермента.  $O_2^{\bullet-}$  при этом может прореагировать с самыми разными клеточными мишенями и нарушить их функции. Например, фермент цикла трикарбоновых кислот аконитаза инактивируется  $O_2^{\bullet-}$ , что может вызвать серьезные изменения в метаболизме клетки [90]. Поэтому высокая скорость ферментативной дисмутации  $O_2^{\bullet-}$  (константа скорости составляет около  $10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ), осуществляемая различными видами супероксиддисмутаз, необходима для быстрого удаления образующегося  $O_2^{\bullet-}$  [91]. Из-за высокой скорости данная реакция ограничена лишь диффузией  $O_2^{\bullet-}$  в клетке.

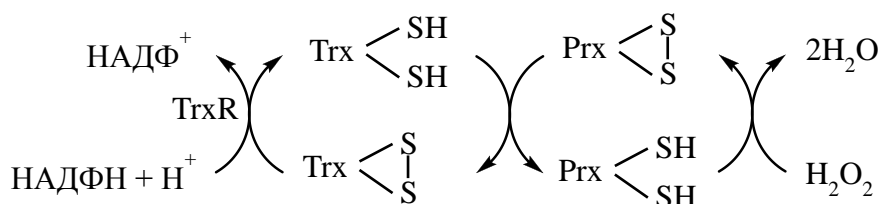
Образующийся  $\text{H}_2\text{O}_2$  в результате реакции дисмутации  $\text{O}_2^{\cdot -}$  также, как и другие АФК, обладает токсичным эффектом для клеток. Концентрация  $\text{H}_2\text{O}_2$  в клетках строго контролируется антиоксидантными системами. Это защищает клетки от повреждений, которые может вызывать  $\text{H}_2\text{O}_2$ , а также регулирует функции  $\text{H}_2\text{O}_2$  в качестве сигнальной молекулы.

**Каталазы** являются гем-содержащими ферментами, которые катализируют реакцию разложения  $\text{H}_2\text{O}_2$  до  $\text{H}_2\text{O}$  и  $\text{O}_2$  (уравнение 17) [92, 93].



Каталазы широко распространены и встречаются в клетках различных аэробных организмов.

Другим семейством белков, участвующих в деградации  $\text{H}_2\text{O}_2$ , являются **пероксиредоксины (Prx)**, которые катализируют восстановление  $\text{H}_2\text{O}_2$ , а также органических гидропероксидов и пероксинитрита [94, 95]. По количеству цистеиновых остатков в активном центре пероксиредоксины можно разделить на три класса: типичные двухцистеиновые (к которым относятся Prx1,2,3,4), атипичные двухцистеиновые (Prx5) и пероксиредоксины с содержанием лишь одного остатка цистеина в активном центре (Prx6) [95]. Все Prx объединяет схожий механизм катализа. При взаимодействии с  $\text{H}_2\text{O}_2$  происходит образование сульфеновой кислоты в активном центре [96]. В случае двухцистеиновых Prx образование сульфеновой кислоты при взаимодействии с  $\text{H}_2\text{O}_2$  приводит к формированию дисульфидной связи. Для одноцистеинового Prx6 образование дисульфида происходит за счет S-глутатионилирования с помощью глутатионтрансферазы [97]. Окисленные Prx могут быть вновь восстановлены тиоредоксиновой системой в случае Prx1-5. А для Prx6 характерно восстановление с использованием низкомолекулярных тиолов, например, глутатиона [98]. После чего цикл замыкается, и белки вновь способны нейтрализовать молекулы  $\text{H}_2\text{O}_2$ . На рисунке 5 изображена схема реакций с участием Prx.



**Рисунок 5. Схема цикла работы пероксиредоксинов**

Пероксиредоксин (Prx) восстанавливает  $\text{H}_2\text{O}_2$  и переходит в окисленное состояние с образованием дисульфидной связи, которую вновь восстанавливает тиоредоксин (Trx). Восстановление самого Trx осуществляет тиоредоксинредуктаза (TrxR) с использованием НАДФН.

Благодаря контролю уровня  $H_2O_2$  в клетке пероксиредоксины регулируют его функцию и в качестве сигнальной молекулы [99]. Активность самих Ptx может регулироваться в клетке благодаря посттрансляционным механизмам [100-102].

В клетке может происходить инактивация Ptx, поскольку сульфеновая кислота в активном центре фермента может прореагировать сразу со второй молекулой  $H_2O_2$  и окислиться до сульфиновой кислоты [102-104]. Это может происходить не только при избыточных концентрациях  $H_2O_2$ , но и при сравнительно небольших, благодаря специфичным аминокислотным остаткам в окружении активного центра [105, 106]. Сульфиновая кислота в активном центре Ptx вновь восстанавливается до свободного тиола благодаря АТФ-зависимой работе фермента **сульфиредоксина (Srx)** [74, 107]. При окислительном стрессе увеличивается экспрессия Srx. Восстановленные благодаря этому белку Ptx быстро удаляют  $H_2O_2$  и снимают угрозу окислительного повреждения клеточных макромолекул. Однако, временная пауза между инактивацией Ptx и их повторным восстановлением благодаря Srx может позволить  $H_2O_2$  успеть инициировать некоторые клеточные события через сигнальные каскады [108].

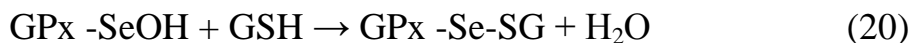
**Глутатионпероксидазы (GPx)** являются еще одной группой белков, участвующих в удалении  $H_2O_2$ . Реакция восстановления  $H_2O_2$  до  $H_2O$ , осуществляемая этой группой ферментов, сопряжена с окислением глутатиона (уравнение 18).



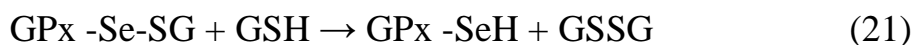
В активном центре GPx содержится селеноцистеин. Механизм реакции протекает в несколько этапов. На первом этапе селенол (SeH) остатка селеноцистеина окисляется  $H_2O_2$  до SeOH (уравнение 19).



SeOH взаимодействует с GSH с образованием селенилсульфида (уравнение 20).



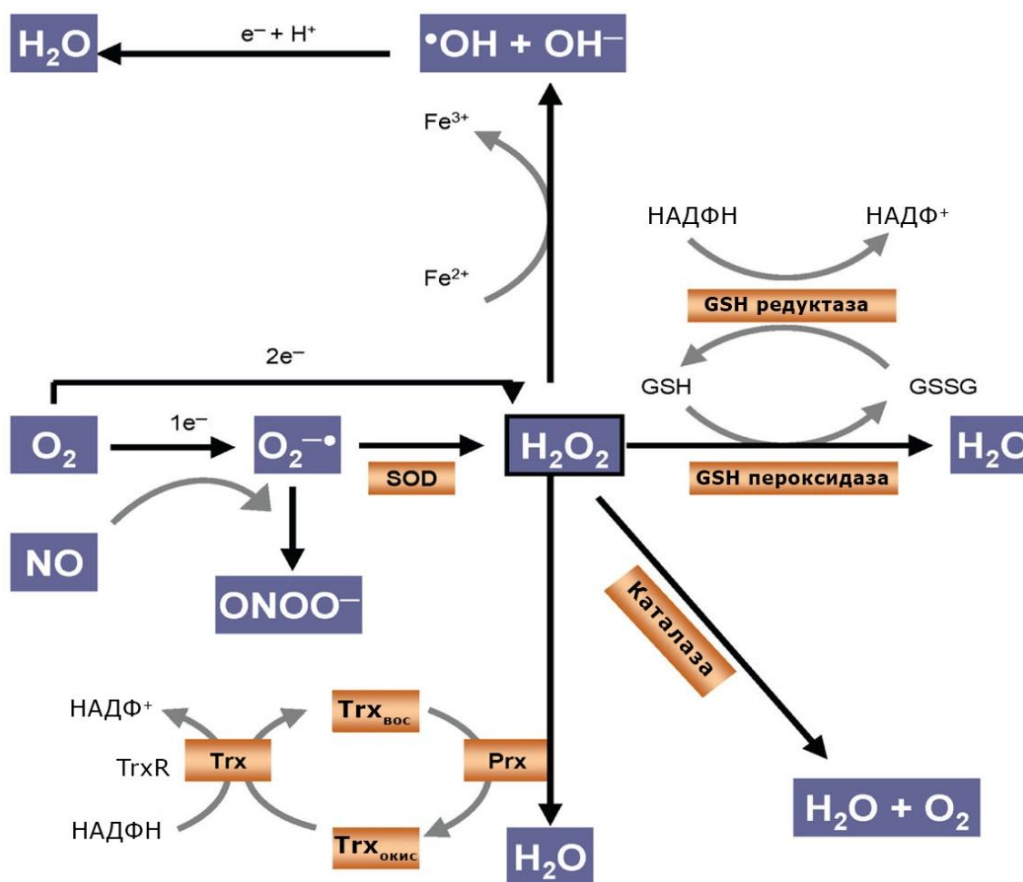
Взаимодействие со второй молекулой GSH вновь возвращает фермент в активное состояние для последующего взаимодействия с  $H_2O_2$  (уравнение 21) [109, 110].



GPx широко распространены в тканях животных. Помимо  $H_2O_2$  GPx могут взаимодействовать и с другими пероксидами, встречающимися в клетках [93].

Каталазы, пероксиредоксины и глутатионпероксидазы являются важнейшими регуляторами концентрации  $\text{H}_2\text{O}_2$  в живых системах. На рисунке 6 изображена обобщающая схема реакций с участием АФК, а также основные системы, которые участвуют в деградации  $\text{H}_2\text{O}_2$ .

Важной составляющей общего окислительно-восстановительного статуса клеток является регуляция тиол-дисульфидного обмена, корректирующего работу многих белков. В сложной регуляции этих процессов ключевую роль занимают тиоредоксин- и глутаредоксин-зависимые системы.



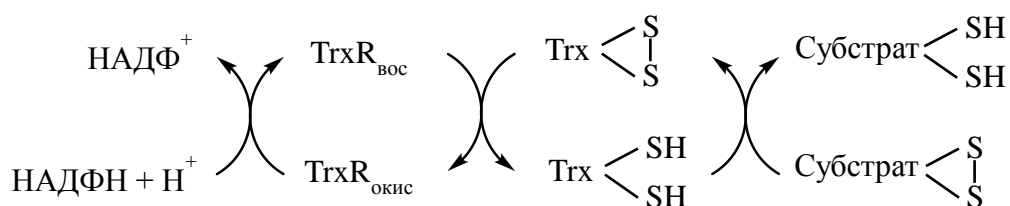
**Рисунок 6. Биохимические реакции АФК**

При одноэлектронном восстановлении  $\text{O}_2$  образуется  $\text{O}_2^{\cdot-}$ , который спонтанно или с помощью фермента супероксиддисмутазы (SOD) дисмутирует в  $\text{H}_2\text{O}_2$ . При взаимодействии  $\text{O}_2^{\cdot-}$  с NO образуется  $\text{ONOO}^-$ . Реакция Фентона с участием  $\text{H}_2\text{O}_2$  приводит к образованию  $\text{HO}\cdot$ . Каталаза, пероксиредоксин (Prx), глутатионпероксидаза участвуют в деградации  $\text{H}_2\text{O}_2$ . При этом окисленный Prx восстанавливает тиоредоксин (Trx), собственное восстановленное состояние которого поддерживается НАДФН-зависимой тиоредоксинредуктазой (TrxR). НАДФН-зависимая глутатионредуктаза восстанавливает окисленный глутатион (GSSG). Адаптировано из [11].

**Тиоредоксиновая система** включает в себя собственно тиоредоксин (Trx) и тиоредоксинредуктазу (TrxR).

Тиоредоксины образуют семейство небольших по размеру белков, обладающих оксидоредуктазной активностью. Благодаря двум остаткам цистеина в активном центре Trx участвуют в тиол-дисульфидном обмене с другими белками [111, 112]. Для Trx из разных источников характерно наличие консервативной аминокислотной последовательности в активном центре и в некоторых других позициях структуры [112]. Для клеток человека характерно наличие нескольких изоформ Trx. Выделяют цитозольную изоформу Trx1 [113], митохондриальную Trx2 [114], SpTrx, которую обнаружили в сперматозоидах [115] и секреторную Trx80 [112]. Защищая многие белки путем восстановления их дисульфидов от агрегации и инактивации, вызванных окислением, работа Trx является многофункциональной и крайне важной для многих клеточных процессов. Trx1, который чаще встречается в цитоплазме клеток, может также перемещаться в ядро [116], связываться с клеточной мембраной [117] и даже секретироваться наружу, где выступает в роли хемоаттрактанта [118] или ростового фактора [119] для некоторых типов клеток.

Перенос восстановительных эквивалентов из активного центра Trx на дисульфиды других клеточных белков в конечном итоге приводит к переходу Trx в окисленную форму с образованием дисульфида в активном центре уже самого Trx. Восстановление окисленных Trx осуществляется НАДФН-зависимыми тиоредоксинредуктазами (TrxR) [112, 120]. Принцип работы тиоредоксин-зависимой системы представлен на рисунке 7.



**Рисунок 7. Принцип работы тиоредоксин-зависимой системы**

*Тиоредоксин (Trx) восстанавливает дисульфидную связь субстрата и переходит в окисленную форму. Восстановление Trx осуществляет НАДФН-зависимая тиоредоксинредуктаза (TrxR).*

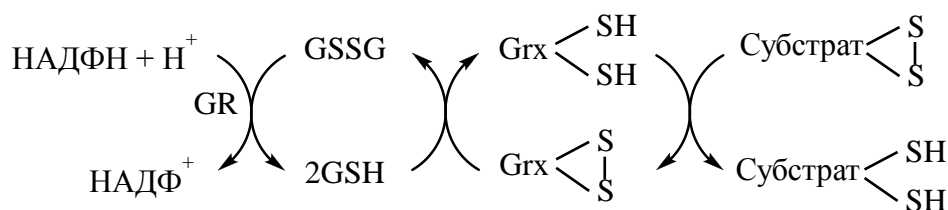
В клетках млекопитающих были выявлены цитоплазматическая TrxR1 изоформа, митохондриальная TrxR2 и уникальный фермент, который был назван тиоредоксинглутатионредуктазой (TGR), поскольку участвует в восстановлении Trx и GSSG одновременно [121-123]. Интересно, что в клетках *Drosophila melanogaster*

отсутствует глутатионредуктаза, которая восстанавливает окисленный пул глутатиона, эту функцию полностью берет на себя тиоредоксиновая система [124].

По первичной структуре TxrR млекопитающих имеет сходство с другими дисульфидоксидоредуктазами, такими как глутатионредуктаза, липоамиддегидрогеназа. Однако, только для TxrR характерно наличие селеноцистеин-содержащего домена [125]. Благодаря расшифровке кристаллической структуры TxrR1 стал известен механизм работы этого фермента, функционирующего в димерном состоянии. Восстановительные эквиваленты транспортируются от НАДФН через простетическую группу ФАД на дисульфид активного центра TxrR, расположенного в N-концевом домене одной субъединицы. Далее перенос электронов осуществляется на селеноцистеин-содержащий активный центр другой субъединицы, а затем уже на субстрат [126].

Помимо самого тиоредоксина TxrR млекопитающих могут восстанавливать большое количество других белков и низкомолекулярных соединений. Кроме того, TxrR1 может восстанавливать  $H_2O_2$  при больших его концентрациях в клетке, а также гидроперекиси липидов. Это служит дополнительным механизмом защиты при окислительном стрессе [127, 128].

Функции тиоредоксиновой системы клетки во многом перекрываются с **глутаредоксин-зависимой системой**, которая также имеет огромное значение для антиоксидантной защиты клетки. Компонентами этой системы являются глутаредоксин (Grx), который участвует в реакциях тиол/дисульфидного обмена. Окисленный Grx восстанавливается не ферментативным путем благодаря пулу восстановленного глутатиона (GSH). Окисленный глутатион (GSSG), в свою очередь, восстанавливает специальный фермент глутатионредуктаза (GR). На рисунке 8 представлена схема работы глутаредоксин-зависимой системы.



**Рисунок 8. Принцип работы глутаредоксин-зависимой системы**

*Глутаредоксин (Grx) восстанавливает дисульфидную связь субстрата, окисляясь при этом. Восстановленный глутатион (GSH) не ферментативным путем восстанавливает Grx. НАДФН-зависимая глутатионредуктаза (GR) поддерживает восстановленный пул глутатиона.*

Глутаредоксины (Grx) относят к суперсемейству тиоредоксинов. Они найдены практически во всех таксономических группах и демонстрируют высокую степень гомологии [129].

Восстановление клеточных дисульфидов благодаря Grx может протекать по монотиольному или дитиольному механизмам. В первом случае участвует один остаток цистеина в активном центре, во втором случае - два остатка. В случае дитиольного механизма сначала один остаток цистеина, расположенный в активном центре Grx ближе к N-концу, участвует в образовании смешанного дисульфида с субстратом. Затем второй остаток депротонируется и формирует дисульфид с первым остатком, в результате этого Grx переходит в окисленную форму с одновременным восстановлением субстрата. В качестве субстратов для Grx могут выступать дисульфиды белков или низкомолекулярные соединения [129]. При монотиольном механизме в реакции участвует только один остаток цистеина, который ближе к N-концу. По монотиольному механизму Grx восстанавливает смешанные дисульфиды белков или глутатионилированные белки [129].

В клетках млекопитающих выделяют цитоплазматическую изоформу Grx1 и две митохондриальные Grx2 и Grx5 [129-131]. Grx2 содержит [2Fe-2S] кластер, который участвует в связывании двух молекул Grx2. В димерном состоянии белок не проявляет активности, однако, при окислительном стрессе образуются функционально активные мономеры Grx2 [132].

Восстановление Grx с помощью глутатиона приводит к тому, что в клетке накапливается окисленная форма глутатиона (GSSG). Восстановление Grx протекает без участия какого-либо фермента. Но для обратного восстановления глутатиона и поддержания общего клеточного GSH/GSSG соотношения требуется консервативный фермент глутатионредуктаза (GR). GR имеет некоторое сходство с TrxR и представляет собой ФАД-содержащий фермент, использующий восстановительные эквиваленты НАДФН для восстановления GSSG [133-135].

Таким образом, рассмотренные выше антиоксидантные системы выполняют важнейшую функцию в поддержании клеточного окислительно-восстановительного гомеостаза, от которого зависит большинство внутриклеточных процессов. Помимо основных систем, описанных выше, в роли антиоксидантов могут выступать различные низкомолекулярные вещества. Помимо глутатиона это могут быть аскорбиновая кислота [136, 137],  $\alpha$ -токоферол [138, 139] и некоторые другие.

#### 1.1.4. Химические методы регистрации АФК

Основные трудности изучения роли АФК в жизни клеток связаны с их высокой реакционной способностью и, следовательно, коротким временем существования. Отсутствие подходящих методов долгое время препятствовало исследованию роли АФК в различных механизмах внутриклеточной передачи сигнала, изучению их динамики и локализации. В настоящее время существуют различные методы, которые используют для регистрации АФК. Рассмотрим некоторые из наиболее распространенных.

##### *Колориметрические методы*

Общий принцип использования хромогенных индикаторов основан на том, что при взаимодействии с некоторыми видами АФК их оптические свойства изменяются. Для колориметрических методов определения АФК характерны довольно низкая чувствительность и высокая вероятность появления артефактов в измерении, которые необходимо учитывать при интерпретации результатов.

**Цитохром-с (феррицитохром с)** используется для регистрации в системе  $O_2^{\cdot-}$ . Реакция возможна благодаря свойству  $O_2^{\cdot-}$  восстанавливать некоторые соединения. В случае феррицитохрома-с [Fe(III)],  $O_2^{\cdot-}$  восстанавливает его до ферроцитохрома-с [Fe(II)], при этом поглощение при 550 нм увеличивается [140].

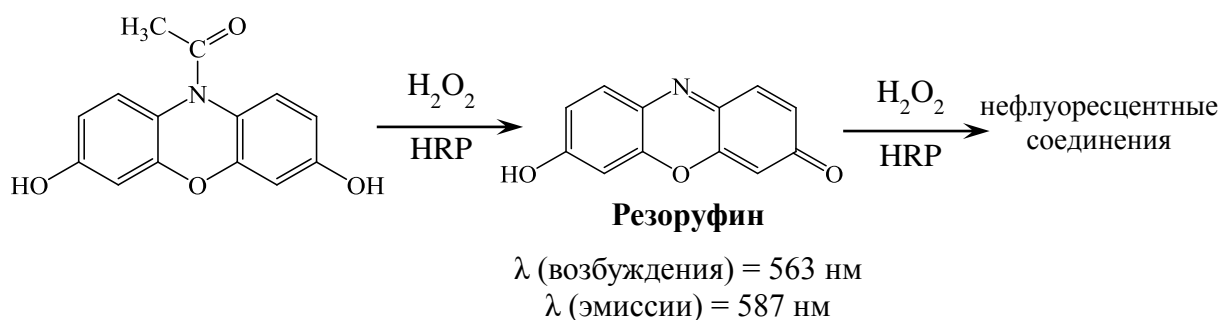
Кроме цитохрома-с используют **соли тетразолия**, которые тоже восстанавливаются  $O_2^{\cdot-}$ , в результате чего эти индикаторы претерпевают структурные изменения и приобретают окрашивание [140]. Для изучения нейтрофилов более широкое применение получил **тетразолиевый синий (NBT, nitroblue tetrazolium)**. Посредством эндоцитоза желто-окрашенный NBT попадает внутрь стимулированных нейтрофилов. При взаимодействии индикатора с  $O_2^{\cdot-}$  образуется водонерастворимое соединение формазан с максимумом поглощения при 560 нм. Формазан образуется не прямым способом, а через промежуточный нестабильный тетразоил радикал. При взаимодействии тетразоил радикала с  $O_2$  может образовываться  $O_2^{\cdot-}$ . Другой важный недостаток NBT заключается в том, что некоторые клеточные восстановители, как глутатион или НАДФН, могут его восстанавливать [140, 141]. Созданы и более улучшенные индикаторы на основе солей тетразолия, которые, тем не менее, не решают всех имеющихся проблем. Например, проблема восстановления индикатора другими компонентами независимо от  $O_2^{\cdot-}$  по-прежнему остается актуальной [142].

### Флуоресцентные красители

Для изучения АФК широко применяются флуоресцентные красители. Принцип работы таких индикаторов основан на изменении их интенсивности флуоресценции при взаимодействии с АФК.

**Скополетин** (7-гидрокси-6-метоксикумарин) является флуоресцентным веществом с максимумом эмиссии 460 нм и возбуждением 360 нм. Скополетин теряет свои флуоресцентные свойства при окислении  $H_2O_2$ , но для протекания реакции необходимо наличие пероксидазы хрена (HRP, Horseradish peroxidase). Кроме того, данный краситель неустойчив в биологических средах. Известно, что флуоресценция этого соединения зависит от pH, температуры среды и поэтому может неспецифично изменяться в биологических образцах в ходе эксперимента. К недостаткам метода относятся высокий уровень фона и низкая чувствительность. Другая проблема заключается в том, что многие восстановленные компоненты, как НАДН, НАДФН, глутатион, аскорбиновая кислота, могут мешать детекции, влияя на уровень сигнала индикатора [143].

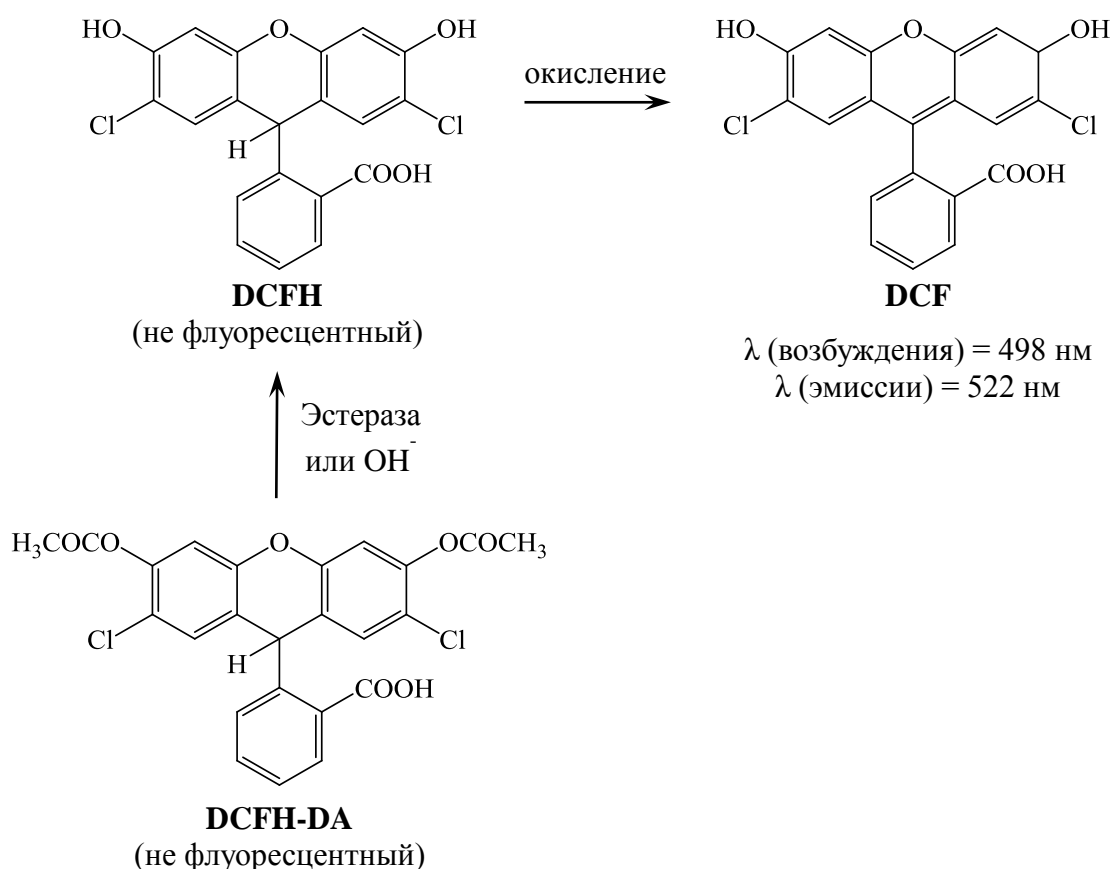
Благодаря высокой специфичности **Amplex Red** является одним из наиболее популярных экстраклеточных флуоресцентных красителей для регистрации  $H_2O_2$ . Данное соединение, химическое название которого N-ацетил-3,7-дигидроксифеноксазин, также является субстратом для пероксидазы хрена (HRP). При окислении вещество становится флуоресцентным с максимум эмиссии около 587 нм и возбуждением 563 нм. На рисунке 9 изображена структура и реакция этого красителя с  $H_2O_2$ .



**Рисунок 9. Реакция окисления красителя Amplex Red**

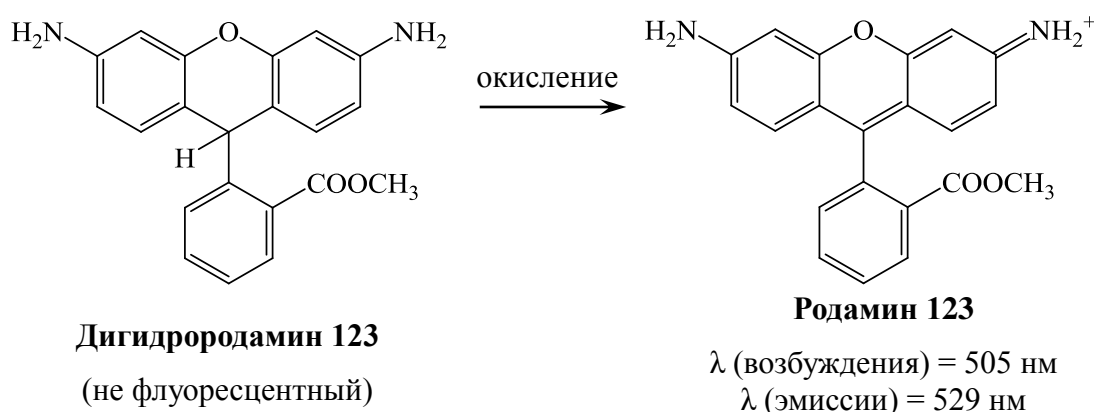
По своей чувствительности Amplex Red по меньшей мере в 10 раз превосходит скополетин и позволяет регистрировать концентрации  $H_2O_2$  от 50 нМ. Кроме того, он более стабилен. Главным же его недостатком является тот факт, что флуоресцентная форма красителя (резорурфин) в присутствии пероксидазы может быть повторно окислена с образованием нефлуоресцентных соединений [140, 144].

**2,7-дихлордигидрофлуоресцеин (DCFH)** изначально подразумевался как специфичный индикатор для регистрации  $H_2O_2$ , однако и другие виды АФК, такие как  $HO^\bullet$ ,  $ROO^\bullet$ ,  $ONOO^-$  влияют на флуоресцентный сигнал красителя. При окислении DCFH образуется 2,7-дихлорфлуоресцеин (DCF), обладающий флуоресцентными свойствами (максимум возбуждения 498 нм, эмиссии 522 нм). DCFH не проникает внутрь клетки, что обусловлено наличием заряда. Поэтому чаще используют более стабильный и легко диффундирующий сквозь клеточную мембрану его диацетат (DCFH-DA), который затем энзиматическим путем гидролизуется внутриклеточными эстеразами до DCFH. На рисунке 10 приведены реакции гидролиза DCFH-DA и последующего окисления DCFH. Окисление DCFH происходит в присутствии пероксидаз. Есть также данные о том, что краситель подвержен воздействию со стороны различных клеточных окислителей [143]. Суммируя вышесказанное, DCFH является скорее индикатором на общий окислительный стресс, а не на конкретные виды АФК [140, 143].



**Рисунок 10.** Реакция гидролиза диацетата DCFH (DCFH-DA) до DCFH и последующая его реакция окисления до образования флуоресцентного DCF

**Дигидрородамин 123 (DHR)** обладает схожим принципом работы с DCFH. Вещество является липофильным соединением, которое легко проникает через клеточные мембраны клеток и накапливается в них. При окислении DHR превращается во флуоресцирующий родамин 123 (возбуждение 505 нм, эмиссия 529 нм). При окислении одна из аминогрупп красителя приобретает заряд, что и препятствует его выходу из клетки в окисленной форме. На рисунке 11 приведена реакция окисления DHR. Как и в случае DCFH, главным недостатком DHR является его неспецифичное окисление внутри клетки. Окисление происходит благодаря  $\text{H}_2\text{O}_2$  в присутствии пероксидаз, но также может происходить с участием  $\text{ONOO}^-$ ,  $\text{HOCl}$ , цитохрома с и ряда других соединений [143, 145, 146].

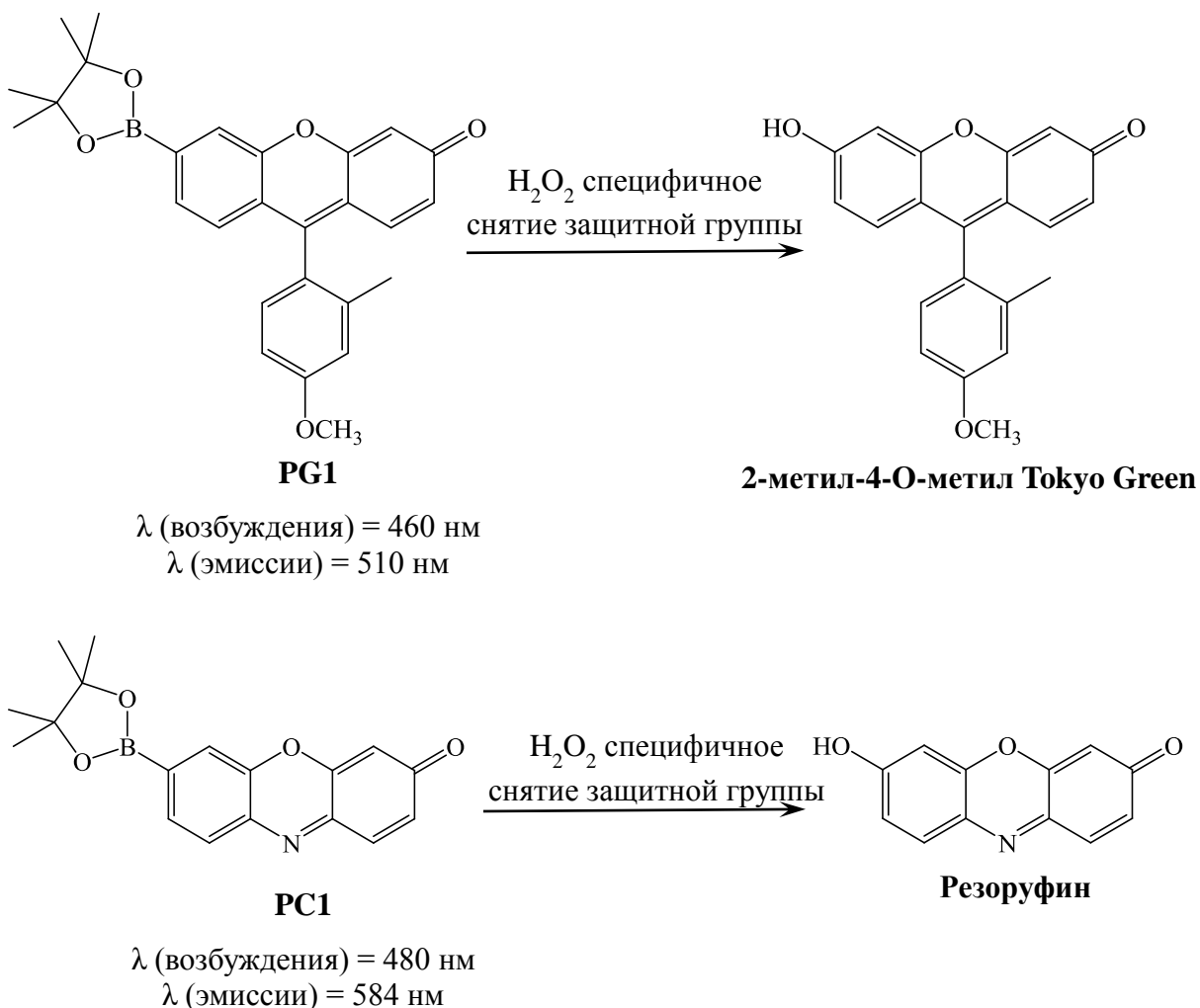


**Рисунок 11. Реакция окисления дигидрородамина 123 (DHR) во флуоресцентный родамин 123.**

Специфичными к  $\text{H}_2\text{O}_2$  флуоресцентными красителями являются **Peroxy Green 1 (PG1)** (максимум возбуждения 460 нм, эмиссии 510 нм) и **Peroxy Crimson (PC1)** (максимум возбуждения 480 нм, эмиссии 584 нм). Прямое взаимодействие этих индикаторов с  $\text{H}_2\text{O}_2$  приводит к многократному увеличению интенсивности их флуоресценции, благодаря снятию защитной боронатной группы [147, 148]. Реакции взаимодействия PG1 и PC1 с  $\text{H}_2\text{O}_2$  представлены на рисунке 12.

Помимо высокой селективности, PG1 и PC1 обладают еще одним значительным преимуществом. Для них характерна высокая чувствительность, что позволяет их использовать при регистрации низких концентраций эндогенного  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Например, их использовали для регистрации  $\text{H}_2\text{O}_2$ , образующегося в живых клетках при стимуляции ростовыми факторами [147]. Однако, небольшая скорость реакции взаимодействия  $\text{H}_2\text{O}_2$  с PG1 и PC1 (константа скорости около  $1 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$ ), а также необратимое протекание данной реакции не позволяют изучать динамику изменения концентрации  $\text{H}_2\text{O}_2$  внутри клетки в режиме реального времени с применением этих красителей [148].

Существуют и другие флуоресцентные красители, которые предназначены для регистрации иных видов АФК.

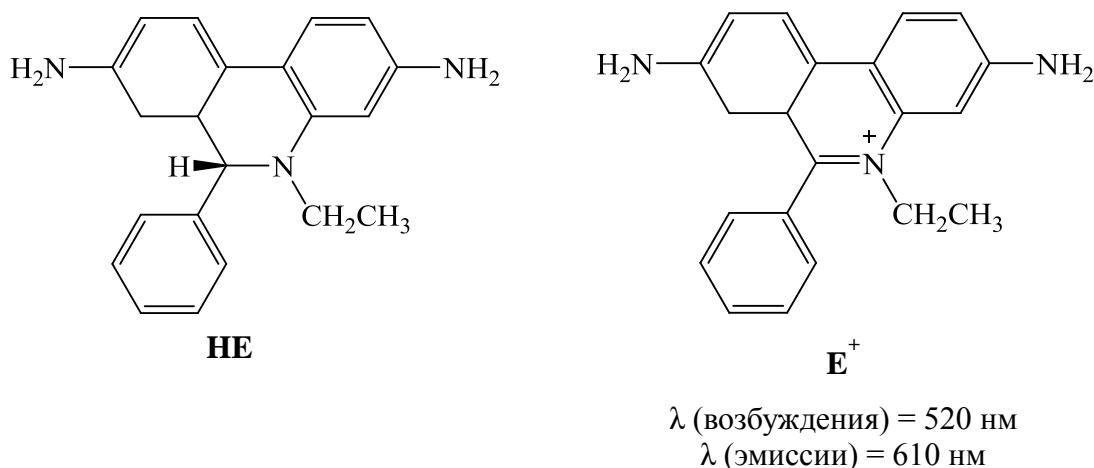


**Рисунок 12. Реакции взаимодействия красителей Peroxy Green 1 (PG1) и Peroxy Crimson (PC1) с  $\text{H}_2\text{O}_2$**

**Гидроэтидин (дигидроэтидиум, HE)** – флуоресцентный индикатор, который изначально был предназначен для регистрации  $\text{O}_2^{\cdot-}$ . При окислении гидроэтидина образуется этидиум ( $\text{E}^+$ ) (максимум возбуждения 520 нм, эмиссии 610 нм) [143]. Химические структуры гидроэтидина и этидиума представлены на рисунке 13.

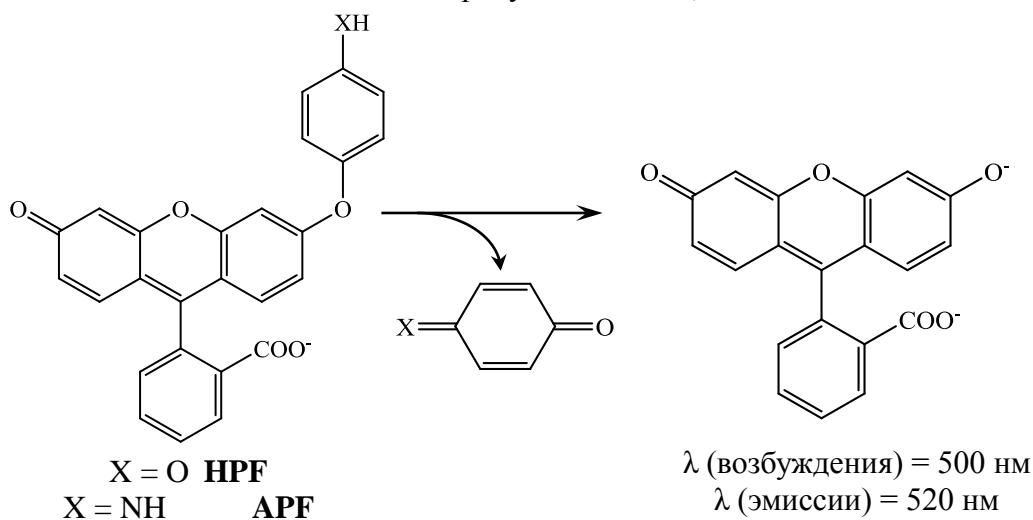
Неспецифичная реакция окисления является главным серьезным недостатком этого красителя [143]. Позднее было обнаружено, что реакция HE с  $\text{O}_2^{\cdot-}$  приводит к образованию флуоресцентного продукта, который отличается от  $\text{E}^+$ . Максимум эмиссии обнаруженного компонента составляет 567 нм, а не 610 нм. Что характерно, только при взаимодействии с  $\text{O}_2^{\cdot-}$  происходит специфичное образование соединения с максимумом эмиссии флуоресценции 567 нм [149]. Тем не менее, окисление HE другими компонентами клетки сильно затрудняет интерпретацию результатов, даже несмотря на

то, что окисление красителя с участием  $O_2^{\cdot-}$  очевидно происходит по отличному механизму.



**Рисунок 13. Химические структуры гидроэтидина (слева) и этидиума (справа)**

Существуют флуоресцентные красители, которые используют для регистрации такого реакционного вида АФК, как  $HO^{\cdot}$ . Примерами являются **2-[6(4-гидрокси)фенокси-3Н-ксантен-3-он-9-ил]бензойная кислота (HPF)** и **2-[6(4-амино)фенокси-3Н-ксантен-3-он-9-ил]бензойная кислота (APF)**. По своей природе HPF и APF являются не флуоресцентными производными флуоресцеина. В результате реакции O-деарилирования этих соединений образуется флуоресцеин (максимум возбуждения 500 нм, эмиссии 520 нм) [143, 150]. Реакция деарилирования HPF и APF представлена на рисунке 14. Оба красителя увеличением интенсивности флуоресценции детектируют образование  $HO^{\cdot}$  в реакции Фентона. Для обоих индикаторов также характерна реакция с  $ONOO^-$ , а для APF еще и с  $HOCl$ . Но при этом сигналы APF и HPF не изменяются в присутствии  $H_2O_2$ ,  $O_2^{\cdot-}$ ,  $^{\cdot}NO$ ,  $ROO^{\cdot}$  [143].



**Рисунок 14. Реакция O-деарилирования HPF и APF с образованием флуоресцеина**

### Люминесцентные индикаторы

При взаимодействии с некоторыми АФК люминесцентные индикаторы испускают кванты света. Наиболее популярными являются люминол и люцигенин.

**Люминол** в присутствии пероксидазы (например, пероксидазы хрена) окисляется до люминол радикала, который восстанавливает, в свою очередь,  $O_2$  до  $O_2^{\cdot-}$ . Образующиеся  $O_2^{\cdot-}$  реагируют со свободными люминол радикалами. Продуктом реакции люминол радикала с  $O_2^{\cdot-}$  является нестабильный эндопероксид, в результате распада которого выделяется молекула  $N_2$  и образуется аминфталлат, находящийся в возбужденном состоянии. При переходе аминфталлата в основное состояние из возбужденного происходит испускание фотона [140, 151, 152]. На рисунке 15 отображена последовательность всех реакций люминола. Сложная и неспецифичная реакция люминола являются главными недостатками данного метода [140].

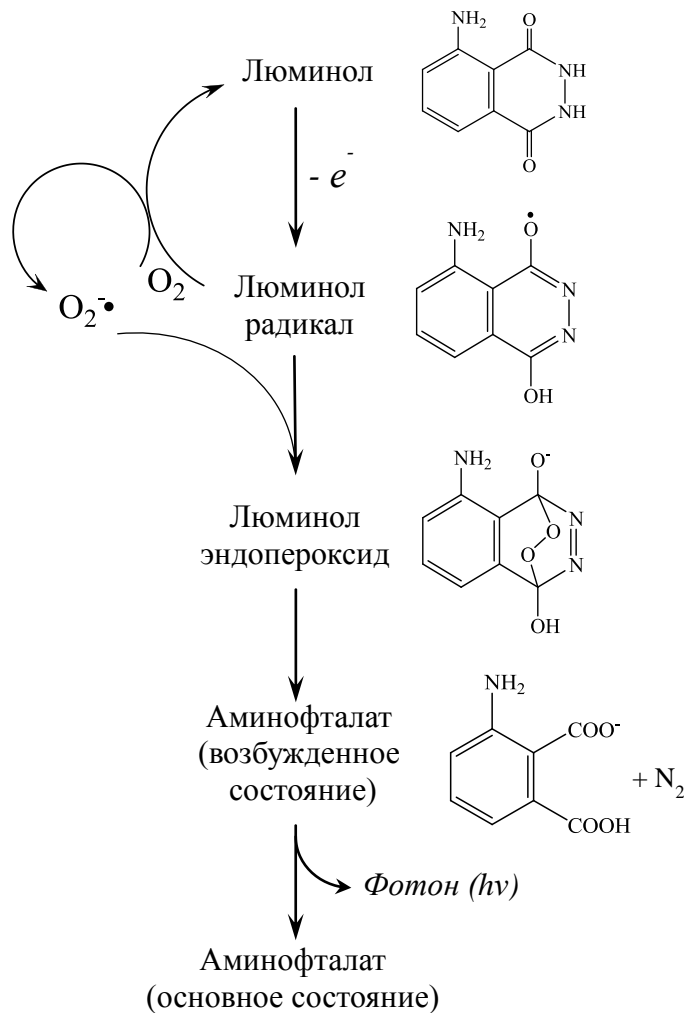
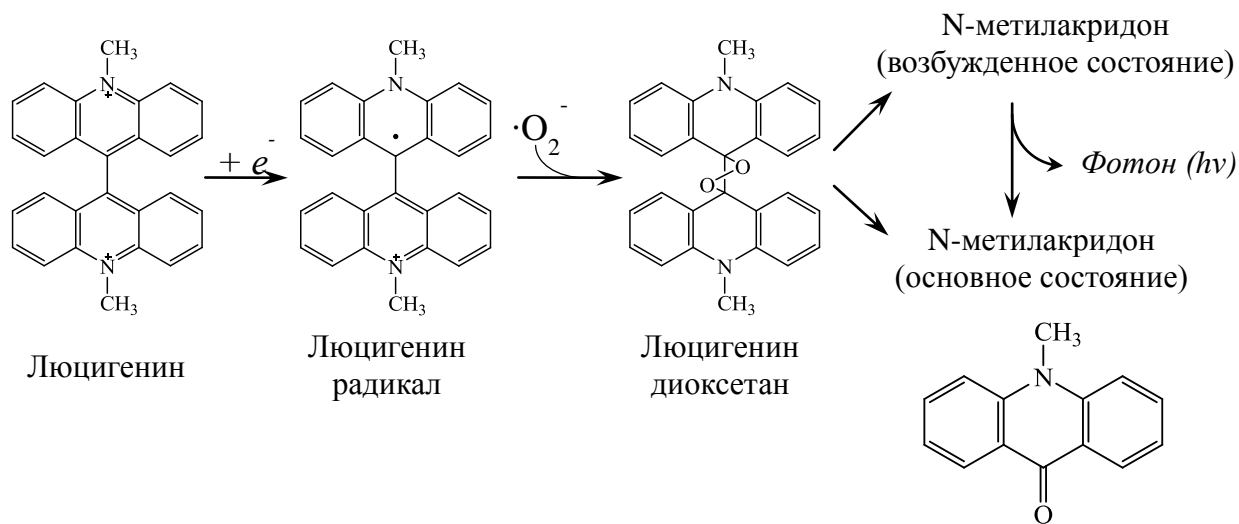


Рисунок 15. Схема принципа работы люминесцентного индикатора люминола

**Люцигенин** используют для регистрации экстраклеточного  $O_2^{\cdot-}$ . При одноэлектронном восстановлении образуется люцигенин радикал, который и взаимодействует с  $O_2^{\cdot-}$ . В ходе этой реакции формируется нестабильный промежуточный продукта диоксетан, который распадается на две молекулы N-метилакридона. Одна из молекул метилакридона образуется сразу в возбужденном электронном состоянии, при релаксации в основное состояние происходит испускание фотона [140, 151, 152]. Последовательность реакций люцигенина изображена на рисунке 16.



**Рисунок 16. Схема принципа работы люминесцентного индикатора люцигенина**

Люцигенин радикал может реагировать с  $O_2$ , образуя дополнительный  $O_2^{\cdot-}$ . Но по некоторым данным образование  $O_2^{\cdot-}$  самим индикатором незначительно [140]. Среди других представителей люминесцентных индикаторов можно отметить также **L-012**, который крайне не специфичен, и **MCLA**, детектирующего внеклеточные  $O_2^{\cdot-}$  и  $^1O_2$ . MCLA подвержен автоокислению и сам может участвовать в генерации  $O_2^{\cdot-}$  [140].

В настоящей работе перечислен далеко не полный перечень всех существующих методов для регистрации различных видов АФК. Некоторые из них нашли успешное применение в научных исследованиях. Но, тем не менее, в данной области остаются проблемы, связанные с недостатками существующих методов. Для понимания роли АФК в живых системах по-прежнему требуются высокоселективные и высокочувствительные индикаторы, способные обратимым образом работать в живых системах, не вызывая при этом токсичного эффекта и неспецифических реакций. Открытие флуоресцентных белков привело к созданию сенсоров нового поколения, работающих по совершенно иному принципу. Создается все больше таких сенсоров для регистрации различных окислительно-восстановительных процессов, в том числе и для

изучения АФК. Генетически кодируемые флуоресцентные сенсоры во многом превосходят доступные на сегодняшний день методы. Они не нарушают целостности клеток и поэтому успешно применяются для решения самых разнообразных задач. Обо всех достоинствах и примерах таких биосенсоров речь пойдет в отдельной главе.

## 1.2. ОСНОВНЫЕ РЕДОКС ПАРЫ КЛЕТКИ

Многие окислительно-восстановительные процессы клетки сопряжены в единый тонко регулируемый сложный механизм. При этом чаще всего отдельные компоненты этого механизма, будь то реакции или соединения, не взаимодействуют друг с другом прямым образом. Клеточное дыхание служит этому наглядным примером. Клетка постоянно запасает энергию благодаря одним окислительно-восстановительным реакциям и одновременно высвобождает ее благодаря уже другим, этот процесс непрерывен. В ходе окисления различных молекул, осуществляемого главным образом такими сложными процессами как гликолиз, цикл Кребса,  $\beta$ -окисление жирных кислот, высвобождаются восстановительные эквиваленты. Дыхательная цепь митохондрий является одним из главных потребителей восстановительных эквивалентов, которые ей необходимы для создания трансмембранного протонного потенциала, используемого в свою очередь для синтеза молекулы АТФ как универсального источника энергии всех биохимических реакций. Связь между разными процессами осуществляют особые соединения, главная функция которых заключается в переносе восстановительных эквивалентов от одного процесса к другому. В клеточном дыхании главным таким связующим звеном является молекула никотинамидадениндинуклеотида (НАД). В клетке НАД одновременно пребывает в окисленном ( $\text{НАД}^+$ ) и восстановленном (НАДН) состояниях, выступая соответственно акцептором и донором восстановительных эквивалентов в совершенно разных реакциях.  $\text{НАД}^+$  и НАДН называют редокс парой, а величина соотношения  $\text{НАД}^+/\text{НАДН}$  является важным клеточным параметром.  $\text{НАДФ}^+/\text{НАДФН}$  еще один пример редоксы пары, функции которой иногда перекрываются с  $\text{НАД}^+/\text{НАДН}$ . В реакциях уже рассмотренного в предыдущей части тиол-дисульфидного обмена важным участником является молекула глутатиона, также образующая активную редокс пару GSSG/GSH. Соотношения окисленной и восстановленной форм характерны для многих клеточных метаболитов, например, тот же пируват/лактат. Но редокс пары, образуемые НАД(Ф) и глутатионом, взаимодействуют с самыми разнообразными компонентами и поэтому универсальны.

Значимая часть настоящей работы посвящена созданию метода для регистрации динамики изменения соотношения  $\text{NAD}^+/\text{NADH}$  в живых системах. Поэтому в этой части обзора литературы мы более подробно остановимся на роли этого параметра в клетке, но также поговорим и о других.

### 1.2.1. Соотношение $\text{NAD}^+/\text{NADH}$

Клеточное соотношение  $\text{NAD}^+/\text{NADH}$  является ключевым параметром, который отражает общее окислительно-восстановительное состояние клеток. В связи с отсутствием подходящих методов изучения долгое время было принято считать, что основная функция молекулы НАД заключается в ее участии в клеточных процессах энергетического обмена. Но оказалось, что функции этой молекулы гораздо разнообразнее и затрагивают широкий спектр проблем. Благодаря НАД-зависимой регуляции активности многих ферментов таких, как различные дегидрогеназы, моно(АДФ-рибозил)трансферазы, АДФ-рибозилциклазы, сиртуины и другие [153], от соотношения  $\text{NAD}^+/\text{NADH}$  зависят многие важные клеточные процессы, в том числе клеточная смерть [154, 155], экспрессия некоторых генов [156], клеточный сигналинг [153, 157].

#### 1.2.1.1. Структурные особенности НАД, синтез и транспорт

По химической структуре молекула  $\beta$ -никотинамидадениндинуклеотида (НАД) представляет собой динуклеотид, состоящий из аденина и амида никотиновой кислоты, которые соединены между собой через два остатка D-рибозы и два остатка фосфорной кислоты. На рисунке 17 представлены структуры окисленной ( $\text{NAD}^+$ ) и восстановленной (НАДН) форм этой молекулы, а также их взаимный переход.

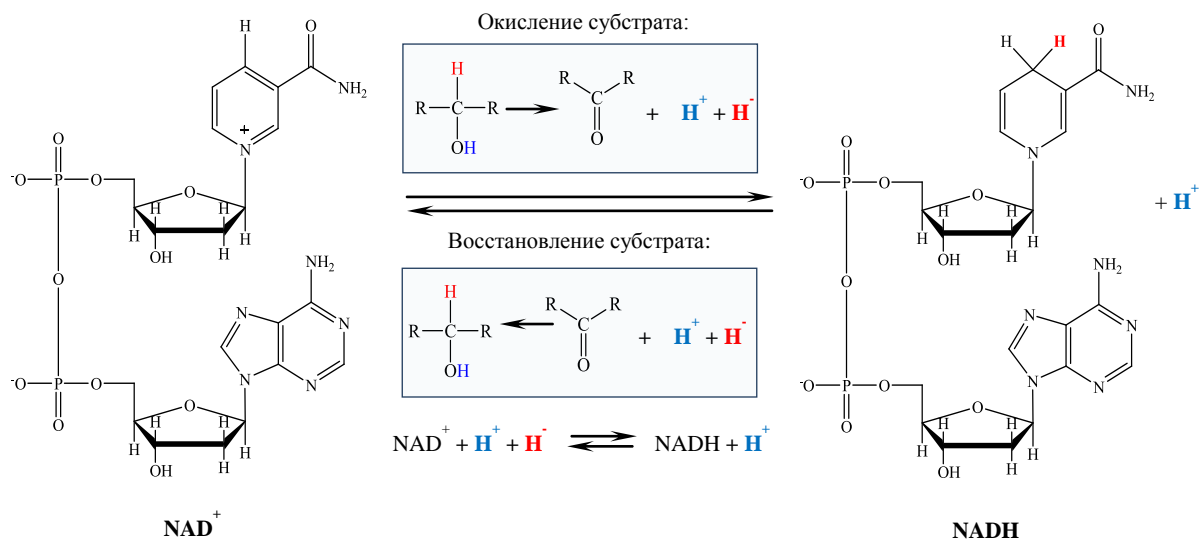


Рисунок 17. Структуры  $\text{NAD}^+$  и НАДН. Схема их взаимного превращения

НАД<sup>+</sup> способствует удалению от окисляемого субстрата двух атомов водорода в виде протона Н<sup>+</sup> и гидрид иона Н<sup>-</sup>. При этом Н<sup>+</sup> высвобождается в окружающую среду. Один электрон Н<sup>-</sup> перемещается к азоту никотинамидного кольца, заряжая его, а оставшийся атом водорода присоединяется к четвертому по положению атому углерода, напротив азота. Этот процесс обратим, и восстановленная молекула НАДН в дальнейшем может передавать восстановительные эквиваленты этому же или другому окисленному субстрату [158].

Для большинства тканей общая концентрация НАД<sup>+</sup> и НАДН составляет примерно 10<sup>-5</sup> М [158]. Но более важным клеточным параметром является именно соотношение окисленной и восстановленной форм данного кофактора. От этого зависят многие метаболические процессы. В митохондриях соотношение НАД<sup>+</sup>/НАДН может изменяться в пределах от 7-8 до 1, в то время как в цитоплазме величина этого параметра может иметь более широкий диапазон изменений: от 700 до 1 [153, 159, 160].

В клетках существует несколько путей синтеза НАД<sup>+</sup>. В самом простом случае молекула НАД может быть получена из уже имеющихся в клетке никотинамидсодержащих молекул [153], например, из молекулы витамина ниацина [161]. При недостатке ниацина в клетках млекопитающих никотинамидсодержащие молекулы могут синтезироваться из более простых соединений. L-триптофан может быть превращен в L-кинуренин, который в дальнейшем преобразуется в хинолиновую кислоту. Хинолиновая кислота превращается в никотинат мононуклеотид [153, 162]. Ключевым ферментом синтеза НАД, независимо по какому пути он происходит, является мононуклеотид аденилтрансфераза (NMNAT). NMNAT осуществляет обратимую реакцию синтеза НАД из никотинамид мононуклеотида с использованием энергии АТФ [162, 163].

В настоящий момент известно несколько изоформ мононуклеотид аденилтрансфераз с разной локализацией в клетке: ядерная NMNAT-1, митохондриальная NMNAT-3 и NMNAT-2, локализованная в аппарате Гольджи [162-164]. Подобная компартментализация изоформ этого фермента может свидетельствовать об осуществлении независимого синтеза НАД в соответствующих органеллах клетки [163].

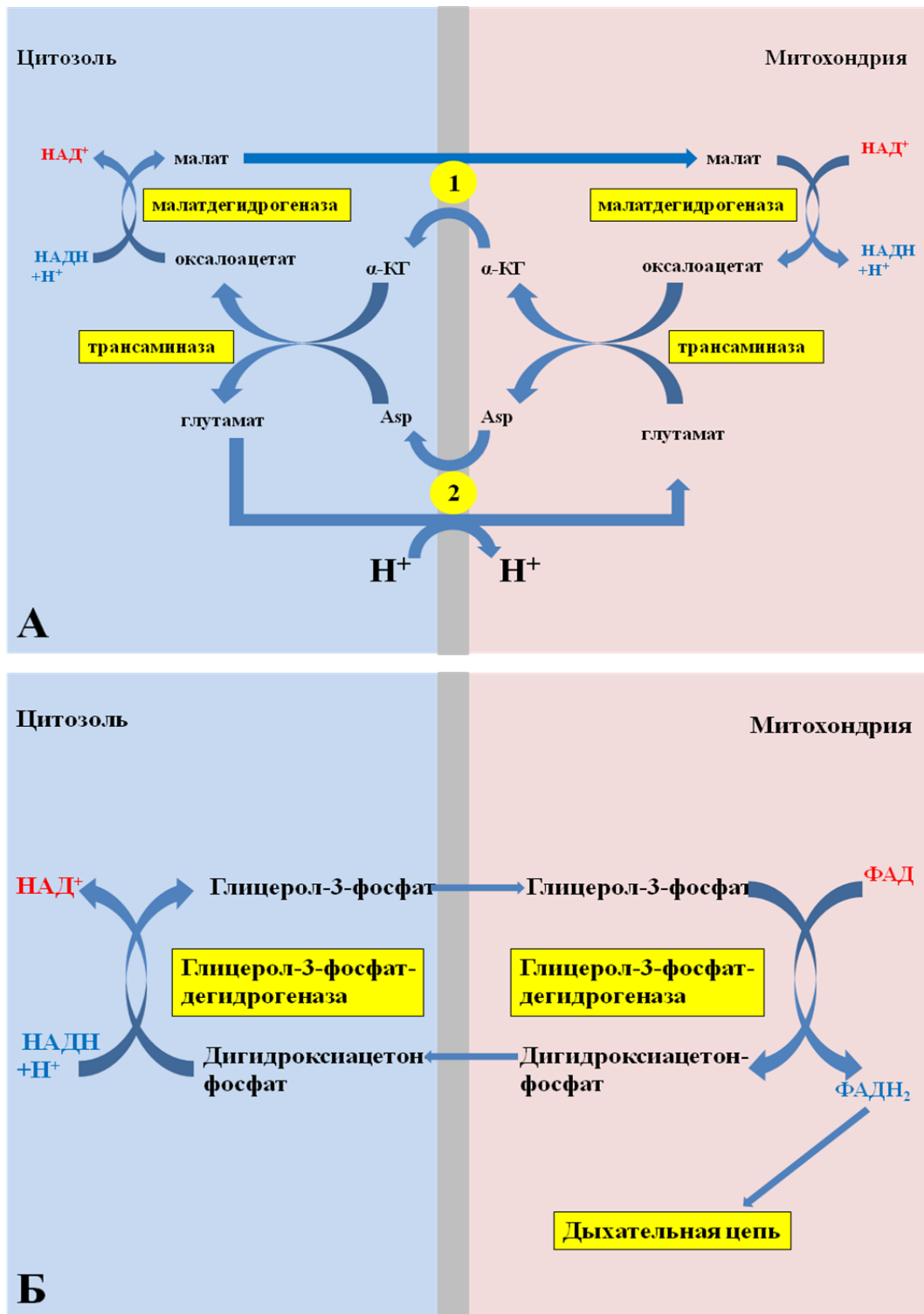
Исследования *in vitro* показали, что NMNAT-1 может взаимодействовать с ферментом поли(АДФ-рибоза)полимеразой-1 (PARP-1) и ингибировать его активность [165]. Различные PARP являются одними из главных потребителей клеточного НАД<sup>+</sup>, поскольку с его участием эти ферменты осуществляют такую посттрансляционную

модификацию, как поли-АДФ-рибозилирование различных белков [166]. По всей видимости, и в живых клетках взаимодействия белков NMNAT и PARP играют важную роль в регуляции метаболизма НАД, активируя синтез или распад этой молекулы.

Другим немаловажным вопросом является транспорт НАД<sup>+</sup> и НАДН между внутриклеточными компартментами. Внутренняя мембрана митохондрий непроницаема для обеих форм НАД, в то же время в клетке происходит их постоянный обмен между цитоплазмой и митохондриями. Это возможно благодаря работе специальных челночных механизмов, различают глицеролфосфатный и малат-аспартатный [161, 167, 168]. На рисунке 18 представлены схемы работ этих механизмов.

Для переноса восстановительных эквивалентов через внутреннюю митохондриальную мембрану требуется участие некоторых пар субстратов, связанных соответствующими дегидрогеназами.

Ключевым ферментом малат-аспартатного челночного механизма является малатдегидрогеназа, которая присутствует в цитоплазме и митохондриях. Реакция трансаминирования аспарагиновой кислоты поставляет в систему оксалоацетат. Цитозольная малатдегидрогеназа, используя НАДН, превращает оксалоацетат в малат. Последний уже может проникать в митохондрию антипортом с  $\alpha$ -кетоглутаратом. Поскольку малат является одним из субстратов цикла трикарбоновых кислот, в митохондриях он вновь окисляется в оксалоацетат с высвобождением молекулы НАДН. Оксалоацетат в дальнейшем подвергается реакции аминирования и превращается в аспарагиновую кислоту, которая вновь может быть перенесена в цитоплазму в обмен на глутамат (рис. 18А) [158, 161]. В случае глицеролфосфатного челночного механизма для переноса восстановительных эквивалентов внутрь митохондрий используется пара глицерол-3-фосфат/дигидроксиацетонфосфат, взаимное превращение этих соединений осуществляет глицерол-3-фосфатдегидрогеназа. Причем цитоплазматическая изоформа фермента в качестве кофактора использует НАД, а митохондриальная ФАД (рис. 18Б) [158, 161]. У различных типов клеток реализуется преимущественно тот или иной механизм.



**Рисунок 18.** Схемы малат-аспаратного (А) и глицеролфосфатного (Б) челночных механизмов для переноса  $\text{НАД}^+$  и  $\text{НАДН}$  через внутреннюю мембрану митохондрий  
 Обозначения: 1 - переносчик малата и α-кетоглутарата (α-КГ),  
 2 - переносчик аспартата и глутамата.

В отличие от внутренней мембраны митохондрий ядерная мембрана является свободно проницаемой как для  $\text{НАД}^+$ , так и для  $\text{НАДН}$  [153].

Ранее предполагали, что  $\text{НАД}^+$  и  $\text{НАДН}$  не могут транспортироваться через цитоплазматическую мембрану клеток. Однако некоторые исследования свидетельствуют о том, что транспорт  $\text{НАД}^+$  через цитоплазматическую мембрану фибробластов может осуществляться через каналы коннексина 43 [169]. Существуют работы, авторы которых указывают на возможность транспорта  $\text{НАД}^+$  через плазматическую мембрану астроцитов [170, 171]. Есть сведения о том, что и  $\text{НАДН}$  может проходить через цитоплазматические мембраны некоторых типов клеток [153, 172].

### **1.2.1.2. Роль $\text{НАД}^+$ и $\text{НАДН}$ в энергетическом метаболизме клеток**

Ранее мы уже упоминали о том, что в процессе окисления различных соединений благодаря действию специфичных дегидрогеназ происходит образование восстановительных эквивалентов в форме водорода и электронов, которые передаются на универсальные акцепторы  $\text{НАД}^+$  или  $\text{ФАД}$ . Для получения доступной энергии в виде высокоэнергетической фосфатной связи АТФ восстановительные эквиваленты от  $\text{НАДН}$  или  $\text{ФАДН}_2$  передаются в клетках на дыхательную цепь митохондрий. Образование АТФ в основном происходит именно за счет функционирования дыхательной цепи и в меньшей степени за счет субстратного фосфорилирования, примерами которого являются гликолиз, окислительное декарбоксилирование  $\alpha$ -кетоглутаровой кислоты [158, 161].

В дыхательную цепь митохондрий восстановительные эквиваленты могут поступать на разных ее уровнях, в зависимости от окислительно-восстановительного потенциала окисляемого субстрата. Восстановленный  $\text{НАДН}$  в дыхательной цепи окисляется на уровне комплекса I, и далее электроны последовательно переносятся по цепочке трансмембранных комплексов. В конечном итоге в необратимой реакции цитохромоксидазы электроны переносятся на конечный акцептор кислород. Работа электронтранспортной цепи митохондрий связана с транслокацией  $\text{H}^+$  в межмембранное пространство, создавая протонный потенциал  $\Delta\mu\text{H}$  на мембране, который использует  $\text{H}^+$ -АТФ-синтаза для фосфорилирования АДФ [158, 161].

С другой стороны  $\text{НАД}^+$  и  $\text{НАДН}$  участвуют во множестве других реакций связанных тем или иным образом с энергетическим метаболизмом клетки. Например, фермент гликолиза глицеральдегид-3-фосфат дегидрогеназа использует  $\text{НАД}^+$  в качестве кофактора. Лактатдегидрогеназа использует  $\text{НАДН}$  и осуществляет реакцию

превращения пирувата в лактат [158, 161]. Поэтому регуляция со стороны НАД может происходить и на этом уровне.

Сейчас находят все больше взаимосвязей между НАД и различными компонентами клетки. Поэтому знания в этой области постоянно расширяются. Например, оказалось, что белки семейства Sir2 участвуют в регуляции ацетил-КоА-синтетазы, имеют отношение к регуляции гликолиза. При этом для работы самих Sir2 необходимо присутствие НАД<sup>+</sup> [173, 174].

Соотношение НАД<sup>+</sup>/НАДН регулирует работу митохондрий не только на уровне цикла трикарбоновых кислот и электрон-транспортной цепи, но и на уровне регуляции проницаемости митохондриальной мембраны [175]. В частности НАДН может напрямую взаимодействовать и ингибировать некоторые потенциал зависимые анионные каналы, контролирующие транспорт некоторых анионов, регулируя тем самым активность всей органеллы [176].

### **1.2.1.3. Другие функции соотношения НАД<sup>+</sup>/НАДН в клетке**

Соотношение НАД<sup>+</sup>/НАДН является важнейшим показателем, отражающим общее окислительно-восстановительное состояние клетки. Поддержание величины соотношения НАД<sup>+</sup>/НАДН на определенном уровне препятствует повреждению внутриклеточных структур от окисления [177], тем самым этот параметр напрямую связан с такими глобальными процессами, как клеточная смерть и старение.

Упомянутый ранее белок Sir2, активность которого зависит от соотношения НАД<sup>+</sup>/НАДН, по всей видимости, является важным регулятором процессов, определяющих общую продолжительность жизни. В этом направлении были проведены исследования на дрожжах, но точный механизм такой регуляции пока не установлен [178, 180]. Sir2 является не единственным компонентом, участвующим в процессах старения, активность которого регулируется соотношением НАД<sup>+</sup>/НАДН. Установлено, что теломеразная активность регулируется со стороны НАД<sup>+</sup>-зависимых ферментов - танкираз [181]. Была установлена корреляция между активностью PARP мононуклеарных кровяных клеток разных видов млекопитающих с продолжительностью существования этих клеток. Предполагают, что это связано с участием PARP в регуляции процессов репарации ДНК [182, 183].

Осуществляя реакцию поли-АДФ-рибозилирования, одного из видов посттрансляционных модификаций, в нормальном физиологическом состоянии PARP осуществляют регуляцию многих белков. Установлено, что эти ферменты также вовлечены в формирование и некоторых патологических состояний. Повышенная

активность PARP-1 отмечена при клеточной гибели, вызванной ишемией головного мозга [153, 184, 185]. Исследования на животных моделях подтвердили ключевую роль PARP-1 в этом процессе [186, 187]. Позднее было установлено, что увеличение активности PARP-1 является важным патологическим фактором, это характерно при повреждениях мозга вследствие его травм, гипогликемии, диабетах, различных воспалительных процессах [153, 188-190]. При повышенной активности PARP-1 происходит истощение клеточного НАД<sup>+</sup>, что является одной из причин гибели клетки при таких состояниях [154, 191]. На рисунке 19 представлена схема возможных событий при гибели клетки с участием PARP-1. Активация PARP-1 может происходить в ответ на повреждения ДНК в условиях окислительного стресса или благодаря воздействию алкилирующих агентов. PARP-1 является важным клеточным потребителем НАД<sup>+</sup>, который этот белок использует для синтеза полимеров поли(АДФ)-рибозы на различных белках. Чрезмерная активность PARP-1 приводит к истощению запасов внутриклеточного НАД<sup>+</sup>, что само по себе приводит к серьезным последствиям для клетки, например, к ингибированию гликолиза. Кроме того, истощение НАД<sup>+</sup> косвенным образом влияет на неспецифическую проницаемость митохондрий МРТ (Mitochondrial Permeability Transition). Под этим термином понимают свободное перемещение различных соединений через внутреннюю мембрану митохондрий, которые при нормальных условиях не должны проходить. Возможно, это происходит благодаря тому, что при истощении НАД<sup>+</sup> начинают активно расходоваться АТФ и АДФ на синтез НАД<sup>+</sup> для восполнения его пула [154, 155].

АТФ и АДФ ингибируют процесс формирования неспецифической проницаемости митохондрий (МРТ). Следовательно, при их истощении в клетке ингибирование МРТ может сниматься. Кроме того, соотношение НАД<sup>+</sup>/НАДН также является важным регулятором МРТ, критические изменения этого параметра могут способствовать МРТ [175]. С другой стороны, прекращение подачи субстратов в митохондрию, вызванное истощением НАД<sup>+</sup>, тоже сказывается на функционировании всей органеллы [191]. Скорее всего, совокупность различных процессов приводит к тому, что работа митохондрий нарушается. Изменение проницаемости митохондриальной мембраны приводит к ее деполяризации, снижается синтез АТФ. На заключительной стадии из митохондрии происходит высвобождение апоптоз-индуцирующего фактора (АИФ). В конечном итоге клетка погибает [154, 155].



**Рисунок 19. Участие PARP-1 в клеточной гибели. Адаптировано из [153]**

Обозначения:

*PARP-1 (poly(ADP-ribose)polymerase-1) - поли(АДФ-рибоза)полимераза-1*

*PAR-белки - поли-АДФ-рибозилированные белки*

*PARG (poly(ADP-ribose)glycohydrolase) - поли(АДФ-рибоза)гликогидролаза*

Необходимо сказать также несколько слов о ферменте, который наоборот катализирует расщепление поли(АДФ-рибозы). Это происходит благодаря работе поли(АДФ-рибоза)гликогидролазы (PARG) [192]. В результате расщепления полимеров происходит образование АДФ-рибозы, которая впоследствии может быть превращена в АМФ [193]. Реакции с участием PARG также представлены на рисунке 19. PARG наравне с PARP-1 участвует во многих клеточных процессах.

Соотношение  $\text{НАД}^+/\text{НАДН}$  задействовано в тонкой регуляции такого важного вторичного мессенджера клетки, как  $\text{Ca}^{2+}$ . На рисунке 20 изображена схема, по которой может осуществляться эта регуляция.

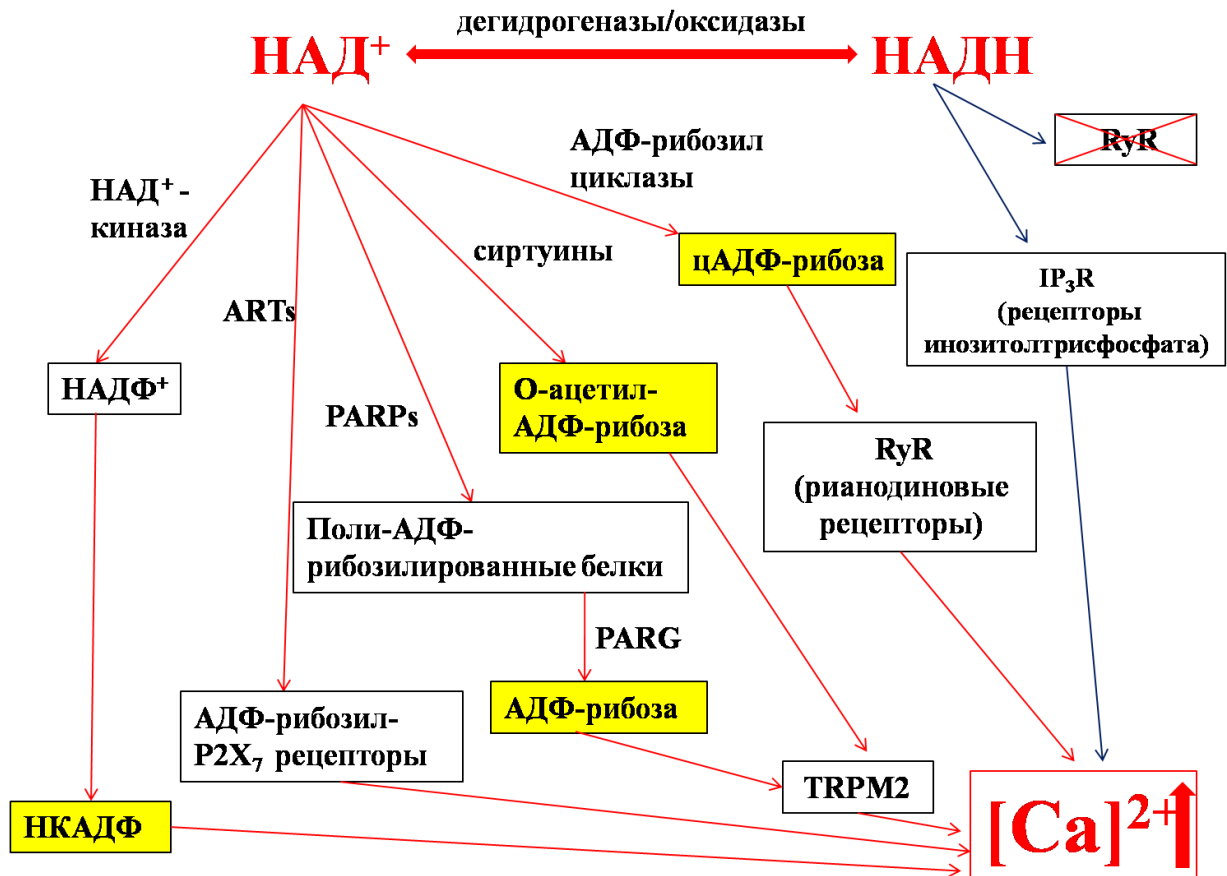


Рисунок 20. Участие  $\text{NAD}^+$  и  $\text{NADH}$  в регуляции  $[\text{Ca}^{2+}]$ . Адаптировано из [153]

Обозначения:

*ARTs* (*NAD<sup>+</sup>-depend mono(ADP-ribose)transferases*) -  $\text{NAD}^+$ -зависимые моно(АДФ-рибозил)трансферазы

*PARPs* (*poly(ADP-ribose)polymerases*) - поли(АДФ-рибоза)полимеразы

*PARG* (*poly(ADP-ribose)glycohydrolase*) - поли(АДФ-рибоза)гликогидролаза

*TRPM2* (*transient receptor potential cation channel, subfamily M, member 2*)

АДФ-рибозилциклазы, которые обнаружены в клетках самых различных типов, используют в качестве субстрата  $\text{NAD}^+$  и образуют цАДФ-рибозу. Это соединение служит эффективным  $\text{Ca}^{2+}$ -высвобождающим агентом благодаря регуляции рианодиновых рецепторов 2 и 3 типов [194-196]. цАДФ-рибоза оказывает воздействие на рианодиновые рецепторы путем их непосредственного связывания или через взаимодействие с определенными белками-посредниками [194]. Имеются данные о том, что цАДФ-рибоза может также участвовать в регуляции TRPM2 рецепторов (transient receptor potential cation channel, subfamily M, member 2) [197]. Но все же главным активатором TRPM2 является АДФ-рибоза, которая образуется в клетке благодаря работе ферментов PARP и PARG [198, 199]. Кроме того, о-ацетил-АДФ-рибоза, которая образуется из  $\text{NAD}^+$  в результате реакции, катализируемой Sir2, выступает в роли еще одного регулятора TRPM2 [200]. Другими примерами регуляции  $[\text{Ca}^{2+}]$  с участием НАД

являются белки семейства ARTs, которые используют для своей реакции в качестве субстрата НАД<sup>+</sup> и осуществляют моно-АДФ-рибозилирование различных белков [201, 202], в том числе пуринорецепторов P2X<sub>7</sub>, также ответственных за регуляцию [Ca<sup>2+</sup>] в цитоплазме клеток [203, 204]. Никотиновая кислота аденидинуклеотидфосфата (НКАДФ, NAADP) осуществляет регуляцию НКАДФ-зависимых каналов для [Ca<sup>2+</sup>] [205-208]. При некоторых условиях величина соотношения НАД<sup>+</sup>/НАДН может уменьшаться за счет восстановления общего пула НАД. Оказалось, что и НАДН участвует в регуляции кальциевого гомеостаза. Например, в клетках Пуркинье в условиях гипоксии увеличивается концентрация НАДН. При этом обнаружено высвобождение [Ca<sup>2+</sup>] через IP<sub>3</sub> (инозитолтрифосфат)-зависимые кальциевые каналы эндоплазматического ретикулаума. Предполагают, что именно НАДН регулирует IP<sub>3</sub> рецепторы [209]. Также было показано, что НАДН может ингибировать рианодиновые рецепторы, особенно это выражено в сердечной мышце [210, 211].

Экспрессия некоторых генов зависит от соотношения НАД<sup>+</sup>/НАДН. Уже неоднократно упоминавшийся в данной работе фермент PARP-1, активность которого зависит от НАД<sup>+</sup>/НАДН индекса, контролирует работу многих белков, в том числе и некоторых транскрипционных факторов, таких как p53, AP-1, NF-κB [209]. НАДН регулирует активность репрессора CtBP (carboxyl-terminal binding protein), который вовлечен в процессы регуляции клеточного цикла [212]. Функциональные активности гетеродимерных транскрипционных факторов Clock:BMAL1 и NPAS2:BMAL1, участвующих в формировании циркадных ритмов, также зависят от соотношения НАД<sup>+</sup>/НАДН в клетке [213].

Еще более удивительной кажется функция НАД в роли экстраклеточной сигнальной молекулы. CD38, человеческий гомолог АДФ-рибозил циклаз, расположенный на поверхности некоторых клеток, может использовать экстраклеточный НАД<sup>+</sup> для образования цАДФ-рибозы. На культуре астроцитов было продемонстрировано, что добавление экстраклеточного НАД<sup>+</sup> или цАДФ-рибозы приводит к увеличению Ca<sup>2+</sup> в цитоплазме клеток [214, 215].

Роль соотношения НАД<sup>+</sup>/НАДН в жизни самых различных клеток не может быть переоценена. Мы рассмотрели лишь часть всех возможных примеров. Возможно, что с появлением новых подходов изучения откроются новые механизмы регуляции клеточных процессов, которые дополнят наши знания о масштабной роли соотношения НАД<sup>+</sup>/НАДН.

#### 1.2.1.4. Транскрипционный фактор Rex – природный сенсор соотношения НАД<sup>+</sup>/НАДН

Жизнь аэробных организмов неразрывно связана с присутствием кислорода в их среде. Однако уровень кислорода окружающей среды для некоторых организмов не всегда остается постоянным, в ходе эволюции такие организмы должны были выработать специальные механизмы, позволяющие им адаптироваться к подобным изменяющимся условиям.

Бактерии обладают целым набором природных сенсоров, позволяющих им отслеживать изменение уровня кислорода, а также контролировать внутреннее окислительно-восстановительное состояние. В ответ на снижение уровня кислорода в среде бактерии способны изменить свой метаболизм. Это может привести к изменению активности некоторых ферментов, производству альтернативных оксидаз с более высоким сродством к кислороду или производству ферментов, позволяющих использовать в качестве конечного акцептора электронов нитрат или fumarat [216].

Регуляторные белки, позволяющие контролировать окислительно-восстановительное состояние бактериальных клеток, могут основываться на разных механизмах. В некоторых случаях сенсоры чувствуют уровень кислорода напрямую за счет FeS-кластеров в их структуре, как у сенсора FNR [217]. Сенсор HemAT тоже относится к категории таких сенсоров, но в своей основе содержит гем [218].

Другой стратегией является регистрация форм различных метаболитов, связанных с окислительно-восстановительным состоянием клетки. Соотношение НАД<sup>+</sup>/НАДН в этом плане является универсальным параметром.

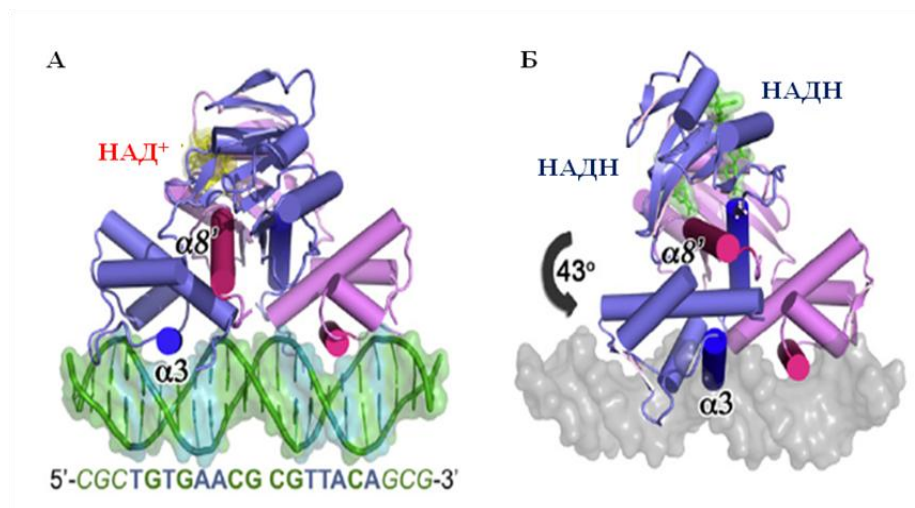
У грамположительных бактерий (впервые у *Streptomyces coelicolor*) был обнаружен белок Rex, который является важным регулятором транскрипции компонентов дыхательной цепи в ответ на изменение внутриклеточного НАД<sup>+</sup>/НАДН индекса [219]. Как оказалось в дальнейшем, этот белок синтезируется и у других представителей грамположительных бактерий, включая и некоторые патогенные для человека, такие как возбудители сибирской язвы, пневмонии, столбняка и некоторые другие [220]. Белки семейства Rex обладают удивительной степенью сходства, различные представители этого семейства имеют одинаковый механизм функционирования, а около 30 % всей аминокислотной последовательности является строго консервативной. T-Rex гомологи из *Thermus aquaticus* и *Thermus thermophilus* демонстрируют 100%-ную идентичность [221]. Мы подробнее остановимся на рассмотрении особенностей белков семейства Rex, поскольку в экспериментальной части работы мы использовали одного из его представителей, а именно T-Rex из

*Thermus thermophilus*, для создания флуоресцентного сенсора, регистрирующего соотношение НАД<sup>+</sup>/НАДН.

По своей природе все белки семейства Rex являются транскрипционными факторами. Участки ДНК (Rex operator, ROP), которые связывают эти белки, представляют собой инвертированные повторы, встречающиеся в некоторых генах. В *Streptomyces coelicolor* белок Rex регулирует экспрессию генов цитохром bd оксидазы (cydABCD), протон-транслоцирующей НАДН-дегидрогеназы (nuoAN), гем синтезирующих ферментов и, собственно, самого белка Rex (rexhemACD). В *Bacillus subtilis* Rex также регулирует экспрессию гена, кодирующего цитохром bd оксидазу, а также гены НАДН-зависимой лактатдегидрогеназы (IctP-Idh) и предполагаемого нитратного транспортера (ywcJ) [221].

Белки семейства Rex являются природными сенсорами внутриклеточных колебаний соотношения НАД<sup>+</sup>/НАДН. Гомодимерный Rex пребывает в трех основных состояниях. При низкой концентрации свободных нуклеотидов белок находится в переходном состоянии - часть его молекул находится в свободном состоянии, а часть в слабом комплексе с ДНК [222]. В аэрированных условиях, когда индекс НАД<sup>+</sup>/НАДН имеет высокое значение, Rex образует прочный комплекс с ДНК и молекулой НАД<sup>+</sup>, выступая в качестве репрессора транскрипции некоторых генов (cydABC, rexhemACD и других) [222]. Если НАД<sup>+</sup>/НАДН соотношение снижается в условиях недостатка кислорода, Rex связывает две молекулы НАДН, поскольку имеет к нему большее сродство, чем к НАД<sup>+</sup>. Это приводит к конформационным изменениям в структуре белка и последующему его освобождению из комплекса с ДНК [221, 222]. На рисунке 21 изображена молекула белка T-Rex в НАД<sup>+</sup>- и НАДН-связывающем состояниях.

После снятия репрессора происходит экспрессия генов, продукты этой экспрессии позволяют клеткам выжить в условиях сниженного уровня кислорода. В частности, цитохром bd оксидаза более эффективно использует доступный кислород, различные дегидрогеназы превращают часть избыточного количества НАДН в НАД<sup>+</sup> [222]. Таким образом, живые системы решают проблему временного недостатка кислорода в окружающей среде путем экспрессии некоторых ключевых генов, которые в аэрированных условиях заблокированы репрессором Rex.



**Рисунок 21. Конформация белка T-Rex в составе комплексов T-Rex-НАД<sup>+</sup>-ДНК (А) и T-Rex-2НАДН (Б)**

Разные субъединицы T-Rex отмечены синим и фиолетовым цветами соответственно; молекулы НАДН отмечены зеленым цветом, НАД<sup>+</sup> - желтым.

$\alpha 3$  спираль N-домена каждой субъединицы является ключевой в связывании ДНК;  $\alpha 8$  от каждой субъединицы ответственна за стабилизацию димера.

При связывании НАДН происходит поворот N-доменов и образование более компактной структуры [221].

Известна кристаллическая структура белка T-Rex (*Thermus thermophilus*), а также некоторых других представителей семейства. T-Rex представляет собой димер, в котором каждая субъединица состоит из двух доменов, связанных между собой коротким линкером из пяти аминокислот. N-терминальный WH домен связывает ДНК, при этом главную роль в связывании ДНК играет  $\alpha 3$  спираль (рисунок. 21). С-терминальный домен отвечает за связывание нуклеотидов и поэтому для его структуры характерно наличие укладки Россмана. Димерное состояние белка стабилизировано за счет  $\alpha$  спиралей С-доменов, главным образом благодаря  $\alpha 8$  и  $\alpha'8$  спиральям, каждая из которых расположена в пространстве между двумя доменами. Молекулы НАДН связываются с каждым С-доменом неподалеку от интерфейса, ответственного за формирование димера. Это приводит к конформационным изменениям, передающимся на подвижный линкер между доменами. В результате N-домены поворачиваются с образованием более компактного закрытого состояния, неспособного более связывать ДНК [220-222].

Сродство T-Rex к НАДН ( $K_a = 4,1 \cdot 10^7 \pm 0,5 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1}$ ) примерно в двадцать тысяч раз выше, чем сродство к НАД<sup>+</sup>. Белок может связывать и АТФ, но примерно в 10 раз слабее, чем НАД<sup>+</sup> [222]. Asp122 в структуре T-Rex предотвращает связывание НАДФ(Н) [220].

Таким образом, белки семейства Rex – природные универсальные сенсоры, которые очень тонко чувствуют изменение соотношения  $\text{НАД}^+/\text{НАДН}$ .

### 1.2.1.5. Методы регистрации $\text{НАД}^+$ и $\text{НАДН}$

В настоящее время существует несколько подходов для определения  $\text{НАД}^+$  и  $\text{НАДН}$  в клетках и тканях. Но проблема регистрации этих нуклеотидов до сих пор остается актуальной. Большинство существующих методов не позволяет наблюдать локализацию  $\text{НАД}^+$  и  $\text{НАДН}$  в отдельных клеточных компартментах, оценивать их количество в свободном или в связанном с белками состояниях. Но главная трудность заключается в измерении динамики соотношения  $\text{НАД}^+/\text{НАДН}$  в живых клетках в реальном времени.

Окисленные и восстановленные формы пиридин нуклеотидных коферментов обладают отличиями в спектрах поглощения.  $\text{НАД}^+$  имеет узкую полосу поглощения с максимумом при 260 нм благодаря наличию аденина в его структуре. У восстановленной формы этого кофермента появляется вторая полоса поглощения с максимумом при 340 нм, это обусловлено исчезновением одной двойной связи в никотинамидном комплексе кофермента при его восстановлении [158, 161]. На рисунке 22 представлены спектры поглощения  $\text{НАД}^+$  и  $\text{НАДН}$ .

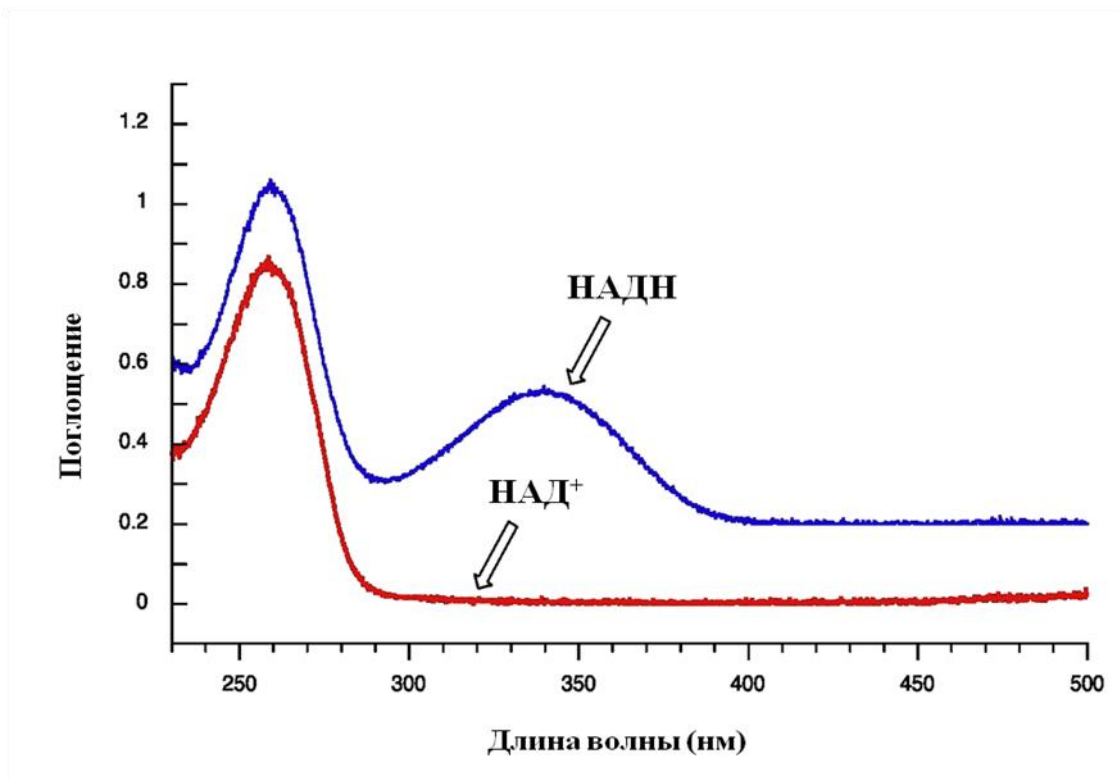
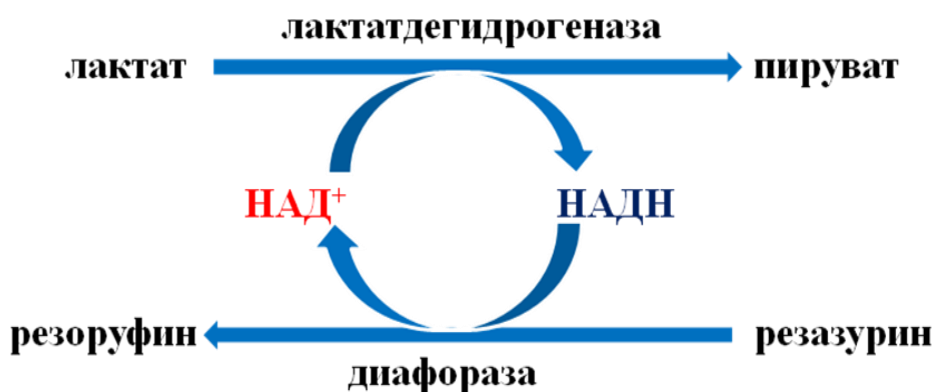


Рисунок 22. Спектры поглощения  $\text{НАД}^+$  и  $\text{НАДН}$

Наиболее простым методом определения количества  $\text{НАД}^+$  и  $\text{НАДН}$  является использование ферментативных систем. Эти методы измерения уже давно известны и начали использоваться с 1960-х годов [223, 224]. Главными их преимуществами является простота исполнения. При этом существует большое количество ферментов, которые специфично используют в качестве кофактора  $\text{НАДН}$  и  $\text{НАД}^+$ , поэтому имеется выбор реакций. Чаще используют циклические ферментативные системы, состоящие из нескольких реакций. В самом простом варианте регистрировать убывание или прирост  $\text{НАДН}$  в пробе можно спектрофотометрически, измеряя поглощение при 340 нм. Иногда применяют специальные красители, в ходе работы таких систем образуются окрашенные или флуоресцирующие продукты, что увеличивает чувствительность метода. На рисунке 23 в качестве примера приведена одна из таких систем. В указанной системе  $\text{НАД}^+$  и  $\text{НАДН}$  в равной степени могут служить инициаторами этого цикла. Помимо лактатдегидрогеназы, которую можно заменить и другим ферментом, в системе присутствует диафораза, катализирующая окисление  $\text{НАДН}$  в присутствии акцепторов электронов. В качестве акцептора электронов в этой системе выступает синий краситель резазурин, который после принятия электронов превращается в яркий флуоресцирующий краситель розового цвета резорурфин.



*Рисунок 23. Схема циклической ферментативной реакции для определения  $\text{НАД}^+$  и  $\text{НАДН}$  с использованием диафоразы и красителя резазурина [225]*

Теоретически, основываясь на популяции большого числа идентичных клеток, можно предположить, что одинаковые клетки одной и той же ткани обладают абсолютно одинаковыми параметрами. На клеточных культурах действительно наблюдается некоторая гомогенность. Но исследования на образцах тканей и органов показало, что клетки все же отличаются гетерогенностью с большей или меньшей степенью выраженности, даже многие биохимические процессы для большой клеточной популяции не всегда строго синхронизированы. Именно поэтому разработка

методов, позволяющих вести исследования на уровне единичной клетки, является чрезвычайно важным направлением.

Улучшенный вариант, который позволяет определять содержание НАД<sup>+</sup> и НАДН в одиночных клетках, представляет собой совмещение какой-либо хорошо детектируемой энзиматической системы и метода капиллярного электрофореза. Метод капиллярного электрофореза используется достаточно давно для регистрации самых разнообразных компонентов клетки [225]. Данный метод позволяет работать с пробами небольших объемов, соизмеримых с объемом клетки. В капилляр вводится единичная клетка, в котором специально повреждается ее мембрана. Таким образом, исследуют все содержимое одной клетки, минуя стадию сложной экстракции. Далее детектируют интересующие компоненты. Например, НАД<sup>+</sup> и НАДН обладают разной электрофоретической подвижностью, поэтому их можно разделить. После чего используют стандартные реакции определения со специфическими красителями [225].

Главный недостаток подобных методов заключается в том, что их применение возможно лишь на биологических экстрактах. В настоящий момент существует множество протоколов выделения нуклеотидов, сохраняя их окисленную или восстановленную формы, разработан метод простой экстракции на уровне единичной клетки, но проблема изучения динамики изменения соотношения НАД<sup>+</sup>/НАДН в живых системах остается прежней.

НАДН отличается от НАД<sup>+</sup> способностью к флуоресценции. При возбуждении НАДН светом в области 340 нм молекула флуоресцирует на 460 нм. Это свойство позволяет регистрировать НАДН в клетках с помощью флуоресцентного микроскопа.

Для регистрации НАДН в живых тканях чаще используют двухфотонную лазерную микроскопию. Этот метод обеспечивает трехмерное изображение клеточных и субклеточных структур. Преимущества перед конфокальной микроскопией заключаются в большей проникающей способности, а также более низкой степени фототоксичности. Возбуждение хромофора происходит двумя фотонами, энергия которых меньше энергии флуоресцентного фотона. Лазеры обеспечивают мощный поток возбуждающих фотонов, что увеличивает вероятность поглощения возбуждаемой молекулой именно двух фотонов [226]. До недавнего времени этот метод регистрации флуоресценции с помощью микроскопии был единственным, позволяющим исследовать НАД(Ф)Н именно в живых клетках [227-231]. Но этим методом можно регистрировать лишь восстановленную форму кофактора, в то время как его окисленная форма остается вне исследований, поэтому и данный метод не позволяет регистрировать динамику изменения соотношения НАД<sup>+</sup>/НАДН.

Окисленные флавины флуоресцируют примерно в той же области, что и НАДН, поэтому флуоресцентные сигналы этих соединений нельзя различить [228]. Впрочем, как и нельзя отличить НАДН и НАДФН. Кроме того, при длительной и интенсивной съемке образца может происходить его повреждение [232-235].

И лишь совсем недавно был разработан метод, позволяющий изучать соотношение  $\text{НАД}^+/\text{НАДН}$  в живых клетках и даже в их компартментах в режиме реального времени, чему посвящена данная работа. Мы создали генетически кодируемый флуоресцентный сенсор для регистрации соотношения  $\text{НАД}^+/\text{НАДН}$ . Параллельно и независимо от нас в двух других лабораториях были созданы сенсоры подобного типа, которые, тем не менее, имеют значимые отличия. Поэтому речь об этих новых индикаторах пойдет в главе «Результаты и обсуждение» в контексте сравнения их свойств.

### 1.2.2. Соотношение $\text{НАДФ}^+/\text{НАДФН}$

Нельзя не упомянуть о  $\beta$ -никотинамидадениндинуклеотидфосфате (НАДФ), который отличается от НАД наличием остатка фосфорной кислоты в положении 2' рибозы. Этот кофермент также встречается во всех типах клеток и представлен в окисленной ( $\text{НАДФ}^+$ ) и восстановленной (НАДФН) формах. В метаболизме клетки соотношение  $\text{НАДФ}^+/\text{НАДФН}$  играет не менее важную роль, чем соотношение  $\text{НАД}^+/\text{НАДН}$ .

Внутриклеточная концентрация НАДФ ниже по сравнению с нефосфорилированной формой кофактора (примерно в 10 раз для клеток печени крысы). При этом при нормальных физиологических условиях общий пул НАДФ в клетке более восстановлен, в отличие от пула НАД. Например, общее клеточное соотношение  $\text{НАДФ}^+/\text{НАДФН}$  составляет примерно 0,005 [159, 177, 236, 237].

Образование  $\text{НАДФ}^+$  в клетке происходит путем реакции фосфорилирования  $\text{НАД}^+$ , которую катализируют ферменты  $\text{НАД}^+$ -киназы (NADKs) [238]. Эти белки очень важны для общего уровня НАДФ в клетке, а их активность тщательнейшим образом контролируется [237]. Восстановленная форма НАДФН образуется в результате протекания многих окислительно-восстановительных реакций в клетке, которые, например, осуществляют различные дегидрогеназы [237]. Митохондриальная трансгидрогеназа, участвующая в транслокации  $\text{H}^+$  через мембрану, осуществляет перенос восстановительных эквивалентов между пулом НАД и НАДФ. В частности, происходит восстановление  $\text{НАДФ}^+$  до НАДФН за счет НАДН [239, 240].

Соотношение НАДФ<sup>+</sup>/НАДФН участвует в регуляции многих окислительно-восстановительных реакций клетки, в том числе и антиоксидантных систем. Для примера напомним, что глутатионредуктаза, поддерживающая восстановленный пул глутатиона, использует как раз НАДФН, как и тиоредоксинредуктаза, восстанавливающая окисленный тиоредоксин. Также благодаря НАДФН осуществляется работа НАДФН-оксидаз, важных белковых комплексов, принцип работы и функции которых были подробно изложены в предыдущей части. По всей видимости, митохондриальная трансгидрогеназа участвует в защите митохондрий от окислительного стресса. НАДН поставляет электроны в дыхательную цепь митохондрий. Чем интенсивнее идет этот процесс, тем больше энергии запасает клетка, но и тем выше вероятность образования АФК, поскольку считается, что электронтранспортная цепь митохондрий является одним из главных источников АФК в клетке в целом. Поэтому часть восстановительных эквивалентов использует трансгидрогеназа для перевода их в молекулу НАДФН. При угрозе окислительного стресса НАДФН используется антиоксидантными системами [237].

Поскольку НАДФН используется антиоксидантными системами клеток и белками NOX, можно с уверенностью утверждать, что такой клеточный параметр как соотношение НАДФ<sup>+</sup>/НАДФН задействован в регуляции многих клеточных процессов, включая клеточный сигналинг, различные процессы гомеостаза и клеточную смерть.

### 1.2.3. Соотношение GSSG/GSH

Глутатион, его окисленная форма (GSSG) и восстановленная (GSH), является ключевой молекулой окислительно-восстановительных реакций, связанных с тиол-дисульфидным обменом. Обратимое формирование внутренних и межмолекулярных дисульфидов один из важнейших механизмов регуляции многих белков. Глутатион служит в роли восстанавливающего агента клеточных дисульфидов.

По своей природе глутатион является трипептидом L-γ-глутамил-L-цистенил-глицин, поэтому его синтез в клетке осуществляется из соответствующих аминокислот. Концентрация GSH в клетках может составлять от 0,1 до 15 мМ в зависимости от типа клеток или клеточного компартмента, концентрация же GSSG обычно на несколько порядков ниже [241]. Таким образом, основная часть пула общего глутатиона пребывает в клетке чаще в восстановленном состоянии. Из-за высокой концентрации и высокой степени восстановленности глутатион поддерживает общее восстановленное состояние практически всех тиоловых групп в клетке.

Восстановленная форма глутатиона поддерживается в клетке благодаря активности глутатионредуктаз, использующих НАДФН в качестве электронного донора для реакции с GSSG [133-135]. В предыдущей части мы подробно рассмотрели механизмы и значение клеточного тиол-дисульфидного обмена, а также особенности ключевых белков, участвующих во взаимодействиях с обеими формами глутатиона.

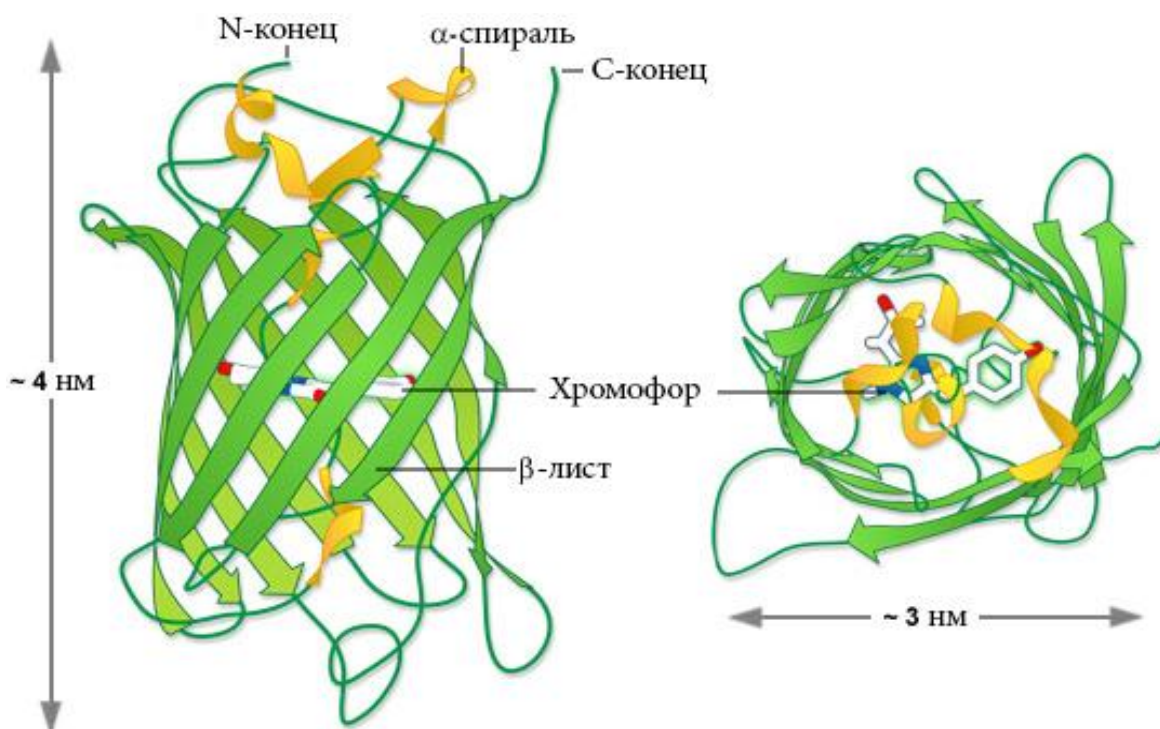
### 1.3. ФЛУОРЕСЦЕНТНЫЕ БЕЛКИ

Открытие и клонирование гена зеленого флуоресцентного белка (GFP) [242-245], исходно выделенного из медузы *Aequorea victoria*, и обнаруженные позже GFP-подобные белки из других источников, позволили создать совершенно новые подходы в биологических и медицинских исследованиях на уровне клеток и даже отдельных внутриклеточных молекул. К настоящему времени методами генной инженерии получено большое количество GFP-подобных белков, которые отличаются от белков дикого типа стабильностью, величиной квантового выхода, временем созревания хромофора и спектральными характеристиками [246].

Главными преимуществами флуоресцентных белков для применения их в качестве прижизненных маркеров являются способность образовывать хромофор без участия вспомогательных веществ за исключением лишь O<sub>2</sub>, а также низкая токсичность для клетки. Экспрессию белка в клетке можно легко контролировать, что позволяет его локализовать внутри любых клеточных компартментов. Использование GFP-подобных белков нашло самое широкое применение для изучения экспрессии генов, взаимодействий и локализации всевозможных макромолекул. На основе флуоресцентных белков регулярно создаются генетически кодируемые сенсоры, позволяющие исследовать протекание различных клеточных реакций и процессов в живых системах.

#### 1.3.1. Общие структурные особенности флуоресцентных белков

Структура всех молекул GFP-подобных белков представляет собой жесткий β-бочонок, состоящий из 11 β-тяжей и изгибов между ними. Полость бочонка пересекает α-спираль, определенные аминокислоты которой формируют хромофор [247-249]. Как правило, аминокислотные остатки хромофорного окружения участвуют в его стабилизации. На рисунке 24 изображена структура молекулы GFP.

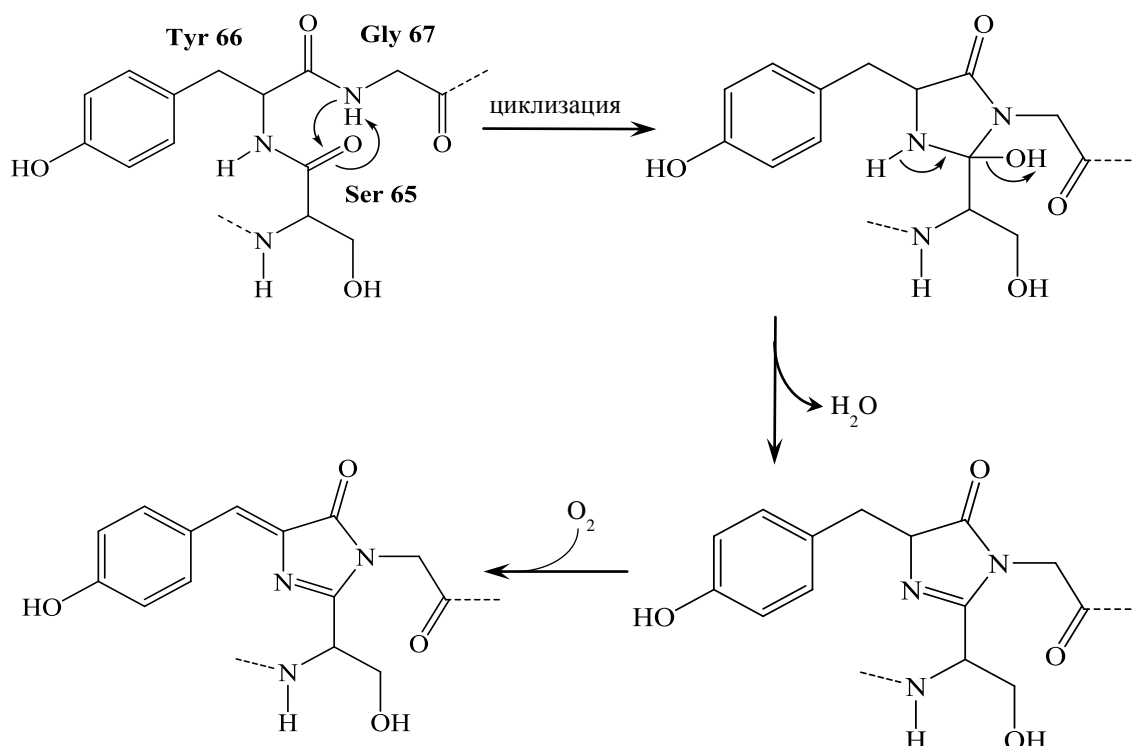


**Рисунок 24. Структура молекулы GFP**

[<http://zeiss-campus.magnet.fsu.edu/articles/probes/images/aequoreaefpintrofigure1.jpg>]

Хромофор GFP дикого типа сформирован из аминокислотных остатков Ser65-Тур66-Gly-67  $\alpha$ -спирали, проходящей через полость  $\beta$ -бочонка [250]. Для его формирования большое значение имеет микроокружение хромофора, способствующее протеканию специфических реакций. Этот процесс называют созреванием флуоресцентного белка, и он включает в себя несколько стадий. На рисунке 25 приведены реакции, необходимые для созревания хромофора GFP. Сначала происходит циклизация между остатками Ser65 и Gly67, далее происходит дегидратация промежуточного соединения и образование производного имидазола. На следующей стадии происходит окисление Тур66 молекулярным кислородом [247, 251, 252]. В результате этих реакций образуется система сопряженных двойных связей.

Спектр возбуждения флуоресценции GFP дикого типа имеет два пика с максимумами 398 нм и 475 нм, при этом для эмиссии характерен один пик с максимумом 500 нм. Возбуждение в области 475 нм обусловлено депротонированным состоянием хромофора, а в области 398 нм – протонированным. Речь идет о протонированной/депротонированной гидроксильной группы Тур66 в составе хромофора. Один пик эмиссии объясняется тем, что протонированное состояние хромофора переходит в депротонированное благодаря перемещению  $H^+$  на Glu222 через систему водородных связей хромофорного окружения [253, 254].



**Рисунок 25. Схема реакций формирования хромофора GFP**

К настоящему моменту найдено и искусственно создано большое разнообразие флуоресцентных белков, перекрывающих всю видимую часть спектра [246, 255], что позволяет использовать сразу несколько флуоресцентных сигналов в пределах одной клетки. Различные флуоресцентные белки отличаются по своему аминокислотному составу и его окружению, олигомерному состоянию. Всему разнообразию и свойствам отдельных флуоресцентных белков может быть отведена отдельная глава. В нашем «Обзоре литературы» мы не ставим подобной задачи. Поскольку настоящая работа посвящена генетически кодируемым флуоресцентным сенсорам, мы рассмотрели общие особенности GFP-подобных белков как основу подобных сенсоров, о которых и пойдет далее повествование.

### 1.3.2. Сенсоры на основе флуоресцентных белков

К настоящему времени уже разработано большое количество всевозможных биосенсоров на основе флуоресцентных белков. Принцип их действия основан на том, что при специфическом взаимодействии с исследуемой молекулой или изменении некоторых клеточных параметров, как, например, внутриклеточного значения pH, происходят изменения спектральных свойств флуоресцентных белков в составе биосенсоров.

Биосенсоры приобретают всю большую популярность по сравнению с синтетическими индикаторами. Главное их преимущество заключается в возможности

их использования в живых целостных системах, как на клеточном уровне, так и на уровне целого организма. Это осуществимо благодаря белковой природе этих молекул. Большинство проблем, связанных с использованием красителей в научных исследованиях, с появлением индикаторов нового поколения были сведены к минимуму. В частности, биосенсоры на основе флуоресцентных белков фотостабильнее, менее токсичны в сравнении со своими химическими аналогами.

В самом простом варианте биосенсор представляет собой обычную молекулу флуоресцентного белка, флуоресцентные свойства которого зависят от изменения отдельных параметров его окружения. Например, благодаря устройству хромофора GFP и его способности пребывать в протонированном и депротонированном состояниях, были созданы мутантные версии GFP, позволяющие регистрировать изменения величины pH в клетках [256-259]. Такие pH-индикаторы были получены введением некоторых мутаций в структуру флуоресцентного белка, что привело к изменению значения  $pK_a$  его хромофора. У некоторых из существующих версий сохранено два пика на спектрах возбуждения их флуоресценции. При увеличении значения pH происходит падения пика, соответствующего протонированной форме хромофора и, наоборот, приводит к увеличению пика анионной формы. Имеются индикаторы и с одним пиком возбуждения, интенсивность которого также увеличивается при росте pH [258]. Такие индикаторы успешно применяются и для регистрации динамики изменения pH внутри разных клеточных компартментов, например, в митохондриях или аппарате Гольджи [259]. Другим примером служат GFP-подобные белки, особенность которых выражается в изменении флуоресценции при связывании анионов некоторых галогенов вблизи хромофора. Существуют индикаторы для регистрации ионов хлора и йода, причем изменения сродства к определенному аниону добились путем внесения определенных мутаций в структуру белка [260, 261].

Другая категория биосенсоров построена на использовании FRET (Forster (fluorescent) resonance energy transfer) – процесса, при котором происходит перенос энергии от донорного возбужденного хромофора к акцепторному [262]. Из данной формулировки ясно, что в структуру биосенсоров такого типа входят два спектрально различающихся флуоресцентных белка. Очень важно, чтобы в такой флуоресцентной паре спектр эмиссии донорного хромофора перекрывался со спектром поглощения акцепторного. Чаще всего используют циановый (CFP) и желтый (YFP) флуоресцентные белки [263]. Вторым важным условием переноса энергии от одного хромофора к другому является непосредственная их близость в пространстве. Это свойство используют для создания биосенсоров. Благодаря изменению расстояния

между FRET-парой такого сенсора, вызванного конформационными подвижками или белок-белковыми взаимодействиями в ответ на определенный стимул, происходит изменение флуоресцентного сигнала.

Этот подход был использован для создания  $\text{Ca}^{2+}$ -сенсора Cameleon-1. В качестве чувствительных доменов биосенсора использовали фрагмент киназы легких цепей миозина M13 и кальмодулин. FRET-парой изначально были BFP и GFP-S65T, которую позже заменили на CFP и YFP, сенсор затем получил название YC (Yellow Cameleon). При связывании  $\text{Ca}^{2+}$  кальмодулин взаимодействует с M13, образуя компактную структуру. Вызванное этим изменение расстояния между флуорофорами и, следовательно, изменение флуоресцентного сигнала позволяет визуализировать эти конформационные события и регистрировать колебания  $\text{Ca}^{2+}$  [264].

На том же самом принципе построена работа биосенсоров, регистрирующих еще один важный вторичный мессенджер цАМФ. Для создания сенсора на цАМФ потребовалось найти белок, который специфично связывает цАМФ и при этом меняет свою конформацию. Конформационные изменения необходимо также регистрировать с помощью FRET-пары. В одном из вариантов сенсора для цАМФ в качестве субстрат связывающей части выбрали протеинкиназу A, функционирующую в виде гетеротетрамера. В составе сенсора через линкер объединили регуляторную и каталитическую субъединицы протеинкиназы A, а также два флуоресцентных белка для осуществления FRET. Сначала это были EBFP и GFP [265], а затем появился сенсор и на основе CFP и YFP [266]. При связывании цАМФ регуляторная субъединица претерпевает конформационные изменения, в результате которых ослабевают ее взаимодействия с каталитической субъединицей, и они диссоциируют друг от друга. Таким образом, FRET не происходит или значительно падает в присутствии цАМФ в окружении биосенсора и наоборот появляется, когда субъединицы протеинкиназы A сближаются в отсутствие мессенджера [265]. Позднее появилась версия этого сенсора, у которого была заменена субстрат связывающая часть. Субъединицы протеинкиназы A заменили на белок Ерас, цАМФ-зависимый фактор, обеспечивающий обмен гуаниннуклеотидов некоторых ГТФаз. Для этого белка также характерно цАМФ-индуцируемое изменение конформации [267]. Благодаря этой замене биосенсор для цАМФ стал более быстрым [268-270]. С помощью этого подхода впервые удалось показать распределение цАМФ в пределах цитоплазмы, ядра, митохондрий клетки.

Идея биосенсоров на основе FRET применяется и для изучения активности некоторых ферментов, например, протеинкиназ и протеаз, которые зачастую играют важную роль в различных процессах. Для изучения активности интересующей

протеинкиназы в определенном клеточном процессе можно создать биосенсор, который помимо FRET-пары включает в себя субстрат для исследуемой протеинкиназы и белок, который бы узнавал и взаимодействовал с этим субстратом после его фосфорилирования по конкретным сайтам. Таким образом, регистрируемый FRET означает, что исследуемая киназа действительно проявляет активность в данном процессе и осуществляет фосфорилирование субстрата в составе сенсора [271]. Аналогичный принцип характерен для сенсоров, которые позволяют регистрировать активность некоторых протеаз с той лишь разницей, что между флуоресцентными белками находится фрагмент со специфичным сайтом протеолиза. При проявлении протеазной активности в том или ином процессе этот сайт расщепляется, а флуоресцентные белки удаляются друг от друга, нарушая FRET взаимодействия [272].

Разнообразие FRET сенсоров в принципе неограниченно. Для визуализации интересующих белок-белковых взаимодействий достаточно правильно разместить пару флуоресцентных белков, осуществляющих FRET. Это можно осуществить в пределах одного конформационно подвижного белка или на разных, специфично взаимодействующих.

Третий тип флуоресцентных биосенсоров построен на базе одного пермутированного флуоресцентного белка. Применение метода круговой пермутации GFP-подобных белков необходимо для увеличения подвижности хромофорного окружения и, следовательно, для большей лабильности спектральных свойств белка. Исходная структура  $\beta$ -бочонка очень жесткая, а хромофор надежно стабилизирован своим окружением. Поэтому в структуру GFP-подобного белка на уровне гена примерно посередине вносится разрыв, две половины гена переставляются местами с совмещением N- и C- концов. Синтезированный флуоресцентный белок имеет ту же структуру  $\beta$ -бочонка, но теперь нативные N- и C- концы связаны через небольшой искусственный линкер, а новые N- и C- концы расположены в месте разрыва одного из  $\beta$ -листов. В таких биосенсорах целостность  $\beta$ -бочонка нарушена, его свободные концы сшивают с некими взаимодействующими доменами, конформационные изменения которых могут передаваться и на флуоресцентный белок, что приводит к изменению его спектральных свойств [273, 274].

Создание биосенсоров подобного типа является более сложным процессом, нежели создание остальных. Это связано с тем, что необходимо учитывать многие факторы при разработке каждой из таких молекул. При изменении структуры GFP-подобного белка необходимо, чтобы он не утратил своих флуоресцентных свойств. Не должны быть нарушены и функции сенсорной части, которая одновременно с этим

должна участвовать в изменении хромофорного окружения флуоресцентного белка. Тем не менее, биосенсоры на основе пермутированного флуоресцентного белка обладают рядом преимуществ даже перед сенсорами, основанными на FRET взаимодействиях. Они обладают большим динамическим диапазоном и меньшим молекулярным весом. Кроме того, использование биосенсора на основе одного флуоресцентного белка в меньшей степени зависит от разных артефактов, связанных, прежде всего, с разной рН чувствительностью и скоростью созревания двух флуоресцентных белков в составе одного биосенсора.

Сенсоры для регистрации  $\text{Ca}^{2+}$  стали первыми, содержащими в своей основе пермутированные флуоресцентные белки. В качестве сенсорной части по-прежнему используется M13 и кальмодулин, концы которых уже связаны с пермутированным белком. При связывании  $\text{Ca}^{2+}$  с кальмодулином происходит его взаимодействие с фрагментом M13, в результате чего меняется пространственная конформация всей молекулы сенсора. Так устроены биосенсоры GCaMP, который является интенсификационным на базе пермутированного EGFP [275], и ратиометрический Pericam на базе EYFP [276]. К настоящему моменту создана полная цветовая палитра для регистрации  $\text{Ca}^{2+}$  на основе различных пермутированных флуоресцентных белков разного цвета [277].

Позже были созданы и другие биосенсоры на основе одного пермутанта. Например, Perceval для регистрации клеточного соотношения АТФ/АДФ [278], COSer для регистрации молекулы CO [279]. В этих биосенсорах использовали бактериальные белки, которые способны изменять свою конформацию в ответ на изменение соотношения АТФ/АДФ в первом случае и концентрации CO во втором, запуская в клетке сложные механизмы внутриклеточного ответа. Пермутантный флуоресцентный белок в данных случаях интегрирован прямо в структуру бактериальных белков, специфично меняющих свою конформацию. Но впервые такой подход интегрирования пермутанта в структуру другого конформационно подвижного белка был применен для создания биосенсора HyPer [280].

### **1.3.3. Флуоресцентные сенсоры для регистрации окислительно-восстановительных процессов**

Большое количество биосенсоров разработано на основе флуоресцентных белков, в том числе помогающих изучать внутриклеточные окислительно-восстановительные процессы.

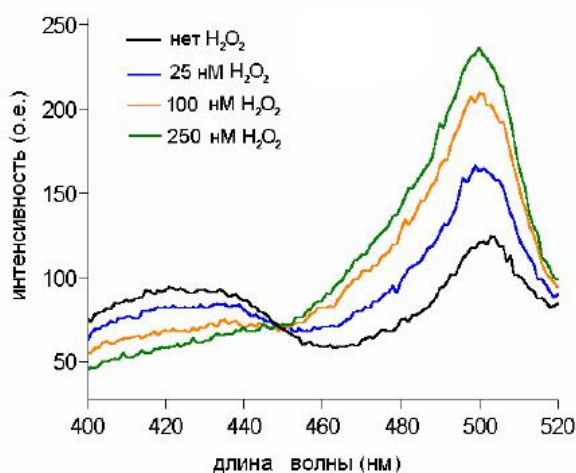
### ***HyPer***

Генетически кодируемый биосенсор HyPer (от Hydrogen Peroxide) позволяет изучать роль молекулы  $H_2O_2$  в процессах, происходящих в клетке и ее компартментах. Основу функционирования этого биосенсора составляют транскрипционный фактор *E. coli* OxyR и вставленный в его последовательность пермутированный желтый флуоресцентный белок (cpYFP) [280].

В бактериальной клетке белок OxyR активирует экспрессию ряда генов в ответ на увеличение концентрации  $H_2O_2$ . С-концевой домен OxyR выполняет регуляторную функцию. В присутствии  $H_2O_2$  происходит образование дисульфидной связи в его структуре между цистеиновыми остатками Cys-199 и Cys-208, что приводит к конформационным изменениям всего белка OxyR [281]. При этом его реакция специфична и обратима.

В составе HyPer белок OxyR выполняет ту же функцию. cpYFP интегрирован в последовательность чувствительного к  $H_2O_2$  домена OxyR в позицию между аминокислотами 205 и 206 посредством коротких пептидных линкеров Ser-Ala-Gly и Gly-Thr. При этом в структуре биосенсора отсутствует N-концевая часть OxyR, ответственная за связывание ДНК. В результате окисления HyPer под действием  $H_2O_2$  происходят конформационные изменения регуляторного домена OxyR, передающиеся на структуру cpYFP [280].

Для HyPer характерно наличие двух пиков возбуждения флуоресценции 420 нм и 500 нм, и один пик эмиссии с максимумом на 516 нм. В присутствии  $H_2O_2$  для биосенсора наблюдается пропорциональное увеличение интенсивности возбуждения при 500 нм и уменьшение при 420 нм [280]. Изменения спектра возбуждения флуоресценции HyPer в ответ на  $H_2O_2$  изображены на рисунке 26.



***Рисунок 26. Зависимость спектра возбуждения флуоресценции HyPer от концентрации  $H_2O_2$  [280]***

HyPer является ратиометрическим сенсором. Его сигнал определяют как соотношение интенсивностей флуоресценции отдельно возбуждаемой при 500 нм и 420 нм ( $F_{500}/F_{420}$ ). *In vitro* полностью восстановленный HyPer в концентрации 25 нМ реагирует на добавление 25 нМ  $H_2O_2$ , добавление 250 нМ  $H_2O_2$  приводит к полному окислению сенсора. Чувствительность и специфичность HyPer к  $H_2O_2$  сравнима с таковыми для OxyR дикого типа [280].

### ***Редокс активные GFP***

До появления генетически кодируемых флуоресцентных индикаторов не существовало методов, позволяющих регистрировать изменения в живых системах такого важного параметра, как соотношение окисленной и восстановленной форм глутатиона (GSSG/GSH). Поскольку этот параметр определяет состояние тиоловых групп в клетке, были попытки создать биосенсор на базе флуоресцентного белка с замененными аминокислотными остатками на остатки цистеинов по некоторым позициям. Предполагалось, что образование или наоборот восстановление дисульфидной связи возле хромофорного окружения белка будет приводить к изменению его флуоресценции.

Первым таким сенсором стал rYFP (redox sensitive yellow fluorescent protein). В структуру флуоресцентного белка были внесены замены N149C и S202C, располагающиеся на соседних  $\beta$ -листах неподалеку от хромофора. Введенные цистеины способны образовывать дисульфидную связь и вызывать изменения хромофорного окружения, что приводит к падению интенсивности флуоресценции [282].

Несколько позже были созданы версии и на основе GFP, названные roGFP (redox green fluorescent protein). Путем введения замен S147C, Q204C и C48S в структуру GFP был получен roGFP1. Дополнительная мутация в его структуре S65T позволила создать roGFP2, который отличается по спектральным характеристикам от roGFP1 благодаря тому, что у roGFP2 преобладает депротонированная форма хромофора над протонированной. У roGFP1 преобладает наоборот протонированная. Оба сенсора ратиометрические благодаря наличию двух пиков возбуждения флуоресценции, что является преимуществом перед интенсифицированным rYFP [283, 284].

Реакция тиол-дисульфидного обмена с участием rYFP и roGFP довольно медленная. Поэтому к roGFP2 пришили глутаредоксин Grx1 с целью ускорить эту реакцию. Полученный биосенсор Grx1-roGFP2 действительно является самым быстрым и чувствительным индикатором для регистрации соотношения GSSG/GSH. Кроме того, roGFP2 в составе новой структуры сохранил свои ратиометрические параметры [285].

По примеру Grx1-roGFP2 был создан биосенсор для регистрации  $H_2O_2$ . Для этого roGFP2 связали с дрожжевой пероксидазой Orp1. Окисление цистеинов roGFP2 в составе сенсора Orp1-roGFP2 с участием  $H_2O_2$  происходит не прямым образом, а опосредованно через пришитую пероксидазу [286]. Работа биосенсора Orp1-roGFP2 может служить моделью окисления клеточных тиолов. Очевидно, что и в системе *in vivo* различные пероксидазы могут участвовать в окислении тиоловых групп некоторых цистеинов.

### ***Биосенсоры для регистрации соотношения НАД<sup>+</sup>/НАДН***

Ранее мы подробно обсудили значение этого клеточного параметра. На момент создания нашего сенсора для регистрации соотношения НАД<sup>+</sup>/НАДН в клетках независимо были опубликованы сразу два биосенсора для выполнения этой же задачи. Поэтому на сегодняшний день представлено три разных сенсора, регистрирующих динамику изменения соотношения НАД<sup>+</sup>/НАДН в живых системах.

Два из них Peredox и Frex построены на базе димера белков семейства Rex. Между мономерами Rex через искусственные линкеры интегрированы пермутированные флуоресцентные белки. В случае биосенсора Peredox это T-Sapphire, а в случае Frex это cpYFP. Изменения флуоресцентного сигнала этих биосенсоров связаны с взаимодействиями мономеров белка Rex в зависимости от показателя соотношения НАД<sup>+</sup>/НАДН [287, 288]. Из-за высокой чувствительности Peredox не может быть использован в условиях высокого содержания НАДН, например, в митохондриях [287]. Биосенсор Frex представлен несколькими версиями с разным сродством к НАДН. Отдельные варианты этого сенсора предпочтительнее использовать в митохондриях или цитоплазме, что также не позволяет проводить прямое сравнение динамики изменений соотношения НАД<sup>+</sup>/НАДН между этими клеточными компартментами [288].

Третий вид сенсора RexYFP, созданный в нашей группе, построен на другом принципе и обладает некоторыми преимуществами и недостатками по сравнению с Peredox и Frex, поэтому является хорошим альтернативным вариантом существующим. Создание, свойства и сравнительная характеристика биосенсора RexYFP изложена в отдельной части главы «Результаты и обсуждение».

## ЦЕЛИ И ЗАДАЧИ

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

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

## ГЛАВА 2

### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

#### 1.1. ОБОРУДОВАНИЕ

Автоматические пипетки (Gilson); настольная центрифуга MiniSpin (Eppendorf); вортекс Model CV1500; водный термостат TW203 (ELMI); настольный термостат Термо48 (Biokom); лабораторный pH-метр pH410 (Аквилон); бактериальный термостат; суховоздушный термостат-шейкер Excella 25 (New Brunswick Scientific); настольный охладитель проб SC 2D (Biokom); оборудование для горизонтального гель-электрофореза: CBS Scientific Company EPS 250, GNA-200, Hoefer HE33 (Pharmacia), Minicell EC370M (E-C Apparatus Corp.); весы лабораторные: Clio (Anselma-Industrie), TC-64 (Denver); УФ-трансиллюминатор TF-20M; анализатор изображения Alpha Imager 2000 (Alpha Innotech Inc.); амплификатор: PTC-100 Thermal Cycler (MJ Research); электропоратор MicroPulser (BioRad); кюветы для электропорации (BioRad); CO<sub>2</sub> инкубатор; культуральный ламинарный шкаф (FluFrance); световой микроскоп Optiphot Nikon; флуоресцентный микроскоп Leica DMI 6000 B; конфокальный флуоресцентный микроскоп Perkin Elmer UltraView Vox Spinning Disk; конфокальный флуоресцентный микроскоп Zeiss LSM 710; флуоресцентный бинокляр Olympus US SZX12; спектрофлуориметр Cary Eclipse (Varian); спектрофотометр Cary 100 Bio (Varian); кюветы для спектрофотометра и флуориметра; прибор для разрушения клеток ультразвуком Sonic Dismembrator (Fisher Scientific); флаконы для культивирования эукариотических клеток 75 см<sup>2</sup> (Costar), чашки Петри 35 мм для микроскопии (Labtech), (MatTek); 6 и 8-ми луночные  $\mu$ -слайды для микроскопии (ibidi).

#### 2.2. МАТЕРИАЛЫ

В работе использовали следующие реактивы: H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, этанол, изоамиловый спирт, изопропиловый спирт, уксусная кислота, медицинский хлороформ, фенол, NaOH, NaCl, MgCl<sub>2</sub>, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, ацетат калия, ацетат натрия, глицерин, динатриевая соль этилендиамина тетрауксусной кислоты (ЭДТА),  $\beta$ -меркаптоэтанол, ампициллин (Sigma), канамицин (Sigma), фенол, ИПТГ (изопропил-1-тио- $\beta$ -D-галактозид), бычий сывороточный альбумин (SibEnzyme, NEB), глюкоза (Sigma), НАД<sup>+</sup> (Sigma), НАДН (Sigma), НАДФН (Sigma), АТФ (AppliChem), ротенон (Sigma), натриевая соль молочной кислоты (лактат-Na) (Sigma), натриевая соль пировиноградной кислоты

(пируват-Na), 3-нитропропионовая кислота (3-NP) (Sigma), цианид m-хлорофенилгидразон (CCCP) (Sigma), агароза, трис-гидроксиметиламинометан (Tris), бромистый этидий, бакто-агар, деионизованная вода mQ, бакто-триптон, дрожжевой экстракт (Difco), глюкозо-6-фосфат дегидрогеназа (Sigma), гексокиназа (Sigma).

#### ***Коммерческие реактивы для молекулярного клонирования***

В работе использовали: термостабильные ДНК полимеразы Tersus polymerase (Evrogen), Encyclo polymerase (Evrogen), Taq polymerase (Evrogen) с прилагаемыми соответствующими буферами; дезоксирибонуклеотиды (dNTPs) (Fermentas); олигонуклеотидные праймеры для проведения ПЦР были синтезированы фирмой Evrogen; эндонуклеазы рестрикции BamHI (SibEnzyme), HindIII (SibEnzyme), PstI (SibEnzyme), Asu NHI (NheI) (SibEnzyme), AsiGI (изошизомер AgeI) (SibEnzyme), CsiNI (изошизомер NotI) (SibEnzyme), Sfr274I (изошизомер XhoI) (SibEnzyme) и прилагаемые для их работы буферы (SibEnzyme) и BSA (SibEnzyme); РНК-аза А (SibEnzyme); высокоактивная ДНК-лигаза фага Т4 (SibEnzyme, Promega) с соответствующим буфером; набор для проведения случайного мутагенеза Diversity PCR Random Mutagenesis kit (Clontech); смесь Screen Mix для проведения скрининга конструкций (Evrogen); коммерческий набор реактивов для очистки ДНК (Qiagen, Evrogen); набор реактивов для экстракции ДНК (Evrogen); маркер для электрофореза нуклеиновых кислот 1 kbase ladder (SibEnzyme)..

#### ***Векторы***

pQE30 (Quiagen), pC1 (Clontech), pHyPer-Cyto (Evrogen), pHyPer-dMito (Evrogen), pcDNA3.1-Peredox-mCherry (Addgene 32383), pDestTol2CG2 (предоставлен профессором С. Grabher, Karlsruhe Institute of Technology, Германия).

#### ***Реактивы для выделения белка***

Смола TALON (Clontech), имидазол (Sigma), для очистки белков использовали колонки с готовым носителем Micro Bio-Spin P-30 Tris Chromatography Columns (BioRad), сефадекс G-50 (GE Healthcare Life Sciences).

#### ***Бактериальные штаммы и микробиологические среды***

Среда LB (1% триптон; 0,5% дрожжевой экстракт; 0,1% NaCl; 0,01 мМ Трис-НСl рН 8,0). Среду автоклавировали 45 мин при 1 атм. и хранили при комнатной температуре. Перед автоклавированием в среду дополнительно добавляли агар (Difco) до концентрации 1,5 %. Для селекции клеток, содержащих плазмиду, в среду добавляли ампициллин до концентрации 50-100 мкг/мл или канамицин до концентрации 35 мкг/мл.

Среда SOB (2% триптон, 0,55% дрожжевой экстракт; 0,01 мМ Трис-НСl pH 8,0; 10 мМ NaCl; 10 мМ KCl; 20 мМ Mg<sup>2+</sup> (в виде MgCl<sub>2</sub> и MgSO<sub>4</sub>)). Среду автоклавировали 45 мин при 1 атм. и хранили при температуре -20°C.

В работе использовали штамм E. coli XL1 Blue (Invitrogen).

#### ***Клеточные линии и среды***

В работе использовали клетки линии HeLa-Kyoto (предоставлены профессором C.Schultz (European Molecular Biology Laboratory, Германия)), HeLa (ATCC), HEK293 (ATCC).

При работе с эукариотическими клетками использовали: трансфецирующий реагент FuGene6 (Roche), среду DMEM (ПанЭко), DMEM High Glucose (Gibco); FBS - fetal bovine serum hit inactivated (PAA Laboratories), FCS – fetal calf serum (Gibco), антибиотики стрептомицин и ампициллин (ПанЭко), глутамин (ПанЭко), раствор Версена (ПанЭко), раствор Трипсин-ЭДТА (ПанЭко), раствор Хэнкса без бикарбоната натрия (ПанЭко), Opti Mem (Invitrogen), Minimum Eagle MEM (Sigma-Aldrich) с добавлением 20 мМ Hepes-Na (ПанЭко); Live Cell Imaging Solution (Gibco).

#### ***Разведение Danio rerio***

В работе использовали Danio rerio линии АВ (дикий тип), среда для выращивания эмбрионов E3 (5 мМ NaCl, 0,17 мМ KCl, 0,33 мМ CaCl<sub>2</sub>, 0,33 мМ MgSO<sub>4</sub>, and 0,1% метиленовый синий, pH 7,0), трикаин (Sigma).

#### ***Состав общих буферных растворов***

буфер TAE (50 мМ Трис-ацетат (pH 8,0); 20 мМ ацетат натрия; 2 мМ ЭДТА).

буфер для нанесения ДНК для агарозного электрофореза (ксиленцианол 0,1%; бромфеноловый синий 0,1%; SDS 0,5%; ЭДТА 1 М pH 8; глицерол 50%).

буфер для выделения белка (40 мМ Tris-НСl, 150 мМ NaCl, pH 7,5).

раствор I (10 мМ Трис-НСl pH 8; 1 мМ ЭДТА; РНКазы А (10 мг/мл)).

раствор II (0,2 М NaOH; 1% SDS).

раствор III (3 М ацетата калия, pH 4,8).

PBS (ПанЭко) (120 мМ NaCl, 7 мМ Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 3 мМ NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 2,7 мМ KCl).

## 2.3. МЕТОДЫ

### 2.3.1. Методы молекулярного клонирования

#### *Аmplификация ДНК*

На стадиях направленного мутагенеза, клонирования и тестирования полученных конструкций использовали стандартную ПЦР. Амплификацию проводили на приборе PTC-100 Thermal Cycler (MJ Reserch). Каждая реакционная проба содержала термостабильную полимеразу с соответствующим буфером, праймеры (0,5 мкМ), эквимольную смесь dNTP (0,5 мкМ), матричную ДНК (10 - 100 нг). Для доведения смеси до нужного объема (25-50 мкл) использовали H<sub>2</sub>O степени очистки milliQ. Для создания биосенсора, регистрирующего соотношение НАД<sup>+</sup>/НАДН, ген белка T-Rex амплифицировали с геномной ДНК *Thermus thermophilus* с помощью праймеров 5'-TATTGGATCCATGAAGGTCCCGAAGCGGCC-3' и 5' -TCAAAGCTTTCACCCCATCATCTCTCCCGCC-3'.

Для получения конструкций с содержанием направленных точечных мутаций проводили сайт-направленный мутагенез с использованием метода «overlap extention PCR» по прилагаемому протоколу [286]. Этот метод подразумевает, что в качестве матрицы и затравки применяются присутствующие в реакционной смеси фрагменты с комплементарными друг другу участками.

Случайный мутагенез проводили для улучшения свойств некоторых конструкций с использованием набора для случайного мутагенеза (Clontech) и прилагаемой производителем методики.

Для ПЦР скрининга бактериальных колоний на содержание вектора с нужной вставкой использовали смесь Screen Mix (Evrogen). Для этого замешивали реакционную смесь по методике производителя с добавлением нужных праймеров, затем к каждой пробе добавляли биомассу клеток отобранных колоний. Перед началом стандартной ПЦР смесь инкубировали 1 мин при 95 °С для разрушения клеток и выхода плазмидной ДНК в раствор.

#### *Электрофорез в агарозном геле*

Разделение и анализ ДНК фрагментов проводили в 1 % агарозном геле. Гель готовили на TAE буфере с добавлением бромистого этидия до конечной концентрации 0,5 мкг/мл. Электрофорез проводили в этом же буфере при токе около 160 мА. Каждый образец ДНК в объеме 1 - 2 мкл смешивали с небольшим количеством буфера для нанесения. В случае очистки ДНК на гель наносили всю пробу. Для идентификации длины фрагмента и концентрации пробы использовали маркер 1 kbase ladder

(SibEnzyme), которого наносили примерно 25 нг на лунку геля. Полученные результаты анализировали с использованием прибора Alpha Imager 2000. В случае последующего выделения ДНК из геля использовали УФ трансиллюминатор TF20M.

### ***Рестрикция***

В работе использовали эндонуклеазы рестрикции и соответствующие буферы фирмы SibEnzyme, следуя прилагаемому протоколу производителя. Рестрикцию проводили в объеме 30 мкл при 37 °С в течение 1 часа для ПЦР продуктов и в течение 3 часов для плазмидной ДНК. После рестрикции пробы ДНК подвергали очистке.

### ***Лигирование***

Лигирование полученных фрагментов в экспрессионные векторы (pQE30, pC1) осуществляли с использованием высокоактивной лигазы фага T4 (SibEnzyme или Promega). Реакцию проводили в объеме 10-15 мкл в течение 14-16 часов при 14 °С. К реакционной смеси добавляли 1 мкл лигазы (20 ед/мкл), соотношение вектор:вставка составляло примерно 1:4.

### ***Очистка ДНК***

После ПЦР или рестрикции ДНК фрагменты очищали. Для этого объем пробы доводили до 100 мкл водой milliQ. Добавляли 50 мкл насыщенного фенола и 50 мкл смеси хлороформа с изоамиловым спиртом (24:1). Полученную смесь перемешали и центрифугировали 10 минут при 13400 об/мин. Отбирали верхнюю водную фазу и повторно добавляли 100 мкл смеси хлороформа и изоамилового спирта с последующим центрифугированием при 13400 об/мин в течение 5 минут. Отобранную верхнюю водную фазу переосаждали этанолом. Кроме того, использовали коммерческий набор реактивов фирмы Evrogen для выделения фрагментов ДНК из реакционных смесей на колонках, следуя протоколу производителя.

### ***Переосаждение ДНК с помощью этанола***

Метод переосаждения ДНК этанолом использовали для концентрирования пробы или для обессоливания перед электрической трансформацией. К образцу добавляли 1/10 объема раствора III. После перемешивания добавляли 3 объема 96 % этанола и центрифугировали 10 мин при 13400 об/мин. Супернатант удаляли, полученный осадок промывали таким же объемом 80 % этанола. Осадок высушивали и растворяли в необходимом объеме H<sub>2</sub>O milliQ.

### ***Выделение ДНК из геля***

Для очистки ДНК фрагмента определенной длины из нескольких в смеси осуществляли с помощью гель-электрофореза. Для этого после проведения электрофореза из агарозного геля под УФ трансиллюминатором TF20M вырезали

необходимой длины фрагменты. Для выделения ДНК из геля использовали колонки и реактивы фирмы Evrogen, следуя протоколу производителя.

### ***Трансформация компетентных клеток***

В работе использовали клетки *E. coli* штамма XL 1 Blue.

Электрическую трансформацию (электоропорацию) проводили при низкой концентрации ДНК в пробе, например, в пробах лигатов. Лигированную ДНК предварительно переосаждали этанолом и растворяли в воде milliQ. Компетентные клетки перед трансформацией размораживали на льду, добавляли 10-100 нг ДНК и помещали в кюветы для электоропорации (BioRad). Электоропорацию проводили с помощью прибора MicroPulser (BioRad), программа Ec1. После чего к суспензии клеток добавляли 1 мл среды SOB, инкубировали 40-60 минут при перемешивании 100-150 об/мин на 37 °С и засеивали на твердую среду LB (1,5 % бактоагар на LB) с антибиотиком.

Трансформацию компетентных клеток очищенной плазмидной ДНК осуществляли химическим методом. Для этого компетентные клетки предварительно размораживали на льду, добавляли от 200 нг плазмидной ДНК и инкубировали на льду еще 10 мин. После чего клетки подвергали тепловому шоку, для этого в течение 1 минуты их прогревали при 42 °С и снова помещали на 2 минуты в лед. Далее клетки сразу же засеивали на твердую среду LB (1,5 % бактоагар на LB) с антибиотиком.

Чашки Петри с 1,5 % бактоагаром на среде LB, на которые засеивали затрансформированные компетентные клетки) инкубировали в течение 14-16 часов при 37 °С в термостате.

### ***Выделение плазмидной ДНК***

Для наработки плазмидной ДНК небольшое количество клеток бактерий, содержащих нужный вектор, помещали в 5-8 мл жидкой среды LB с добавленным антибиотиком. Пробы инкубировали в течение 16-18 часов при 37 °С и постоянном перемешивании 200 об/мин. На следующий день клеточную культуру осаждали центрифугированием в течение 2 мин при 5000 об/мин. Осадок клеток ресуспендировали в 250 мкл раствора I. Затем добавляли 250 мкл раствора II и 350 мкл раствора III. Полученную смесь аккуратно перемешивали (без вортекса) и центрифугировали 12 мин при 13400 об/мин. Супернатант переносили в новую пробирку и добавляли 750 мкл изоамилового спирта, перемешивали и центрифугировали 10 мин при 13400 об/мин. На этой стадии происходит осаждение ДНК, который далее промывали добавлением 500 мкл 80 % этанола с последующим центрифугированием в течение 5 мин при 13400 об/мин. Пробу просушивали и

добавляли необходимый объем воды milliQ. Кроме того, в работе использовали коммерческий набор для выделения плазмидной ДНК фирмы Evrogen, следуя протоколу производителя.

#### ***Определение нуклеотидной последовательности ДНК***

Определение нуклеотидной последовательности ДНК было выполнено на заказ фирмой Evrogen. Анализ полученных последовательностей проводили с помощью пакета программ DNASTar.

#### ***Отбор бактериальных клонов***

Отбор оптимальных клонов, экспрессирующих версию биосенсора, на первом этапе осуществляли с помощью флуоресцентного бинокулярного микроскопа (Olympus US SZX12). Визуально оценивали наличие флуоресценции и яркость отдельных колоний *E.coli*, экспрессирующих биосенсор, при возбуждении в синей и фиолетовой областях спектра, поскольку все биосенсоры в настоящей работе созданы на основе пермутированного желтого флуоресцентного белка сrYFP. Учитывали скорость появления флуоресценции отдельных колоний. Отобранные клоны переносили на новую чашку Петри и подращивали при 37 °С в течение 14-16 часов. На следующем этапе с помощью спектрофлуориметра (Varian Cary Eclipse) оценивали спектральные характеристики полученных белков. Для этого клетки, являющиеся потомками одного отобранного на первом этапе клона, в небольшом количестве отбирали и ресуспендировали в 1 мл буфера PBS в кювете для флуориметра. Детектировали спектры возбуждения флуоресценции в интервале 400 – 500 нм (при эмиссии 530 нм). При работе с версиями биосенсора НуPer добавляли 100 – 250 мкМ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> и регистрировали изменения спектров отобранных клонов.

### **2.3.2. Методы работы с белком**

#### ***Выделение белка***

Клетки *E. coli* штамма XL 1 Blue трансформировали плазмидой pQE30, кодирующей исследуемый белок, и высевали на чашки Петри с LB агаром. Подращивали в течение 14-16 часов при 37 °С. На следующий день все выросшие клоны с чашки помещали в жидкую среду LB объемом 100 мл. После чего вновь подращивали в течение ночи на комнатной температуре при интенсивном перемешивании (200 об/мин).

Клетки полученной культуры осаждали центрифугированием в течение 15 мин при 2000 g и температуре 4 °С. Полученные осадки ресуспендировали в 40 мМ Трис-НCl буфере с содержанием 150 мМ NaCl и pH 7,5. Далее клетки разрушали

ультразвуком с помощью прибора Sonic Dismembrator (Fisher Scientific) и центрифугировали в течение 30 мин при 18000 g и температуре 4 °C. Супернатант перенесли на колонку со смолой TALON (Clontech), предварительно уравновешенную охлажденным буфером, который использовали для ресуспендирования. После нанесения пробы на носитель колонку несколько раз промыли и затем элюировали тем же буфером, но с содержанием 250 мМ имидазола. Очищенную белковую фракцию собирали. При выделении версий биосенсора NuPer на всех этапах в растворе содержалось 5 мМ β-меркаптоэтанола, поскольку молекула сенсора легко окисляется.

#### ***Обессоливание белка***

Для очистки белкового препарата от имидазола использовали гель-фильтрацию на колонках Micro Bio-Spin P-30 Tris Chromatography Columns (Bio Rad) или на колонке с сефадекс G-50 (GE Healthcare Life Sciences), уравновешенной буфером 40 мМ Трис-НCl, 150 мМ NaCl, pH 7,5. Концентрацию белка в пробе определяли стандартным образом по методу Брэдфорда.

#### ***Гель-фильтрация***

При проведении гель-фильтрации колонку 10/300 фирмы Amersham Biosciences с носителем Superdex 200 уравновесили буфером 40 мМ Трис-НCl с pH 7,5. Буфер для элюции содержал 150 мМ NaCl. Скорость элюции составляла 0,4 мл/мин. За профилем элюции наблюдали по поглощению в области 280, 420 и 497 нм, используя детектор Varian ProStar 335. Одновременно регистрировали флуоресценцию с использованием детектора Varian ProStar 363. Молекулярные массы исследуемых белковых проб были рассчитаны по калибровочному графику с использованием известных молекулярных масс следующих белков: ферритин (440 кДа), каталаза (232 кДа), альдолаза (158 кДа), БСА (67 кДа), овальбумин (43 кДа), химотрипсиноген А (25 кДа) и рибонуклеаза А (13,7 кДа).

#### ***Проведение тестов для исследуемого биосенсора на его чувствительность к субстрату in vitro***

Аликвоту очищенного белка разбавляли в 1 мл буфера 40 мМ Трис-НCl, 150 мМ NaCl, pH 7,5 в кювете для спектрофотометра до нужной концентрации (чаще всего 250 нМ). С помощью спектрофлуориметра Varian Cary Eclipse регистрировали спектры возбуждения флуоресценции биосенсоров на основе cpYFP с 350 до 510 нм при эмиссии 530 нм.

Для тестирования версий биосенсора NuPer к пробе добавляли H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, начиная с 25 нМ, и регистрировали изменения спектра возбуждения флуоресценции окисленного белка.

Аналогичным образом тестировали чувствительность к субстрату биосенсора RexYFP, созданного для регистрации соотношения НАД<sup>+</sup>/НАДН. Для этого регистрировали спектры возбуждения флуоресценции каждой версии биосенсора при тех же параметрах, что и для НуРег. В кювету вносили избыток НАД<sup>+</sup> (на 250 нМ белка 100 мкМ НАД<sup>+</sup>), после этого в этой же пробе постепенно увеличивали концентрацию НАДН до 25, 50, 100, 250 и 500 нМ. Сравнивали изменения в спектрах различных версий сенсора на появление незначительного количества НАДН в системе на фоне имеющегося избытка НАД<sup>+</sup>. Таким образом, отбирали версии биосенсора наиболее чувствительные к НАДН. Отобранные версии сенсора тестировали с использованием сопряженной системы. Для этого в спектрофотометрическую кювету внесли следующие компоненты реакционной среды: 30 мМ Трис-НСl буфер, 10 мМ глюкозу, 15 мМ MgCl<sub>2</sub>, 2,5 мМ АТФ (AppliChem), 1мМ НАД<sup>+</sup> (Sigma). Количество белка в различных пробах отличалось, поскольку сигнал сенсора не должен зависеть от его концентрации. Далее в систему вносили глюкозо-6-фосфат дегидрогеназу, преинкубировали 3-5 мин, после чего начинали реакцию добавлением гексокиназы. Определяли зависимость сигнала биосенсора от соотношения НАД<sup>+</sup>/НАДН в системе в определенный момент времени (спектры снимали каждые 30 секунд).

### **2.3.3. Культура эукариотических клеток**

В данной работе использовали клетки линий HeLa, HeLa-Kyoto, HEK293.

Клетки культивировали в среде DMEM (ПанЭко) с 10% FBS (РАА Laboratories), 2мМ глутамин (ПанЭко), 1 % антибиотиков пенициллина и стрептомицина (ПанЭко). Клеточные культуры содержали в инкубаторе с температурой 37 °С и 5 % CO<sub>2</sub> в атмосфере.

#### ***Трансфекция клеток***

За сутки до трансфекции клетки рассаживали на 35 мм чашки Петри для микроскопии (Labtech) или  $\mu$ -слайды в их основной среде. Для трансфекции использовали реагент FuGene 6 (Roche) и прилагаемый протокол фирмы производителя. К среде Opti Mem (Invitrogen) добавили FuGene 6, после интенсивного перемешивания инкубировали 5 минут. К раствору образовавшихся липосом добавляли плазмидную ДНК и инкубировали 10-15 мин, использовали соотношение FuGene6:ДНК=3:1. После чего смесь добавляли к клеткам и инкубировали 6 часов при 37 °С, 5 % CO<sub>2</sub>. Затем среду заменяли на свежую и клетки вновь помещали в инкубатор. Микроскопию проводили на следующий день, а в некоторых случаях через день.

За 30 мин до микроскопии основную среду трансфицированных клеток заменяли на среду для микроскопии Live Cell Imaging Solution (Gibco) или раствор Хэнкса без бикарбоната натрия с добавлением 20 мМ Hepes (ПанЭко).

### **2.3.4. Разведение и трансгенез *Danio rerio***

Данная часть работы была проведена в лаборатории профессора Clemens Grabher (Karlsruhe Institute of Technology, Германия), любезно предоставившего все условия для ее выполнения. В работе использовали *Danio rerio* линии АВ (дикий тип). Эмбрионы выращивали при 28 °С в среде E3 (5 mM NaCl, 0.17 mM KCl, 0.33 mM CaCl<sub>2</sub>, 0.33 mM MgSO<sub>4</sub>, and 0.1% метиленовый синий, pH 7,0). Для анестезии использовали трикаин. Для трансгенеза проводили коинъекцию в оплодотворенные ооциты кодирующего биосенсор вектора pDestTol2CG2 и мРНК Tol2 транспозазы.

### **2.3.5. Микроскопия**

#### ***Флуоресцентная микроскопия***

Для визуализации флуоресценции трансфицированных клеток на следующий день после трансфекции использовали флуоресцентный микроскоп Leica DMI 6000 B, оборудованного ртутной лампой 120W HXP (Osram) в качестве источника света и CCD-камерой Photometrics CoolSNAP HQ. Микроскопию клеток проводили при температуре 37 °С, детекцию флуоресценции проводили в двух каналах, соответствующих двум пикам возбуждения хромофора cpYFP (420 нм и 500 нм) и пику эмиссии 510 нм. Для канала, соответствующего возбуждению 420 нм хромофора cpYFP, использовали фильтры EFW Excitation: 427/10 (CFP); Emission: BP 542/27 (YFP). Для возбуждения на 500 нм использовали фильтры Excitation: BP 504/12 (YFP); Emission: BP 542/27 (YFP). Для детекции флуоресценции в красной области спектра для работы с биосенсором Peredox использовали набор фильтров TX2 (Excitation: BP560/40, Emission: BP645/75).

Использовали иммерсионный масляный объектив HCX P2 ApoLambda blue 63\*1,4 Oil.

Интервалы съемки составляли раз в 5-30 секунд для экспериментов с биосенсором NuPer, и раз в 1-5 минут для работы с биосенсорами RexYFP и Peredox. При работе с  $\mu$ -слайдами использовали функцию MultiPosition, позволяющую вести съемку одновременно по нескольким позициям слайда. Во всех экспериментах требуемые вещества добавляли к клеткам непосредственно во время съемки. Полученные серии изображений анализировали с помощью программы Leica

Application Suite Advanced Fluorescence (LAS AF). Конечную обработку результатов проводили с помощью программ ImageJ (EMBL) и OriginPro 8.5 (OriginLab).

### ***Конфокальная микроскопия***

В работе использовали конфокальные сканирующие флуоресцентные микроскопы Zeiss LSM 710 и Perkin Elmer UltraView Vox Spinning Disk. Эксперименты проводили в герметичной камере при 37 °C с использованием иммерсионных масляных объективов или неиммерсионных объективов класса PL APO и аналогичных им. В работе использовали лазеры 405 нм (для возбуждения HyPer и Peredox), 488 нм (для возбуждения HyPer и RexYFP), 561 нм (для возбуждения mCherry в составе Peredox).

Интервалы съемки составляли раз в 5-30 секунд для экспериментов с биосенсором HyPer, и раз в 1-5 минут для работы с биосенсорами RexYFP и Peredox. В момент съемки к клеткам добавляли необходимые для эксперимента вещества. При работе с  $\mu$ -слайдами вели съемку по нескольким позициям. Полученные данные обрабатывали с помощью программ ImageJ (EMBL) и OriginPro 8.5 (OriginLab).

### ***Микроскопия FLIM***

Данная часть работы была проведена в лаборатории профессора Theodorus Gadella (University of Amsterdam, Нидерланды) и Advanced Light Microscopy Facility, EMBL, Германия.

Для клеточной микроскопии культуру клеток трансфецировали исследуемым биосенсором по стандартному протоколу. Для последующей FLIM микроскопии использовали оборудование, описанное в работе T.W. Gadella [287]. Клетки возбуждали лазером 488 нм, модулируемым с частотой 71,5 МГц, эмиссию флуоресценции регистрировали с помощью фильтра BP 515/30 nm (Chroma). Микроскопию проводили с использованием объектива Zeiss Plan Apochromat 63 $\times$ /1.4 oil-immersion.

Для FLIM микроскопии объекта *Danio rerio* использовали оборудование LIFA FLIM setup (Lambert instruments) на инвертированном микроскопе Olympus 71 с объективом Olympus 30 $\times$  NA 1.05. Образец возбуждали лазером 488 нм, эмиссию флуоресценции регистрировали в канале GFP. Для калибровки системы использовали флуоресцентный краситель Atto488.

### ***Обработка полученных данных***

Все серии полученных изображений в результате микроскопии обрабатывали в программе ImageJ (EMBL). Из каждого кадра отдельной серии вычитали значение фона. Затем данные переводили в формат 32 бит и устанавливали порог минимального значения. При анализе сигнала RexYFP выделяли интересующую область изображения (например, отдельная клетка) и получали числовые данные об изменении

интенсивности флуоресценции в выделенной области. Проводили анализ параллельных экспериментов с биосенсором HyPerC199S в роли рН контроля. Истинный сигнал RexYFP рассчитывали, как отношение сигналов HyPerC199S/RexYFP, учитывая, таким образом, влияние рН. Для HyPer и Perox, съемка которых велась в двух каналах, покадрово делили изображения каналов: F488/F405 для HyPer и F405/F561 для Perox. По полученным результатам строили кривые, отражающие динамику изменения сигналов биосенсоров, в программе OriginPro 8.5 (OriginLab).

## ГЛАВА 3

### РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

#### 3.1. УСОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ ГЕНЕТИЧЕСКИ КОДИРУЕМОГО БИОСЕНСОРА *HyPer*, СОЗДАННОГО ДЛЯ РЕГИСТРАЦИИ ПЕРОКСИДА ВОДОРОДА

В 2006 году в ИБХ РАН Белоусовым В. В. впервые был создан генетически кодируемый флуоресцентный сенсор *HyPer* для регистрации  $H_2O_2$  [278], что послужило мощным стимулом для изучения роли этой молекулы в живой материи, а также созданию других инструментов, основанных на принципе работы *HyPer*.

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

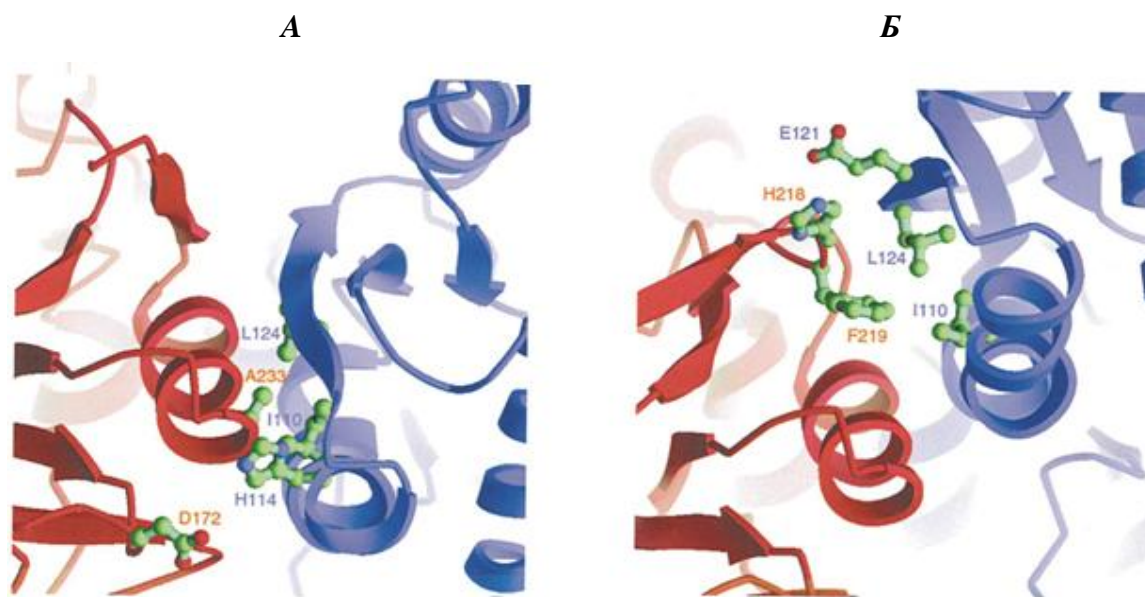
Конструкция *HyPer* основана на чувствительном к  $H_2O_2$  домене бактериального белка *E. coli* *OxyR* и связанного с ним пермутированного желтого флуоресцентного белка *cpYFP*. *OxyR* специфично окисляется  $H_2O_2$  и претерпевает конформационные изменения, передающиеся на *cpYFP*. В результате этих внутримолекулярных перестроек происходит изменение спектра возбуждения флуоресценции белка. Изменяется соотношение интенсивностей флуоресценции (F500/F420), возбуждаемой отдельно длинами волн 420 нм и 500 нм [278]. Позже, используя принцип работы *HyPer*, стали появляться работы по созданию других биосенсоров, также основанных на взаимодействиях между сенсорной и белковой частями в составе общей химерной конструкции сенсора.

На протяжении последнего времени предпринимались попытки улучшения *HyPer*. Не так давно с помощью метода случайного мутагенеза была создана первая улучшенная версия биосенсора, названная *HyPer-2* [288]. Эта версия продемонстрировала больший динамический диапазон ответа на  $H_2O_2$  (максимальное изменение соотношения пиков F500/F420 в ответ на окисление), по сравнению с исходным вариантом приблизительно в 2 раза. Как оказалось, ключевую роль в улучшении динамического диапазона *HyPer-2* сыграла единственная замена Ala в положении 406 на Val [288]. Замена в *HyPer-2* соответствует известной по литературным данным

мутации A233V в OxyR дикого типа в области, ответственной за димеризацию молекулы [61]. Однако при улучшенном динамическом диапазоне HyPer-2 все же потерял некоторые из своих положительных свойств. HyPer-2 формирует прочные димеры, что было показано с помощью метода гель-фильтрации, в отличие от мономерного HyPer. Кроме того, HyPer-2 демонстрирует сравнительно медленную, по сравнению с HyPer, кинетику реакций окисления и восстановления, что может сказываться на временном разрешении детектирования H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

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

Мы попытались создать версию HyPer с улучшенным динамическим диапазоном, не изменяя при этом других полезных свойств биосенсора. Поскольку единственная мутация A233V в области, ответственной за формирование димера OxyR, привела к значительному расширению динамического диапазона HyPer-2 по сравнению с HyPer, мы решили более подробно изучить взаимодействия аминокислотных остатков в этой области. На рисунке 27 изображена область молекулы OxyR, участвующая в димеризации белка.



**Рисунок 27. Интерфейс OxyR, ответственный за формирование димера**

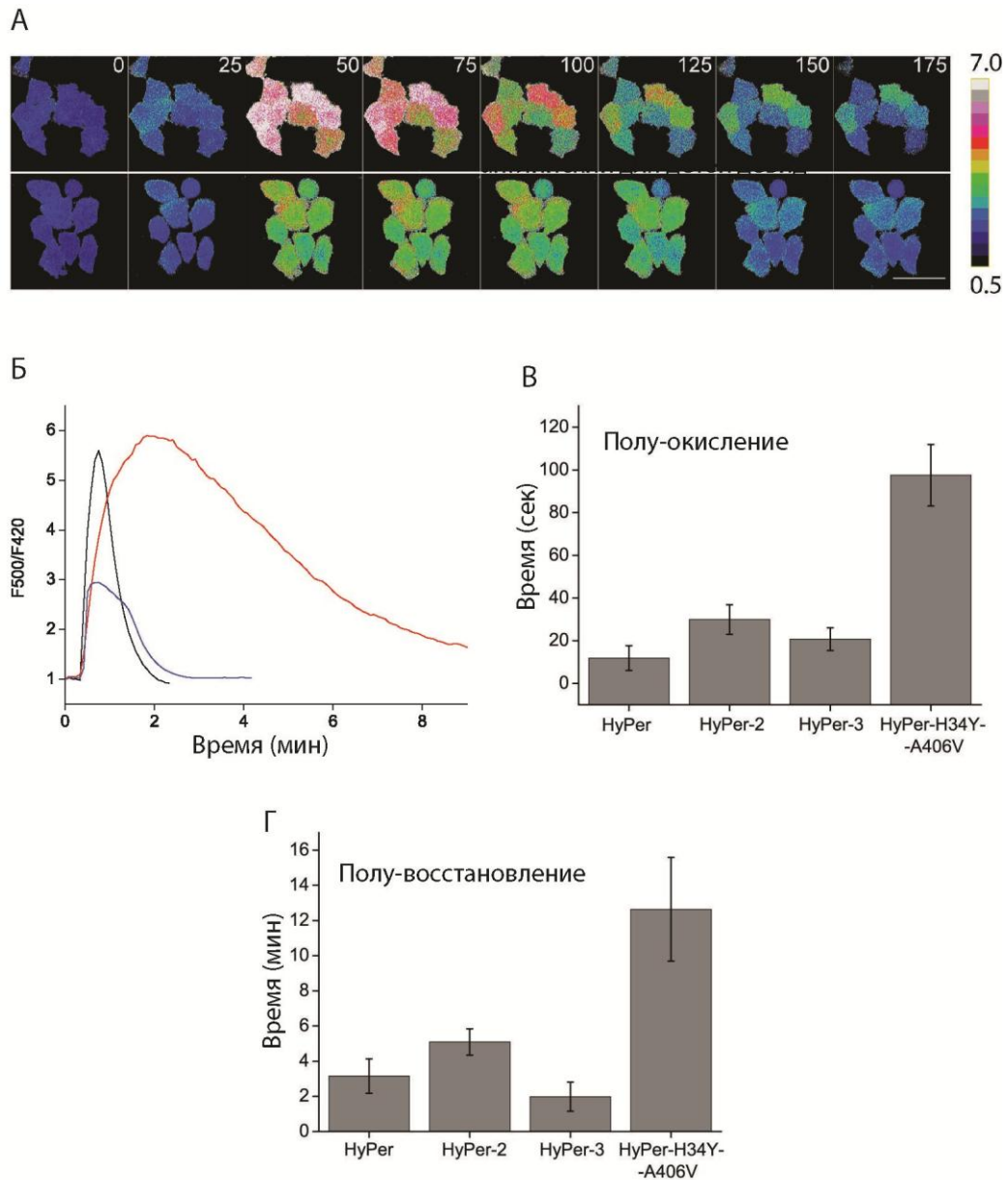
*А) восстановленная форма Б) окисленная форма; разные мономеры белка обозначены красным и синим цветами, соответственно [61].*

Белок OxyR функционирует в виде димера, формированию которого способствуют гидрофобные взаимодействия и водородные связи аминокислотных остатков в составе  $\alpha$ D спирали одного мономера и  $\alpha$ A спирали, а также  $\beta$ 2 тяжа другого. В восстановленном состоянии Ala233 входит в состав  $\alpha$ D спирали и находится в гидрофобном окружении, взаимодействуя с Leu124 ( $\beta$ 2 тяж) и Ile110 ( $\alpha$ A спираль). Дополнительно в стабилизации участвуют взаимодействия между Asp172 и His114, принадлежащих разным мономерам. При окислении белка и переходе его в окисленную форму эти взаимодействия разрушаются, но формируются новые. В окисленной форме OxyR образуется новая петля (соответствует 218-222 аминокислотным остаткам). Phe219 в составе этой петли взаимодействует с Leu124 и Ile110 соседнего мономера. His218 участвует в стабилизации димера, взаимодействуя с Glu121. Перестройка в данной области OxyR возможна только благодаря конформационным изменениям, которые вызваны образованием дисульфидной связи между остатками Cys199 и Cys208 при специфичном окислении пероксидом водорода [61].

Точечная мутация A233V в структуре OxyR каким-то образом привела к изменению динамического диапазона НуPer. Не исключено, что интерфейс, ответственный за формирования димера, может отличаться для OxyR дикого типа и в составе химерной конструкции НуPer.

Мы протестировали несколько вариантов НуPer с точечными мутациями в той же области, что и A233V для НуPer-2. Опираясь на результат НуPer-2, мы не могли предположить, как именно и какие мутации изменяют свойства биосенсора. В OxyR дикого типа замена A233V оказывает дестабилизирующее влияние на димер [61], но в случае НуPer-2 аналогичная мутация наоборот усиливает димеризацию биосенсора. Мы использовали мутации I110D, L124D, H114Y и F219A белка OxyR, которые ранее были охарактеризованы для белка дикого типа как фенотипические, то есть влияющие на активность wtOxyR. Все эти мутации в большей или меньшей степени влияют на димерное состояние OxyR [61, 289, 290].

Проекспрессируя полученные версии НуPer с мутациями I110D, L124D, H114Y и F219A в эукариотических клетках HeLa Kyoto, мы протестировали их сигнал (F500/F420) в ответ на добавление в среду 150 мкМ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Мутации I110D, L124D и F219A привели к сильному уменьшению динамического диапазона биосенсора по сравнению с изначальным вариантом. Более успешной оказалась введенная мутация H114Y, с которой сигнал НуPer стал сравним с сигналом НуPer-2 по динамическому диапазону (рисунок 28).



**Рисунок 28. Сравнение свойств биосенсора HyPer-3 с HyPer и HyPer-2**

**А)** Изменение соотношения  $F500/F420$  в клетках HeLa Kyoto, экспрессирующих HyPer-3 (верхний ряд) и HyPer (нижний ряд) при добавлении 150  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$ . Числа обозначают время в секундах. Шкала 40  $\mu\text{m}$ . Клетки окрашены в псевдоцвета, соответствующие значениям соотношения  $F500/F420$  (черный цвет соответствует минимальному значению, белый – максимальному). **Б)** Динамика изменения соотношения  $F500/F420$  в клетках HeLa Kyoto, экспрессирующих HyPer (синяя линия), HyPer-2 (красная линия) и HyPer-3 (черная линия) при добавлении 150  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$ . **В)** Полупериод окисления HyPer, HyPer-2, HyPer-3 и HyPer-H34Y-A406V. Точка времени 0 секунд соответствует моменту добавления  $\text{H}_2\text{O}_2$ . **Г)** Полупериод восстановления HyPer, HyPer-2, HyPer-3 и HyPer-H34Y-A406V. Точка времени 0 минут соответствует максимальному значению соотношения  $F500/F420$ , достигнутому после добавления  $\text{H}_2\text{O}_2$ . На диаграммах **В** и **Г** показаны средние значения (построены по результатам 7 независимых экспериментов для HyPer, 10 для HyPer-2, 10 для HyPer-3, 4 для HyPer-H34Y-A406V) и стандартное отклонение.

Более того, для *NuPer-N114Y* характерны более высокие скорости окисления и восстановления по сравнению с *NuPer-2*. Мы измерили полупериоды окисления и восстановления для *NuPer*, *NuPer-2* и *NuPer-N114Y*. Полупериод окисления *NuPer-N114Y* приблизительно в 1,4 раза меньше, чем для *NuPer-2*. Полупериод восстановления *NuPer-N114Y* сопоставим с восстановлением *NuPer* и значительно ниже по сравнению с *NuPer-2*. На рисунке 28 В,Г эта разница хорошо видна. Новый полученный вариант биосенсора с мутацией N114Y, отличающийся высоким динамическим диапазоном и быстрым ответом, мы назвали *NuPer-3*. Мутация N114Y в *OxyR* дикого типа соответствует позиции N34Y в *NuPer*.

### 3.1.2. Сравнение аффинности и скорости реакции полученного *NuPer-3* с *NuPer* и *NuPer-2*

Разница полупериодов окисления *NuPer*, *NuPer-2* и *NuPer-3* может быть связана с разной аффинностью этих биосенсоров к своему субстрату, что может быть вызвано мутациями. С другой стороны, это может быть связано с тем, что скорость реакции исследуемых биосенсоров с  $H_2O_2$  отличается.

Поскольку нам не удалось выделить белковый препарат *NuPer* в полностью восстановленном состоянии, измерение кинетики реакции мы провели в эукариотических клетках для каждого вида сенсора. Для этой цели мы использовали м-слайды [288], в которых мы культивировали клетки и проводили флуоресцентную микроскопию. Преимуществом этих слайдов является небольшой рабочий объем (100 мкл), это позволяет очень быстро заменять клеточную среду при частом режиме съемки микроскопа и измерять скорость реакции псевдопервого порядка. Ранее для *NuPer* было определено, что выделенный белок реагирует на добавление  $H_2O_2$  от 25 нМ, в клетках *E. coli* и цитоплазме эукариот сигнал сенсора детектируем от 5 мкМ эндогенного  $H_2O_2$  [278]. Эти данные согласуются с данными, полученные для *OxyR* дикого типа [291]. Это позволило нам определить наличие приблизительно 200-500-кратного градиента  $H_2O_2$  через цитоплазматическую мембрану. С учетом этого мы установили, что концентрации  $H_2O_2$ , при которых скорость реакции между сенсором и  $H_2O_2$  равна половине максимальной, составляют 160 нМ для *NuPer*, 290 нМ для *NuPer-2*, 260 нМ для *NuPer-3*. Константы скорости реакции псевдопервого порядка ( $K_s$ ) равны  $5 \cdot 10^5 M^{-1} \text{сек}^{-1}$  для *NuPer*,  $1,2 \cdot 10^5 M^{-1} \text{сек}^{-1}$  для *NuPer-2* и  $2,5 \cdot 10^5 M^{-1} \text{сек}^{-1}$  для *NuPer-3*. Среди всех *NuPer* именно для *NuPer-2* характерна самая низкая скорость реакции, что объясняет его более медленный ответ на  $H_2O_2$ . В то время как *NuPer-3* занимает промежуточное положение между *NuPer* и *NuPer-2* по скорости реакции с  $H_2O_2$  и полупериоду

окисления. Вероятнее всего, что разные полупериоды восстановления биосенсоров также связаны с отличиями в скоростях реакций окисленных HyPer, HyPer-2 и HyPer-3 с клеточными тиол-восстанавливающими компонентами клетки, как тиоредокси или глутаредоксин.

### 3.1.3. Сравнение спектральных характеристик HyPer-3 с HyPer и HyPer-2

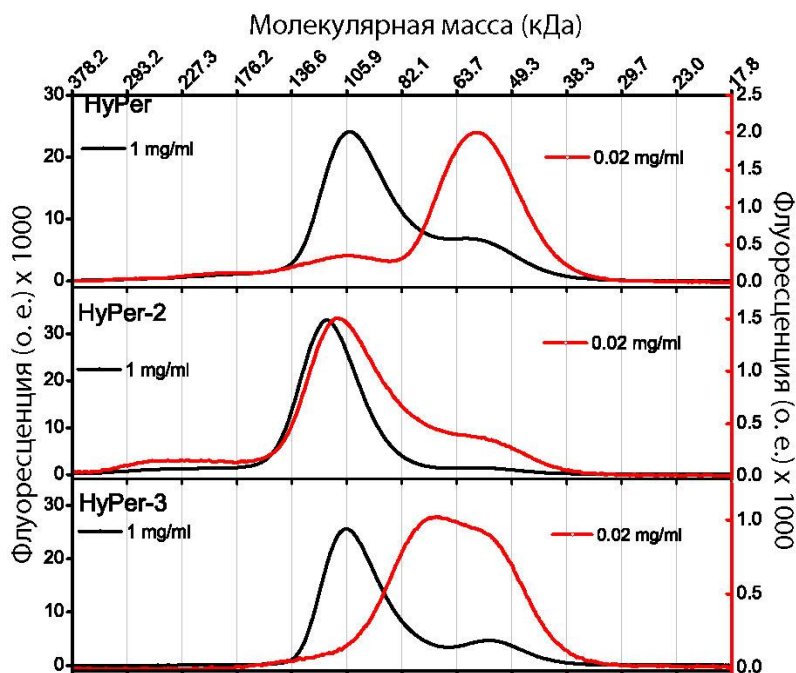
На следующем этапе мы сравнили яркость всех имеющихся вариантов HyPer. Для этого мы выделили белки. Поскольку нам не удалось их выделить полностью восстановленными, все измерения мы проводили с окисленной формой белков, чего легко добиться путем добавления  $\text{H}_2\text{O}_2$  к пробе. Квантовый выход для HyPer, HyPer-2 и HyPer-3 имеет одинаковое значение и составляет 0,1. При этом значения коэффициентов экстинкции отличаются. Коэффициенты экстинкции при 490 нм составляют  $17000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  для HyPer,  $25000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  для HyPer-2 и  $17000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  для HyPer-3. Учитывая значение квантового выхода, яркость для HyPer равна  $1700 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ , для HyPer-2 –  $2500 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ , для HyPer-3 –  $1700 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ , что составляет 5-7 % от яркости EGFP.

### 3.1.4. Сравнение олигомерного состояния HyPer-3 с HyPer и HyPer-2

Мутация Н34У в составе HyPer-3 находится в той же области белка ОхуR, что и мутация А406V в HyPer-2. Эта область отвечает за димеризацию белка ОхуR дикого типа [61]. В то время как HyPer преимущественно находится в мономерном состоянии, мутация А406V в ОхуR-части HyPer-2 сделала биосенсор строгим димером. Мы решили определить какой эффект вызвала мутация Н34У, находящаяся в том же интерфейсе. Для этого провели гель-фильтрационную хроматографию, результаты представлены на рисунке 29.

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

самым быстрым – мономерный HyPer. Что же касается HyPer-3, то он как раз занимает среднюю позицию между HyPer и HyPer-2 по всем перечисленным параметрам.



**Рисунок 29. Результаты гель-фильтрационной хроматографии для HyPer, HyPer-2 и HyPer-3**

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

### 3.1.5. HyPer с объединенными мутациями A406V и H34Y

Мы предположили, что объединение двух мутаций A406V и H34Y в одной конструкции HyPer приведет к появлению варианта с еще более лучшими показателями. Однако созданный HyPer-A406V-H34Y отличался по своим свойствам от всех существующих. Динамический диапазон HyPer с двумя мутациями сравним с HyPer-2 и HyPer-3. Но для HyPer-A406V-H34Y оказались характерными очень длинные полупериоды окисления и восстановления (рисунок 28). Этот вариант HyPer в гораздо меньшей степени пригоден для его использования в регистрации  $H_2O_2$  в режиме реального времени, чем HyPer, HyPer-3 и даже HyPer-2, но может быть рассмотрен в качестве долговременного индикатора, благодаря тому, что длительное время пребывает в окисленном состоянии после стимуляции.

### 3.1.6. Тестирование HyPer-3 *in vivo*

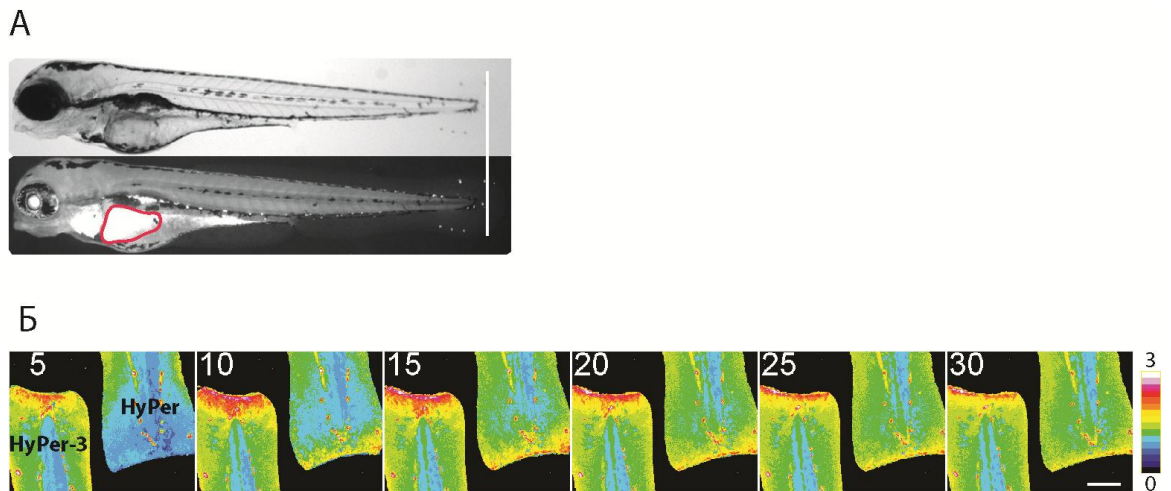
Ранее HyPer был успешно применен для визуализации градиента  $H_2O_2$  в тканях zebrafish *Danio rerio* на модели раны хвостового плавника [292, 293]. Градиент концентрации  $H_2O_2$  начинал формироваться через 3 минуты после нанесения раны и достигал своего максимального значения примерно через 20 минут, распространяясь на 100-200 мкм вглубь эпителия хвостового плавника. Градиент  $H_2O_2$  служит для привлечения нейтрофилов в область воспаления. На этой модели мы протестировали HyPer-3. Для этого в эмбрионы *Danio rerio* на стадии одной клетки мы инъецировали мРНК, кодирующую HyPer-3, после чего наблюдали за флуоресценцией образца в течение последующих трех дней. Эту же самую процедуру мы проделали с HyPer. Несмотря на то, что по яркости выделенные белки HyPer и HyPer-3 не отличались, по какой-то причине в используемой модели *in vivo* флуоресцентный сигнал HyPer-3 оказался очень слабым.

Для получения оптимального уровня экспрессии и, следовательно, стабильного флуоресцентного сигнала мы, в сотрудничестве с группой Clemens Grabher (Технологический институт Карлсруэ, Германия) создали трансгенную линию zebrafish *Danio rerio*, которая экспрессирует HyPer-3 под контролем промотора  $\beta$ -актина. Таким образом, все клетки трансгенного животного экспрессируют HyPer-3 (рисунок 30А). Для экспериментов отбирали трансгенных особей со средним уровнем экспрессии.

Путем ампутации кончика хвостового плавника 3,5-дневных особей мы воспроизводили модель раны, нанесение которой приводило к возникновению градиента концентрации  $H_2O_2$  в хвостовой области. На рисунке 30Б этот градиент хорошо заметен с помощью HyPer и HyPer-3.

Благодаря увеличенному динамическому диапазону HyPer-3 соотношение F500/F420 этого биосенсора изменяется сильнее, чем для HyPer в этой же модели (рисунок 30Б). Максимальное изменение соотношения F500/F420 составляло  $1,72 \pm 0,18$  для HyPer и  $2,53 \pm 0,39$  для HyPer-3 (полученные данные усреднены по 10 измерениям для HyPer и 7 измерениям для HyPer-3 в трех независимых экспериментах; приведены средние значения и стандартное отклонение).

Таким образом, HyPer-3 представляет собой еще более лучший индикатор для регистрации  $H_2O_2$  в системе *in vivo*, чем HyPer. В предыдущих экспериментах было показано, что изменение сигнала HyPer в описанной модели раны является рН-независимым [292].



**Рисунок 30. Сравнение ответов HyPer-3 и HyPer на  $H_2O_2$  в модели раны для zebrafish *Danio rerio***

А) Фотографии трансгенной рыбы *Danio rerio*, экспрессирующей HyPer-3 под контролем промотора  $\beta$ -актина, на стадии развития 3,5 дней в проходящем свете (верхний снимок) и в режиме регистрации флуоресценции (нижний снимок). Вертикальная белая линия отмечает область нанесения раны. Область сердца, обведенная красной линией, с высокой интенсивностью флуоресценции содержит маркер трансгенеза *stlc2:egfp*. Б) Сравнение изменений соотношения F500/F420 в области хвостового плавника *Danio rerio* при нанесении раны отдельно для HyPer-3 (слева) и HyPer (справа). Цветовая гамма соответствует значениям соотношения F500/F420 от нулевого (черный) до максимального (белый). Цифрами отмечено время в минутах от момента нанесения раны. Шкала 100 мкм.

### 3.1.7. Использование HyPer-3 и HyPer в FLIM микроскопии

Микроскопия с измерением времени жизни флуоресценции FLIM (fluorescence lifetime imaging microscopy) часто применяется для мониторинга биологических процессов с помощью методов основанных на взаимодействиях FRET [294, 295]. При изменении эффективности FRET изменяется и время жизни донорного флуорофора, что позволяет осуществлять количественную оценку относительной доли молекул в разных FRET состояниях. При использовании FLIM гораздо меньше помех, связанных с светорассеянием или фотообесцвечиванием, сигнал не зависит от уровня экспрессии и ему можно дать количественную оценку. Метод FLIM ранее не использовался для сенсоров с одним флуорофором, поскольку считалось, что в отсутствие флуорофора-акцептора (т.е. вне FRET-пары) время жизни флуоресценции сенсора не меняется сколь-нибудь значительно. Известны лишь данные, что время жизни флуоресценции некоторых GFP-подобных белков зависит от изменения величины pH [296].

Мы проверили, изменяется ли время жизни флуоресценции HyPer-3 и HyPer при их взаимодействии с  $H_2O_2$ . Мы провели FLIM клеток HeLa, экспрессирующих HyPer-3 и HyPer, до и после добавления 100 мкМ  $H_2O_2$ . Интенсивность флуоресценции,

возбуждаемой при 488 нм, увеличилась для обеих проб после добавления  $\text{H}_2\text{O}_2$ , при этом время жизни флуоресценции биосенсоров уменьшилось. Результаты FLIM для HyPer-3 представлены на рисунке 31А.

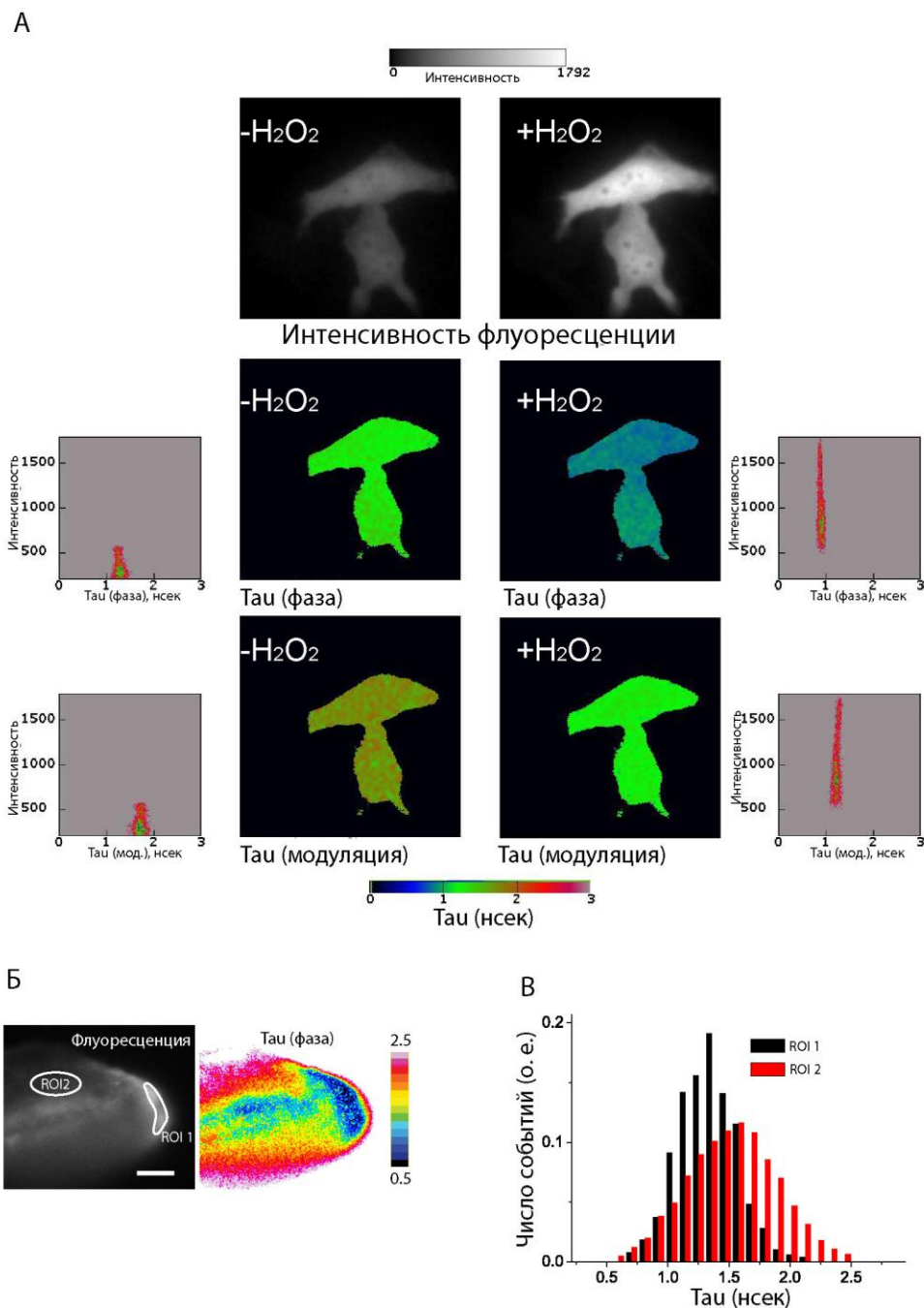
Для HyPer измеренные по фазе и модуляции времена жизни флуоресценции составили  $1,27 \pm 0,04$  нс и  $1,73 \pm 0,02$  нс, соответственно (усредненные значения по 20 клеткам в 3 независимых экспериментах). Разница между фазой и модуляцией времени жизни флуоресценции свидетельствует о мультиэкспоненциальном затухании возбужденного состояния. После добавления  $\text{H}_2\text{O}_2$  к этим же клеткам измеренные по фазе и модуляции времена жизни флуоресценции для HyPer изменились и составили  $1,02 \pm 0,06$  нс и  $1,44 \pm 0,13$  нс, соответственно.

В случае HyPer-3 измеренные по фазе и модуляции времена жизни составили  $1,29 \pm 0,04$  нс и  $1,77 \pm 0,05$  нс, соответственно. При окислении времена жизни флуоресценции этой молекулы тоже падают до значений  $0,92 \pm 0,01$  нс (по фазе) и  $1,12 \pm 0,02$  нс (по модуляции) (усредненные значения по 11 клеткам в 3 независимых экспериментах) (рисунок 31А). Примечательно, что при окислении молекул HyPer возрастала яркость, но при этом понижалось время жизни флуоресценции. Поскольку величина квантового выхода пропорциональна времени жизни флуоресценции при окислении HyPer-3 происходит падение величины квантового выхода на 25 – 30 %. И в то же время окисление вызывает увеличение интенсивности флуоресценции примерно в 5 раз, что объясняется увеличением коэффициента экстинкции.

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

Далее мы проверили возможность использования FLIM HyPer-3 *in vivo* на уже используемой нами модели раны в zebrafish *Danio rerio*. Используя описанный выше протокол, мы провели FLIM в области раны (рисунок 31Б, В). Оказалось, что и с помощью FLIM можно регистрировать градиент  $\text{H}_2\text{O}_2$ , распространяющийся от раны вглубь эпителия хвостового плавника zebrafish, поскольку время жизни флуоресценции окисленного и восстановленного HyPer-3 отличается.

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



**Рисунок 31. Регистрация времени жизни флуоресценции HyPer-3**

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

### 3.2. СОЗДАНИЕ ГЕНЕТИЧЕСКИ КОДИРУЕМОГО ФЛУОРЕСЦЕНТНОГО БИОСЕНСОРА ДЛЯ РЕГИСТРАЦИИ СООТНОШЕНИЯ НАД<sup>+</sup>/НАДН

До недавнего времени методов, позволяющих регистрировать динамику изменения соотношения НАД<sup>+</sup>/НАДН в живых системах, не существовало. С помощью УФ и двух-фотонной микроскопии можно было детектировать лишь флуоресцирующий НАДН [297-300], но более важным клеточным показателем является именно соотношение окисленной и восстановленной форм данного кофактора. От клеточного соотношения НАД<sup>+</sup>/НАДН зависит протекание многих важнейших биохимических реакций, а сам параметр отражает общее окислительно-восстановительное состояние клетки. Однако недостаток методов долгое время затруднял исследование этого важного клеточного показателя в живых системах.

Мы разработали метод, который позволяет регистрировать в режиме реального времени динамику изменения соотношения НАД<sup>+</sup>/НАДН в живых системах на уровне не только единичных клеток, но и на уровне отдельных внутриклеточных компартментов. Созданный биосенсор для регистрации соотношения НАД<sup>+</sup>/НАДН, который мы назвали впоследствии RexYFP, основан на бактериальном белке T-Rex (из *Thermus aquaticus*) [219] и пермутированного желтого флуоресцентного белка cpYFP.

#### 3.2.1. Конструкция и спектральные характеристики RexYFP

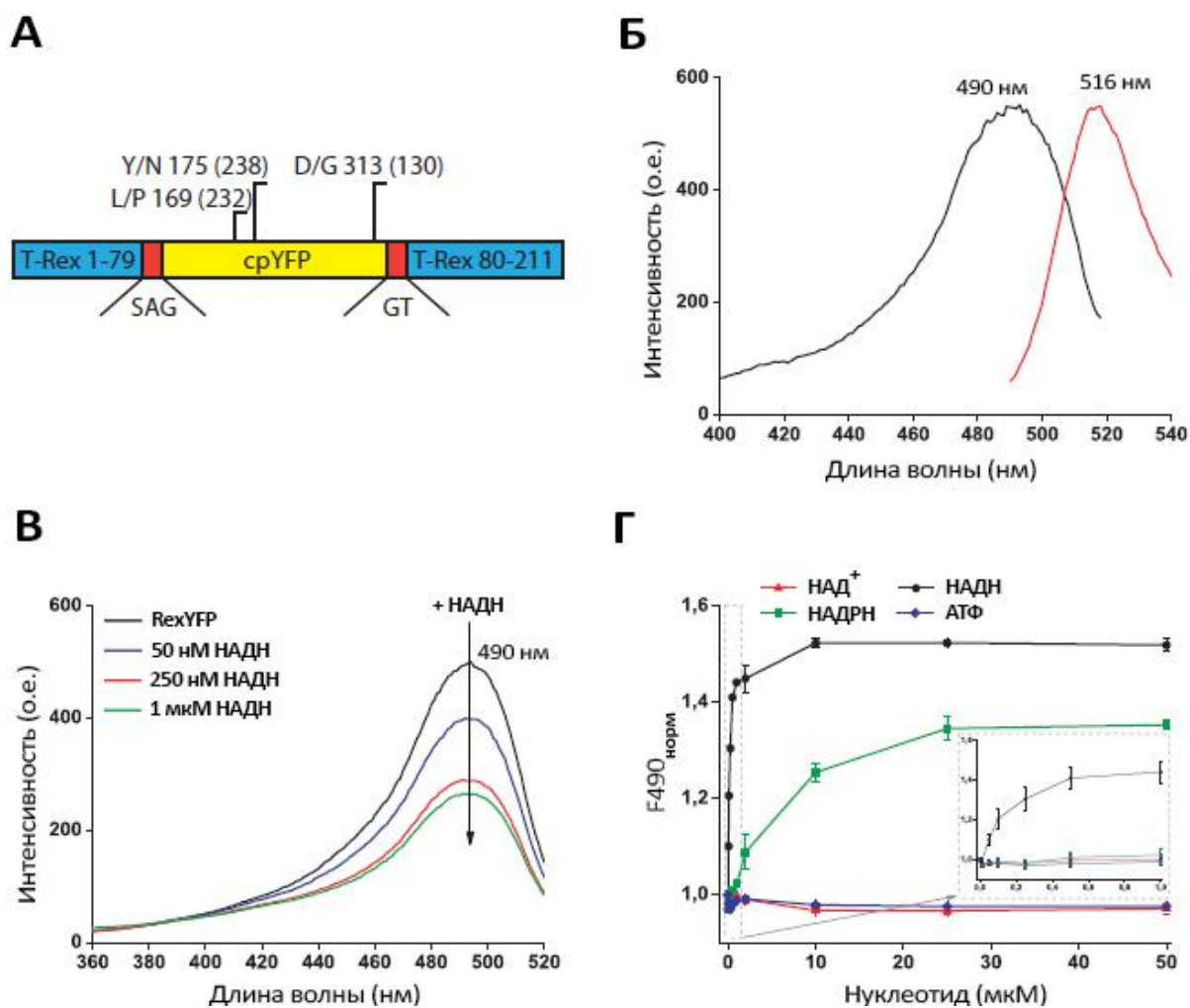
В качестве основы разрабатываемого нами биосенсора для регистрации динамики изменения соотношения НАД<sup>+</sup>/НАДН мы выбрали белок T-Rex из *Thermus aquaticus*, который в этих бактериях выступает в качестве природного сенсора для данного параметра. В клетках для белка T-Rex характерны два конформационных состояния, взаимные переходы которых зависят от показателя соотношения НАД<sup>+</sup>/НАДН. В аэробных условиях белок находится в НАД<sup>+</sup>-связывающем состоянии, при этом он образует прочный комплекс с определенными последовательностями ДНК, выступая в качестве репрессора некоторых бактериальных генов. Но если по каким-то причинам показатель соотношения НАД<sup>+</sup>/НАДН снижается в клетке, T-Rex сразу связывает НАДН, поскольку именно к восстановленной форме кофактора этот белок имеет наибольшее сродство. При этом структура T-Rex претерпевает конформационные изменения и переходит в более компактную, которая уже не связывает ДНК [219, 220].

Для создания биосенсора на основе T-Rex мы решили попробовать визуализировать реакцию бактериального белка на изменение соотношения НАД<sup>+</sup>/НАДН. Для этого мы выбрали несколько позиций в структуре T-Rex и на уровне

гена вставили последовательность *cpYFP*, создав, таким образом, несколько вариантов химерной конструкции T-Rex-*cpYFP*. На первом этапе создания биосенсора было необходимо отобрать такую конструкцию химерного белка, в которой конформационные изменения T-Rex передавались бы и на флуоресцентный белок, вызывая при этом изменения в его спектре. Важно, чтобы в химерном белке T-Rex по-прежнему обладал способностью к регистрации соотношения  $\text{НАД}^+/\text{НАДН}$ , а *cpYFP* не утрачивал флуоресцентных свойств. Всего было проанализировано 11 вариантов T-Rex-*cpYFP*, отличающихся положением *cpYFP* в структуре T-Rex (*cpYFP* был интегрирован в структуру T-Rex по позициям между аминокислотными остатками: 78-79, 79-80, 99-100, 100-101, 116-117, 117-118, 126-127, 130-131, 133-134, 135-136, 140-141). Во всех позициях *cpYFP* был интегрирован в структуру T-Rex через короткие пептидные линкеры SAG и GT, ранее пермутант *cpYFP* с подобными линкерами уже был использован для создания биосенсора NuPer.

Все версии полученного химерного белка мы проэкспрессировали в клетках *E. coli* штамма XL 1 Blue, чтобы из всех созданных конструкций отобрать флуоресцентные. Оказалось, что в составе большинства версий химерного белка *cpYFP* либо полностью утратил, либо значительно снизил свою способность к флуоресценции. Лишь конструкции, в которых *cpYFP* был интегрирован в структуру T-Rex по позициям 79-80, 99-100 и 116-117, были флуоресцирующими. При этом по интенсивности флуоресценции в большей степени среди всех выделялся химерный белок T-Rex-79-80-*cpYFP*. Его полную генетическую конструкцию мы подвергли случайному мутагенезу в целях улучшения свойств белка. И действительно, из полученной библиотеки нам удалось найти клон, который отличался более быстрым созреванием хромофора и еще большей интенсивностью флуоресценции по сравнению с исходным вариантом. После секвенирования последовательности отобранной конструкции мы установили, что на улучшение характеристик белка повлияли появившиеся мутации L169P, Y175N и D313G, все расположенные в последовательности *cpYFP*. Именно этот химерный белок T-Rex-79-80-*cpYFP*(L169P-Y175N-D313G) позже и стал биосенсором для регистрации соотношения  $\text{НАД}^+/\text{НАДН}$ , который мы будем далее называть RexYFP. На рисунке 32А схематично изображена последовательность RexYFP. Были получены и другие пробные версии биосенсора, но все они в итоге уступили конечному варианту на разных этапах исследования.

Белок RexYFP был выделен. На рисунке 32Б представлен его спектр флуоресценции. Спектр возбуждения флуоресценции представлен одним пиком с максимумом на 490 нм, для спектра эмиссии характерен пик с максимумом интенсивности на 516 нм.



**Рисунок 32. Структура и спектральные характеристики RexYFP**

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

### 3.2.2. Определение чувствительности RexYFP

В одной из работ описано, что при выделении белок T-Rex частично находится в НАДН-связанном состоянии из-за его высокого сродства к восстановленной форме кофактора [218]. Для устранения связанного клеточного НАДН мы перед каждым экспериментом переосаждали белок с помощью сульфата аммония в кислых условиях, после чего вновь растворяли. Качество очистки оценивали по спектрам поглощения пробы, поскольку НАДН поглощает при 340.

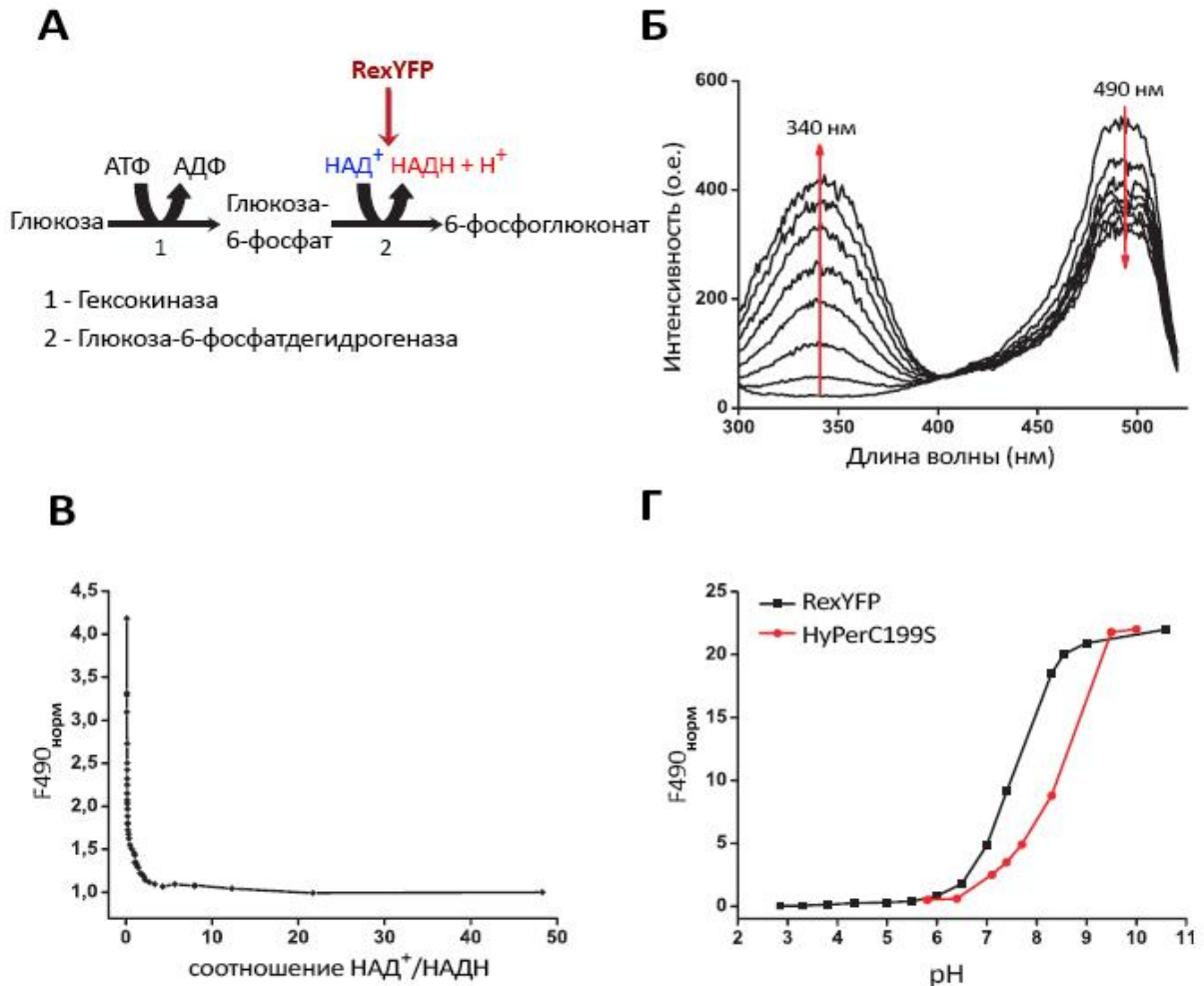
Далее к пробе очищенного белка (250 нМ) добавляли НАДН и регистрировали спектры возбуждения флуоресценции. Даже добавление небольшого количества НАДН к пробе приводило к уменьшению интенсивности пика, на рисунке 32В приведено изменение спектра возбуждения флуоресценции RexYFP в ответ на добавление НАДН. В дальнейшем для простоты понимания мы определяли сигнал биосенсора RexYFP, как обратную величину значения интенсивности флуоресценции, возбуждаемой при 490 нм (1/F490). При таком подходе увеличение концентрации НАДН в системе приводит к увеличению сигнала биосенсора.

Известно, что все нуклеотид связывающие домены белков могут отличаться по своей чувствительности к разным нуклеотидам. Мы проверили сродство RexYFP к основным клеточным нуклеотидам: к НАД<sup>+</sup>, НАДН, НАДФН и АТФ в диапазоне концентраций от 10 нМ до 50 мкМ при концентрации белка в пробе 250 нМ. На рисунке 32Г приведена зависимость сигнала RexYFP от концентрации соответствующего нуклеотида в пробе.

Было показано, что АТФ и НАД<sup>+</sup> не вызывают изменений флуоресценции RexYFP даже при больших концентрациях нуклеотидов. Сигнал изменяется в присутствии НАДН и НАДФН, но значения константы сродства ( $K'$ ) для этих нуклеотидов разные. Для НАДН это значение составляет 180 нМ, а для НАДФН – 6,2 мкМ. При этом следует помнить, что внутриклеточная концентрация НАДФ ниже, чем НАД (в клетках печени крысы примерно в 10 раз), но при нормальных физиологических условиях общий пул НАДФ в клетке более восстановлен, в отличие от пула НАД [159, 177, 234, 235]. Мы не исключаем вероятности того, что при некоторых условиях НАДФН все же может повлиять на сигнал RexYFP.

В природе белок T-Rex может связывать НАДН и НАД<sup>+</sup>, но с разным сродством [219]. При нормальных физиологических условиях в цитоплазме клеток млекопитающих соотношение между свободными НАД<sup>+</sup> и НАДН может варьировать от 1 до 700 [153, 159, 160]. Это означает, что окисленная форма кофактора всегда присутствует в клетке в большей концентрации, чем восстановленная. Для того чтобы

проверить как будет изменяться сигнал биосенсора при увеличении НАДН в пробе на фоне уже имеющегося избытка  $\text{НАД}^+$ , мы использовали сопряженную ферментативную систему. На рисунке 33А представлена ее схема. В системе участвует гексокиназа, которая катализирует реакцию превращения глюкозы в глюкозо-6-фосфат. Во второй реакции сопряженной системы дегидрогеназа превращает глюкозо-6-фосфат в 6-фосфоглюконат и переносит восстановительные эквиваленты на  $\text{НАД}^+$  [301]. Таким образом, при функционировании данной системы происходит постепенное увеличение концентрации НАДН в пробе до тех пор, пока не расходуется  $\text{НАД}^+$ .



**Рисунок 33. Зависимость сигнала RexYFP от соотношения  $\text{НАД}^+/\text{НАДН}$  и величины pH**

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

В состав реакционной смеси входили глюкоза, Mg-АТФ, НАД<sup>+</sup>, гдьюкозо-6-фосфатдегидрогеназа и RexYFP. Реакцию начинали добавлением гексокиназы. Образование НАДН в системе приводит увеличению поглощения пробы при 340 нм с одновременным падением интенсивности пика возбуждения флуоресценции на 490 нм биосенсора RexYFP. На рисунке 33Б представлено изменение со временем спектра возбуждения флуоресценции реакционной смеси. Подобрав предварительно оптимальную скорость реакции, в каждой временной точке мы рассчитали значение соотношения НАД<sup>+</sup>/НАДН в пробе. На рисунке 33В изображена итоговая кривая зависимости сигнала RexYFP от значений соотношения НАД<sup>+</sup>/НАДН. Данный эксперимент продемонстрировал, что RexYFP способен детектировать небольшие количества НАДН даже на фоне избытка других нуклеотидов, в частности НАД<sup>+</sup> и АТФ. В каждой серии эксперимента мы использовали разные концентрации биосенсора (100, 250, 750 нМ), сохраняя при этом все остальные параметры, и убедились, что сигнал RexYFP не зависит от его концентрации в пробе.

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

### **3.2.3. Подбор рН-контроля при работе с биосенсором RexYFP в живых системах**

Как и другие биосенсоры, созданные на основе *srYFP*, сигнал RexYFP обладает рН-зависимостью. При работе с биосенсором в клетках эукариот мы убедились, что многие физиологические процессы, связанные с изменением соотношения НАД<sup>+</sup>/НАДН, связаны также и с рН-колебаниями. Закисление среды приводит к понижению флуоресценции RexYFP, это может привести к возникновению ложного сигнала. Для того чтобы учесть влияние рН на сигнал RexYFP мы использовали контрольный белок *HyPer-C199S* (*SypHer*) [278, 302], который тоже создан на основе пермутанта *srYFP* и, следовательно, должен иметь схожую рН-зависимость. *HyPer* является генетически кодируемым биосенсором для регистрации H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Мутация C199S делает этот сенсор не чувствительным к своему субстрату, но рН-зависимость *srYFP* остается прежней. Таким образом, изменения флуоресцентного сигнала *SypHer* свидетельствуют лишь об изменениях величины рН среды. Для подтверждения одинаковой рН-зависимости RexYFP и *SypHer*, оба белка были выделены. Мы сравнили рН-зависимость флуоресценции, возбуждаемой при 490 нм, для обоих белков. На рисунке 33Г представлена эта зависимость. Оказалось, что для белков характерны

разные величины  $pK_a$ , несмотря на то, что оба они содержат один и тот же флуоресцентный белок в своей основе. Для *SypHer* величина  $pK_a$  составляет 8,5, в то время как для *RexYFP* – 7,6. Несмотря на различия в  $pK_a$  для биосенсоров характерно одинаковое изменение флуоресценции (приблизительно в 8 раз) в физиологическом диапазоне изменений pH (6,5 – 8,0).

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

### 3.2.4. Использование *RexYFP* в клетках эукариот

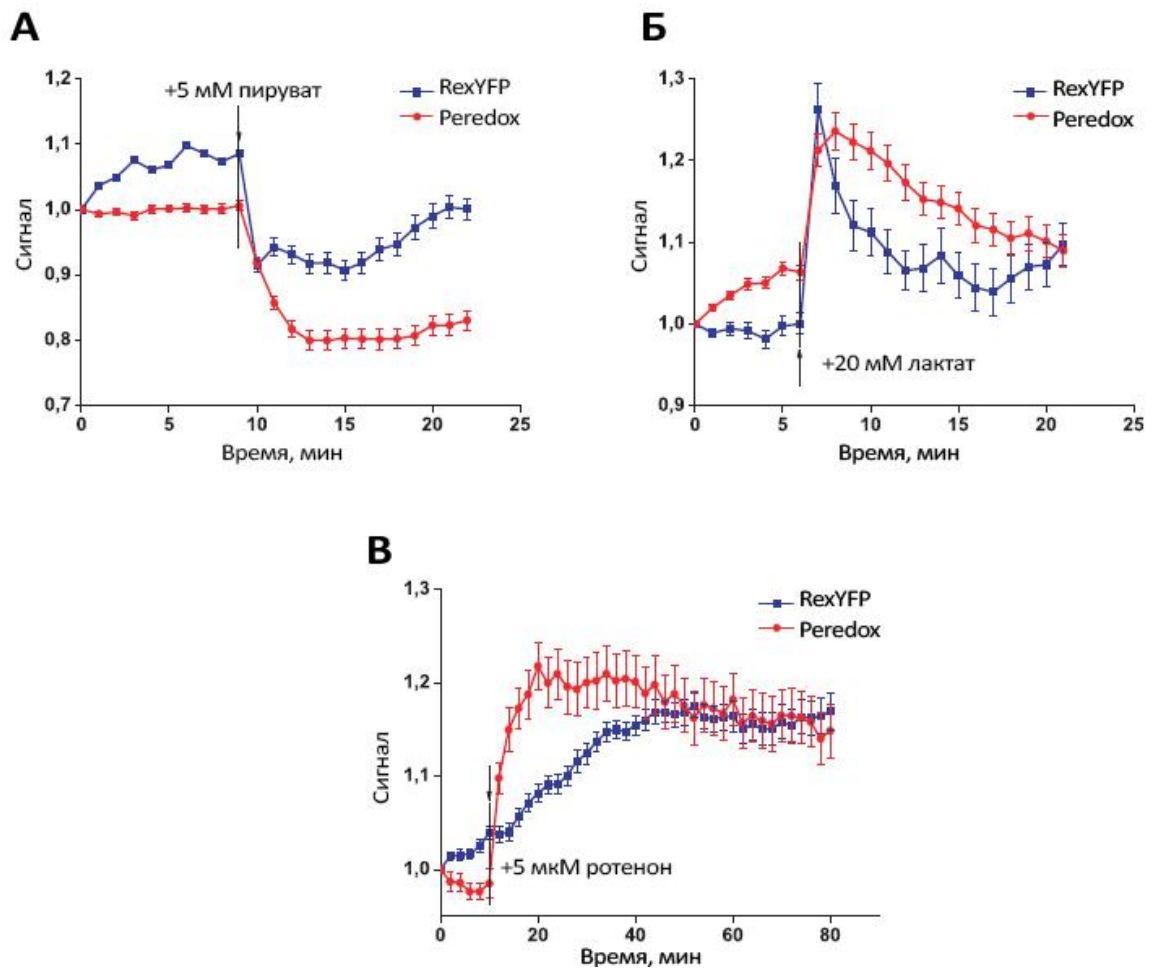
На следующем этапе исследования мы проверили возможность биосенсора *RexYFP* функционировать в живых клетках. Для этого мы проэкспрессировали конструкцию биосенсора в клетках линий HeLa и HEK293.

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

К клеткам, экспрессирующим *RexYFP* и *SypHer*, мы добавляли лактат и пируват. Обе добавки вызвали мгновенное падение сигнала *RexYFP*. При этом снижение интенсивности флуоресценции наблюдалось и для pH-сенсора *SypHer*. Изменение сигнала вызвано закислением цитоплазмы, поскольку транспорт лактата и пирувата через цитоплазматическую мембрану осуществляется благодаря  $H^+$ -симпорту [303, 304]. Мы усреднили сигналы биосенсоров по большому количеству клеток и нормировали усредненный сигнал *RexYFP* на сигнал *SypHer*. Нормированный сигнал *RexYFP* не зависит от pH-колебаний и отражает изменение соотношения  $НАД^+/НАДН$  в клетке. Сигнал *RexYFP* на добавление пирувата и лактата мы сравнили с сигналом еще одного биосенсора на соотношение  $НАД^+/НАДН$  *Peredox*, опубликованного ранее [284]. *Peredox* также представляет собой химерный белок, но в отличие от *RexYFP*, пермутант флуоресцентного белка T-Sapphire связан с двумя мономерами T-Rex. Поэтому механизм работы *Peredox* основан на межмолекулярных взаимодействиях двух субъединиц в составе димера T-Rex. При увеличении  $НАДН$  в системе интенсивность флуоресценции *Peredox* растет. Для ратиометрического измерения к *Peredox* был пришит флуоресцентный белок mCherry, поэтому сигнал этого биосенсора регистрируют как F405/F561 [284]. При тестировании биосенсора *RexYFP* мы

одновременно проводили те же самые эксперименты с Peredox, сравнивая полученные результаты.

На рисунке 34А,Б приведены сравнения сигналов RexYFP и Peredox в ответ на добавление к клеткам линии НЕК293 пирувата и лактата. После добавления 5 мМ пирувата оба сенсора регистрировали падение цитоплазматического НАДН. А добавление избытка лактата (20 мМ) в среду наоборот привело к быстрому повышению НАДН, при этом после 15 минут от момента добавки соотношение окисленной и восстановленной форм кофактора вернулось приблизительно к прежнему значению. RexYFP и Peredox демонстрируют схожие характер и амплитуду ответа. Это позволяет сделать вывод о том, что предложенный нами способ контроля рН-изменений в клетке и нормирование сигнала RexYFP вполне эффективен.



**Рисунок 34. Сравнение сигналов RexYFP и Peredox в экспериментах с живыми клетками**

Изменения сигналов RexYFP (синие линии) и Peredox (красные линии) в ответ на добавление А) 5 мМ пирувата Б) 20 мМ лактата В) 5 мкМ ротенона. Используемые линии клеток в эксперименте с пируватом и лактатом НЕК293, с ротеноном - HeLa. Сигнал Peredox рассчитывается как  $F_{405}/F_{561}$ , сигнал RexYFP рассчитывается как  $F_{490_{HyPer-C199S}}/F_{490_{RexYFP}}$ . Кривые обоих биосенсоров построены по результатам 3 независимых экспериментов.

Митохондрии являются главными потребителями НАДН в клетке. До сих пор оставалось неясным передаются ли изменения окислительно-восстановительного состояния матрикса митохондрий в цитоплазму. Мы ингибировали дыхательную цепь митохондрий на уровне комплекса I, используя ингибитор ротенон. С помощью биосенсоров RexYFP и Peredox регистрировали изменения соотношения  $\text{НАД}^+/\text{НАДН}$  в цитоплазме. Оба сенсора регистрировали увеличение цитоплазматического НАДН при инкубации клеток с 5 мкМ ротенона. Вероятно, это связано с тем, что ингибирование комплекса I приводит к накоплению НАДН в матриксе митохондрий. При этом происходит восстановление пула НАД и в цитоплазме. На рисунке 34В приведены изменения сигналов RexYFP и Peredox при инкубации клеток с ротеноном.

Ингибирование дыхательной цепи митохондрий с помощью ротенона приводит к более медленному восстановлению пула НАД по сравнению с динамикой, которую мы прежде наблюдали при добавлении лактата. Peredox достигает максимума ответа быстрее, чем RexYFP. Это связано, скорее всего, с тем, что Peredox имеет большее сродство к НАДН, его константа сродства составляет около 5 нМ. По этой причине Peredox не может быть использован для работы в митохондриях, в условиях с более высокими концентрациями НАДН [284]. В матриксе митохондрий соотношение  $\text{НАД}^+/\text{НАДН}$  приблизительно в сто раз ниже по сравнению с цитоплазмой [159].

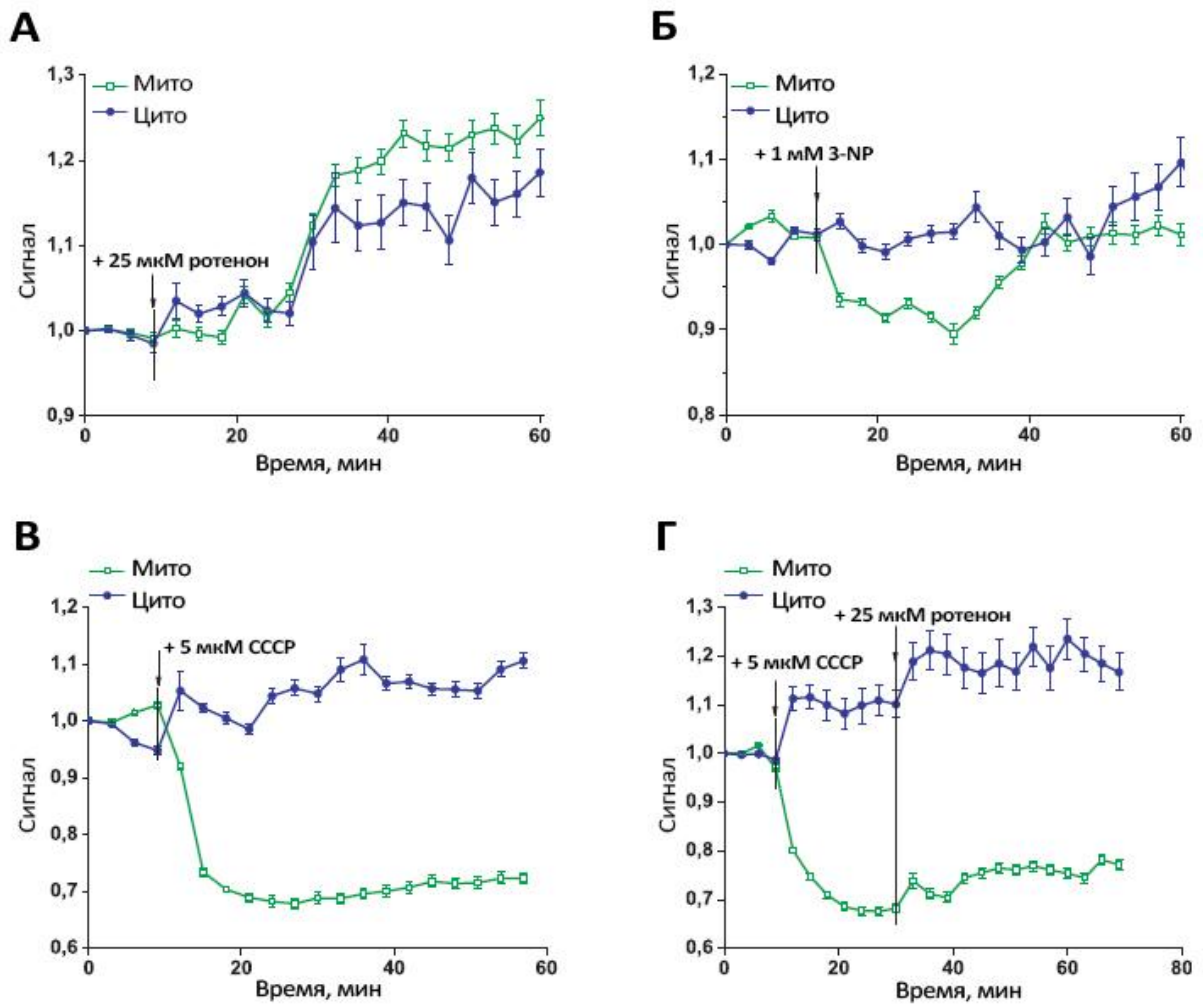
### **3.2.5. Сравнение окислительно-восстановительного состояния пула НАД в цитоплазме и матриксе митохондрий с помощью RexYFP**

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

Мы вновь убедились в том, что при ингибировании комплекса I с помощью ротенона происходит восстановление пула НАД в цитоплазме. Этот процесс наблюдался и в матриксе митохондрий (рисунок 35А).

В другой серии экспериментов мы ингибировали комплекс II дыхательной цепи митохондрий с помощью ингибитора 3-нитропропионовой кислоты (3-NP). Ингибирование комплекса II привело к незначительному уменьшению НАДН в матриксе митохондрий, в то время как в цитоплазме соотношение  $\text{НАД}^+/\text{НАДН}$  не изменилось (рисунок 33Б). Комплекс II благодаря окислению сукцината поставляет

дополнительные электроны в цепь. Возможно, комплекс I частично компенсирует работу заингибированного комплекса II, что приводит к большому расходованию НАДН.



**Рисунок 35. Сравнение сигналов RexYFP с цитоплазматической и митохондриальной локализацией**

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

Добавление разобщающего агента цианид м-хлорофенилгидразона (СССР) в концентрации 5 мкМ привело к закислению цитоплазмы и матрикса митохондрий. При этом в матриксе митохондрий значительно снизился НАДН, а в цитоплазме RexYFP регистрировал наоборот незначительное повышение восстановленной формы кофактора (рисунок 35В). Последующее добавление к этой же самой пробе 25 мкМ

ротенона способствовало небольшому увеличению НАДН, причем в обоих компартментах (рисунок 35Г).

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

### **3.2.6. RexYFP по отношению к другим биосенсорам, регистрирующим соотношение $\text{НАД}^+/\text{НАДН}$**

Ранее независимым образом были опубликованы две работы, в которых были описаны созданные генетически кодируемые биосенсоры для регистрации соотношения  $\text{НАД}^+/\text{НАДН}$ . Поэтому незадолго до нашей публикации, посвященной RexYFP, биосенсоры в этой области уже существовали. Однако, в имеющемся разнообразии предложенных вариантов, RexYFP занял свою определенную нишу и наравне с другими может быть успешно применен для различного рода исследований. Более того в некоторых случаях RexYFP обладает явными преимуществами.

RexYFP был создан на основе одной субъединицы бактериального белка T-Rex. Флуоресцентный пермутант *cpYFP* интегрирован между его нуклеотид- и ДНК-связывающими доменами. Внутримолекулярные перестройки субъединицы T-Rex в зависимости от соотношения  $\text{НАД}^+/\text{НАДН}$  в среде приводят к изменению флуоресцентного сигнала. Два других биосенсора Peredox [284] и Frex [285] устроены по совершенно иному типу. Функционирование обоих сенсоров построено на взаимодействиях между двумя субъединицами T-Rex (в случае Peredox) и B-Rex (в случае Frex). Две субъединицы димера связаны через пермутанты флуоресцентных белков (T-Sapphire в случае Peredox и *cpYFP* для Frex). К Peredox был дополнительно пришит через длинный линкер красный флуоресцентный белок mCherry. С одной стороны это позволяет регистрировать ратиометрический сигнал биосенсора, но с другой стороны делает конструкцию еще массивнее. Есть сведения, что в цитоплазме некоторых типов клеток Peredox подвержен агрегации [284]. Таким образом, конструкция RexYFP минимум в 1,5-2 раза меньше по сравнению с другими. Это может быть ощутимым преимуществом при создании химерных белков с биосенсором или при его направленной локализации в различные структуры клетки.

Мы вычислили константу сродства RexYFP к НАДН, она составляет 180 нМ. У сенсора Peredox она равна 5 нМ [284]. Именно этим можно объяснить тот факт, что, например, при ингибировании дыхательной цепи митохондрий Peredox быстрее

достигает своего максимального ответа, чем RexYFP. При этом сигналы Peredox и RexYFP одинаковы по характеру ответа и даже вполне сравнимы по амплитуде, а в экспериментах с пируватом и лактатом наблюдается даже схожая скорость ответа, вероятно, добавление этих субстратов вызывает очень сильное изменение соотношения НАД<sup>+</sup>/НАДН. По причине высокого сродства к НАДН Peredox не может быть использован в условиях высоких концентраций этого кофактора, в том числе и в матриксе митохондрий [284]. Другой биосенсор Ftex имеет несколько версий отличающихся разным сродством к НАДН. Так, выделяют Ftex (3,7 мкМ), FtexH (40 нМ), C3L194K (50 мкМ). Каждая из этих версий имеет более предпочтительное использование в тех или иных условиях [285]. При этом RexYFP является единственным биосенсором, с помощью которого можно регистрировать динамику изменения соотношения НАД<sup>+</sup>/НАДН как в цитоплазме, так и матриксе митохондрий.

Основным недостатком RexYFP является его чувствительность к изменениям внутриклеточного pH, что характерно для всех биосенсоров на основе cpYFP. В этом плане преимуществом обладает Peredox, поскольку пермутант в его основе не обладает зависимостью от pH в физиологических условиях. Для решения этой проблемы мы использовали биосенсор SypHer, который также содержит cpYFP и является хорошим индикатором изменений внутриклеточного pH. Предварительно мы исследовали pH-зависимость флуоресценции RexYFP и SypHer, убедившись, что она для них совпадает в физиологическом диапазоне изменений. В дальнейшем мы нормировали сигнал RexYFP на сигнал SypHer. Эксперименты на живых клетках и прямое сравнение с pH-нечувствительным Peredox показали, что такой подход вполне может быть использован. Ftex также обладает pH-зависимостью. Авторы данной работы предлагают лишь в некоторых случаях в качестве pH-контроля использовать cpYFP. Такой подход некорректен, поскольку pH чувствительность пермутанта в свободном состоянии и в составе химерного белка может быть разной.

RexYFP является альтернативным вариантом существующих биосенсоров. Он может быть успешно применен для решения многих задач, связанных с регистрацией соотношения НАД<sup>+</sup>/НАДН в клетках.

## ВЫВОДЫ

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

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящей работе был усовершенствован генетически кодируемый флуоресцентный сенсор для регистрации пероксида водорода HyPer. Полученный вариант биосенсора, который отличается наличием мутации H34Y, был назван HyPer-3.

HyPer-3 обладает рядом преимуществ перед HyPer и созданным ранее улучшенным вариантом HyPer-2. В частности, HyPer-3 обладает сравнимым с HyPer-2 динамическим диапазоном, но при этом его скорости окисления и последующего восстановления существенно выше, что делает HyPer-3 более предпочтительным инструментом для регистрации быстрых колебаний  $H_2O_2$  в живых системах. Судя по данным гель-хроматографии, мутации A406V (в составе HyPer-2) и H34Y (в составе HyPer-3) в белке OxyR оказывают разное влияние на олигомеризацию биосенсора. HyPer-2 демонстрирует строгую димерность в отличие от HyPer-3, присутствующего даже в концентрированном растворе в виде смеси димера и мономера. Мы установили, что олигомерное состояние биосенсора HyPer не связано с его динамическим диапазоном, но может быть связано со скоростям реакций взаимодействия белка с  $H_2O_2$  и тиол-восстанавливающими компонентами клетки. Объединение мутаций A406V, H34Y привело к созданию сверхмедленной версии биосенсора, которая может быть использована в качестве долговременного индикатора.

Мы протестировали HyPer-3 в системе *in vivo* на модели раны хвостового плавника *Danio rerio*. В данной модели с помощью HyPer можно регистрировать градиент концентрации  $H_2O_2$ , распространяющийся от области раны вглубь эпителия. Для выполнения этой задачи лучше использовать HyPer-3 с его более контрастным ответом по сравнению с HyPer.

Используя микроскопию в режиме FLIM, мы обнаружили, что время жизни флуоресценции HyPer и HyPer-3, причем в большей степени именно для HyPer-3, уменьшается при окислении. Этим примером мы впервые продемонстрировали, что время жизни флуоресценции может зависеть от изменения окружения хромофора в одно-флуорофорных сенсорах. С большой вероятностью такой тип микроскопии может быть использован и для других биосенсоров, основанных на пермутированных флуоресцентных белках. Учитывая все преимущества FLIM, создание сенсоров, которые можно использовать в этом методе, является весьма перспективным направлением.

Вторую часть настоящей работы мы посвятили созданию генетически кодируемого флуоресцентного биосенсора для регистрации динамики изменения соотношения  $НАД^+/НАДН$  в живых системах. За основу мы выбрали белок T-Rex из

*Thermus aquaticus* и интегрировали в его последовательность пермутированный желтый флуоресцентный белок *cpYFP*. Полученный сенсор *RexYFP* мы охарактеризовали в системе *in vitro* и установили, что он детектирует даже небольшие изменения соотношения  $\text{НАД}^+/\text{НАДН}$ .

*RexYFP*, как и прочие белки на основе *cpYFP*, обладает чувствительностью к изменениям величины рН в физиологическом диапазоне. Мы разработали подход, позволяющий устранить влияние колебаний рН в ходе эксперимента на сигнал *RexYFP*. В качестве индикатора для регистрации изменений величины рН в каждом параллельном эксперименте мы использовали *HyPer-C199S* (*SypHer*). Этот белок является производным *HyPer*, но мутация *C199S* делает его нечувствительным к  $\text{H}_2\text{O}_2$ , но не влияет на его рН-зависимость. Мы нормировали сигнал *RexYFP* на сигнал *SypHer*. Результирующий сигнал соответствует изменению лишь соотношения  $\text{НАД}^+/\text{НАДН}$ . Такой подход может быть использован и при работе с другими сенсорами, сигнал которых зависит от изменений величины рН в клетке.

Мы протестировали *RexYFP* в клетках эукариот, сравнивая его с опубликованным ранее биосенсором *Peredox*. В экспериментах на добавление лактата и пирувата, а также ингибировании комплекса I ротеноном сигналы *HyPer* и *Peredox* имели одинаковый характер поведения и сравнимую амплитуду ответа.

*RexYFP* на данный момент является единственным биосенсором, с помощью которого можно регистрировать динамику изменения соотношения  $\text{НАД}^+/\text{НАДН}$  как в цитоплазме, так и в митохондриях клеток. Мы сравнили изменение сигнала *RexYFP* в цитоплазме и митохондриях в ответ на ингибирование комплексов I и II, добавление разобщителя СССР. С помощью данного сенсора можно не только регистрировать изменения соотношения  $\text{НАД}^+/\text{НАДН}$  отдельно в цитоплазме или митохондриях, но и как изменение окислительно-восстановительного состояния, например, митохондрий отражается в цитоплазме и наоборот.

В дальнейшей перспективе предстоят работы по улучшению *RexYFP*. Сохранив его основные качества, можно будет заменить флуоресцентный белок в его составе на более рН-стабильный. В настоящее время создается все больше новых пермутантов флуоресцентных белков, отвечающих самым высоким требованиям при создании биосенсоров.

Данная работа объединила в себе несколько видов биосенсоров, регистрирующих некоторые параметры сложно устроенных окислительно-восстановительных систем клетки. Главным результатом работы является улучшение созданного ранее и ныне широкого известного биосенсора *HyPer*, а также создание

абсолютно нового биосенсора RexYFP – единственного в своем роде, позволяющего регистрировать соотношение НАД<sup>+</sup>/НАДН в разных компартментах клетки.

## СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

- AIF – (apoptosis inducing factor), апоптоз-индуцирующий фактор
- AP-1 – (activator protein 1), белок-активатор 1
- APF – (2-[6-(4V-amino)phenoxy-3H-xanthen-3-on-9-yl]benzoic acid), 2-[6(4-амино)фенокси-3H-ксантен-3-он-9-ил]бензойная кислота
- ARTs – (NAD<sup>+</sup>-depend mono(ADP-ribosyl)transferases), НАД<sup>+</sup>-зависимые моно(АДФ-рибозил)трансферазы
- BFP – (blue fluorescent protein), голубой флуоресцентный белок
- BSA – (bovine serum albumin), бычий сывороточный альбумин
- CCCP – (carbonylcyanide m-chlorophenylhydrazone), карбонилцианид m-хлорофенилгидразон
- CFP – (cyan fluorescent protein), циановый флуоресцентный белок
- cpYFP – (circularly permuted yellow fluorescent protein), циркулярно пермутированный желтый флуоресцентный белок
- DCFH – (2,7-dichlorodihydrofluorescein), 2,7-дихлордигидрофлуоресцеин
- DCFH-DA – (2,7-dichlorodihydrofluorescein diacetate), 2,7-дихлордигидрофлуоресцеин ацетат
- DHR – (dihydrorhodamine 123), дигидрородамин 123
- dNTP (deoxyribonucleoide triphosphate) - дезоксирибонуклеотидтрифосфат
- DUOX – (dual oxidase), двойная оксидаза
- FBS – (fetal bovine serum inactivated), эмбриональная телячья сыворотка
- FLIM – (fluorescence lifetime imaging microscopy), микроскопия с режимом регистрации времени жизни флуоресценции
- FRET – (Forster (fluorescent) resonance energy transfer), Ферстеровский (флуоресцентный) резонансный перенос энергии
- GFP – (green fluorescent protein), зеленый флуоресцентный белок
- GPx – (glutathione peroxidase), глутатионпероксидаза
- GR – (glutathione reductase), глутатионредуктаза
- Grx – (glutaredoxin), глутаредоксин
- GSH – восстановленный глутатион
- GSSG – окисленный глутатион
- HE – (dihydroethidium, hydroethidine), дигидроэтидиум, гидроэтидин
- HEK293 – (human embryonic kidney 293), линия человеческих эмбриональных клетки почек

- HPF – (2-[6-(4V-hydroxy)phenoxy-3H-xanthen-3-on-9-yl]benzoic acid), 2-[6(4-гидрокси)фенокси-3H-ксантен-3-он-9-ил]бензойная кислота
- HRP – (Horseradish peroxidase), пероксидаза хрена
- IP<sub>3</sub> – (inositol 1,4,5-trisphosphate), инозитол-1,4,5-трифосфат
- MPT – (Mitochondrial Permeability Transition), неспецифическая проницаемость митохондрий
- NADK – (NAD<sup>+</sup>-kinase), НАД<sup>+</sup>-киназа
- NBT – (nitroblue tetrazolium), тетразолиевый синий
- NF-κB – (nuclear factor kappa-light-chain enhancer of activated B cells), ядерный транскрипционный фактор κB, связывающийся с последовательностью энхансера гена каппа легкой цепи иммуноглобулина в активированных В-клетках
- NMNAT – (nicotinamide mononucleotide adenylyltransferase), никотинамид мононуклеотид аденилтрансфераза
- NOS – (nitric oxide synthase), NO-синтаза
- NOX – (NADPH oxidase), НАДФН-оксидаза
- 3-NP – (3-nitropropionic acid), 3-нитропропионовая кислота
- P53 – (protein 53), белок 53
- PARG – (poly(ADP-ribose)glycohydrolase), поли(АДФ-рибоза)гликогидролаза
- PARP – (poly (ADP-ribose) polymerase), поли(АДФ-рибоза)полимераза
- PC1 – Peroxy Crimson
- PG1 – Peroxy Green 1
- Prx – (peroxiredoxin), пероксиредоксин
- Rac – (Ras-related C3 botulinum toxin substrate), семейство малых ГТФаз
- ROP – (Rex operator), оператор Rex
- Sir – (sirtuin), сиртуин
- SOD – (superoxide dismutase), супероксиддисмутаза
- Srx – (sulfiredoxin), сульфиредоксин
- TGR – (thioredoxin glutathione reductase), тиоредоксинглутатионредуктаза
- TRPM2 рецепторы – transient receptor potential cation channel, subfamily M, member 2
- TrxR – (thioredoxin reductase), тиоредоксинредуктаза
- Trx – (thioredoxin), тиоредоксин
- YFP – (yellow fluorescent protein), желтый флуоресцентный белок
- АДФ – аденозиндифосфат
- АФК – активные формы кислорода
- АМФ – аденозинмонофосфат

АТФ – аденозинтрифосфат

ГТФ – гуанозинтрифосфат

ИПТГ – изопротил-1-тио-β-D-галактозид

α-КГ – α-кетоглутарат

НАД – никотинамидадениндинуклеотид (общий пул)

НАД<sup>+</sup> – никотинамидадениндинуклеотид (окисленная форма)

НАДН – никотинамидадениндинуклеотид (восстановленная форма)

НАДФ – никотинамидадениндинуклеотидфосфат (общий пул)

НАДФ<sup>+</sup> – никотинамидадениндинуклеотидфосфат (окисленная форма)

НАДФН – никотинамидадениндинуклеотидфосфат (восстановленная форма)

НКАДФ – никотиновая кислота адениндинуклеотидфосфата

Трис - трис-гидроксиметиламинометан

ФАД – флавинадениндинуклеотид (окисленная форма)

ФАДН<sub>2</sub> - флавинадениндинуклеотид (восстановленная форма)

цАДФ-рибоза – циклическая АДФ-рибоза

цАМФ – циклический АМФ

ЭДТА – этилендиаминтетрауксусная кислота

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- [1] S. Raha, B.H. Robinson, Mitochondria, oxygen free radicals, disease and ageing, *Trends Biochem. Sci.* 25 (2000) 502-508.
- [2] D.C. Wallace, Mitochondrial diseases in man and mouse, *Science* 283 (1999) 1482-1488.
- [3] J. St-Pierre, J.A. Buckingham, S.J. Roebuck, M.D. Brand, Topology of superoxide production from different sites in the mitochondrial electron transport chain, *J. Biol. Chem.* 277 (2002) 44784-44790.
- [4] B. Chance, H. Sies, A. Boveris, Hydroperoxide metabolism in mammalian organs, *Physiol. Rev.* 59 (1979) 527-605.
- [5] A. Meneshian, G.B. Bulkley, The physiology of endothelial xanthine oxidase: from urate catabolism to reperfusion injury to inflammatory signal transduction, *Microcirculation* 9 (2002) 161-175.
- [6] J.M. McCord, I. Fridovich, The reduction of cytochrome c by milk xanthine oxidase, *J. Biol. Chem.* 243 (1968) 5753-5760.
- [7] A. Bouloumie, J. Bauersachs, W. Linz, B.A. Scholkens, G. Wiemer, I. Fleming, R. Busse, Endothelial dysfunction coincides with an enhanced nitric oxide synthase expression and superoxide anion production, *Hypertension* 30 (1997) 934-941.
- [8] N.M. Olken, M.A. Marletta, NG-methyl-L-arginine functions as an alternate substrate and mechanism-based inhibitor of nitric oxide synthase, *Biochemistry* 32 (1993) 9677-9685.
- [9] K. Bedard, K.H. Krause, The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology, *Physiol. Rev.* 87 (2007) 245-313.
- [10] B.M. Babior, R.S. Kipnes, J.T. Curnutte, Biological defense mechanisms. The production by leukocytes of superoxide, a potential bactericidal agent, *J. Clin. Invest.* 52 (1973) 741-744.
- [11] E. Lubos, D.E. Handy, J. Loscalzo, Role of oxidative stress and nitric oxide in atherothrombosis, *Front Biosci.* 13 (2008) 5323-5344.
- [12] G.Y.N. Iyer, D.M.F. Islam, J.H. Quastel, Biochemical aspects of phagocytosis, *Nature* 192 (1961) 535-542.
- [13] B.M. Babior, R.S. Kipnes, J.T. Curnutte, Biological defense mechanisms. The production by leukocytes of superoxide, a potential bactericidal agent, *J. Clin. Invest.* 52 (1973) 741-744.
- [14] R.L. Baehner, D.G. Nathan, Leukocyte oxidase: defective activity in chronic granulomatous disease, *Science* 155 (1967) 835-836.
- [15] B. Holmes, A.R. Page, R.A. Good, Studies of the metabolic activity of leukocytes from patients with a genetic abnormality of phagocytic function, *J. Clin. Invest.* 46 (1967) 1422-1432.

- [16] P.G. Quie, J.G. White, B. Holmes, R.A. Good, In vitro bactericidal capacity of human polymorphonuclear leukocytes: diminished activity in chronic granulomatous disease of childhood, *J. Clin. Invest.* 46 (1967) 668–679.
- [17] B.M. Babior, J.D. Lambeth, W. Nauseef, The neutrophil NADPH oxidase, *Arch. Biochem. Biophys.* 397 (2002) 342–344.
- [18] F.D. Oakley, D. Abbott, Q. Li, J.F. Engelhardt, Signaling components of redox active endosomes: the redoxosomes, *Antioxid. Redox Signal.* 11 (2009) 1313–1333.
- [19] B. Rada, C. Hably, A. Meczner, C. Timár, G. Lakatos, P. Enyedi, E. Ligeti, Role of Nox2 in elimination of microorganisms, *Semin. Immunopath.* 30 (2008) 237–253.
- [20] W.M. Nauseef, How human neutrophils kill and degrade microbes: an integrated view, *Immunol. Rev.* 219 (2007) 88–102.
- [21] A.R. Cross, A.W. Segal, The NADPH oxidase of professional phagocytes—prototype of the NOX electron transport chain systems, *Biochim. Biophys. Acta* 1657 (2004) 1–22.
- [22] C.C. Winterbourn, M.B. Hampton, J.H. Livesey, A.J. Kettle, Modeling the reactions of superoxide and myeloperoxidase in the neutrophil phagosome: implications for microbial killing, *J. Biol. Chem.* 281 (2006) 39860–39869.
- [23] Y.A. Suh, R.S. Arnold, B. Lassegue, J. Shi, X. Xu, D. Sorescu, A.B. Chung, K.K. Griendling, J.D. Lambeth, Cell transformation by the superoxide-generating oxidase Mox1, *Nature* 401 (1999) 79–82.
- [24] B. Banfi, A. Maturana, S. Jaconi, S. Arnaudeau, T. Laforge, B. Sinha, E. Ligeti, N. Demaurex, K.H. Krause, A mammalian H<sup>+</sup> channel generated through alternative splicing of the NADPH oxidase homolog NOH-1, *Science* 287 (2000) 138–142.
- [25] H. Kikuchi, M. Hikage, H. Miyashita, M. Fukumoto, NADPH oxidase subunit, gp91(phox) homologue, preferentially expressed in human colon epithelial cells, *Gene* 254 (2000) 237–243.
- [26] G. Cheng, Z. Cao, X. Xu, E.G. Meir, J.D. Lambeth, Homologs of gp91phox: cloning and tissue expression of Nox3, Nox4, Nox5, *Gene* 269 (2001) 131–140.
- [27] M. Geiszt, J.B. Kopp, P. Varnai, T.L. Leto, Identification of renox, an NAD(P)H oxidase in kidney, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97 (2000) 8010–8014.
- [28] A. Shiose, J. Kuroda, K. Tsuruya, M. Hirai, H. Hirakata, S. Naito, M. Hattori, Y. Sakaki, H. Sumimoto, A novel superoxide-producing NAD(P)H oxidase in kidney, *J. Biol. Chem.* 276 (2001) 1417–1423.
- [29] B. Banfi, G. Molnar, A. Maturana, K. Steger, B. Hegedus, N. Demaurex, K.H. Krause, A Ca<sup>2+</sup>-activated NADPH oxidase in testis, spleen, lymph nodes, *J. Biol. Chem.* 276 (2001) 37594–37601.

- [30] X. De Deken, D. Wang, M.C. Many, S. Costagliola, F. Libert, G. Vassart, J.E. Dumont, F. Miot, Cloning of two human thyroid cDNAs encoding new members of the NADPH oxidase family, *J. Biol. Chem.* 275 (2000) 23227–23233.
- [31] C. Dupuy, R. Ohayon, A. Valent, M.S. Noel-Hudson, D. Deme, A. Virion, Purification of a novel flavoprotein involved in the thyroid NADPH oxidase. Cloning of the porcine and human cDNAs, *J. Biol. Chem.* 274 (1999) 37265–37269.
- [32] C.C. Winterbourn, Reconciling the chemistry and biology of reactive oxygen species, *Nat. Chem. Biol.* 4 (2008) 278–286.
- [33] Y. Groemping, K. Lapouge, S.J. Smerdon, K. Rittinger, Molecular basis of phosphorylation-induced activation of the NADPH oxidase, *Cell* 113 (2003) 343–355.
- [34] A.R. Cross, A.W. Segal, The NADPH oxidase of professional phagocytes—prototype of the NOX electron transport chain systems, *Biochim. Biophys. Acta.* 1657 (2004) 1–22.
- [35] J. Doussiere, J. Gaillard, P.V. Vignais, Electron transfer across the O<sub>2</sub>-generating flavocytochrome b of neutrophils. Evidence for a transition from a low-spin state to a high-spin state of the heme iron component, *Biochemistry* 35 (1996) 13400–13410.
- [36] B. Banfi, R.A. Clark, K. Steger, K.H. Krause, Two novel proteins activate superoxide generation by the NADPH oxidase NOX1, *J. Biol. Chem.* 278 (2003) 3510–3513.
- [37] B. Lassegue, D. Sorescu, K. Szocs, Q. Yin, M. Akers, Y. Zhang, S.L. Grant, J.D. Lambeth, K.K. Griendling, Novel gp91(phox) homologues in vascular smooth muscle cells: nox1 mediates angiotensin II-induced superoxide formation and redox-sensitive signaling pathways, *Circ. Res.* 88 (2001) 888–894.
- [38] T. Ago, T. Kitazono, J. Kuroda, Y. Kumai, M. Kamouchi, H. Ooboshi, M. Wakisaka, T. Kawahara, K. Rokutan, S. Ibayashi, M. Iida, NAD(P)H oxidases in rat basilar arterial endothelial cells, *Stroke* 36 (2005) 1040–1046.
- [39] N.K. Lee, Y.G. Choi, J.Y. Baik, S.Y. Han, D.W. Jeong, Y.S. Bae, N. Kim, S.Y. Lee, A crucial role for reactive oxygen species in RANKL-induced osteoclast differentiation, *Blood* 106 (2005) 852–859.
- [40] R. Paffenholz, R.A. Bergstrom, F. Pasutto, P. Wabnitz, R.J. Munroe, W. Jagla, U. Heinzmann, A. Marquardt, A. Bareiss, J. Laufs, A. Russ, G. Stumm, J.C. Schimenti, D.E. Bergstrom, Vestibular defects in head-tilt mice result from mutations in Nox3, encoding an NADPH oxidase, *Genes Dev.* 18 (2004) 486–491.
- [41] B. Banfi, F. Tirone, I. Durussel, J. Knisz, P. Moskwa, G.Z. Molnar, K.H. Krause, J.A. Cox, Mechanism of Ca<sup>2+</sup> activation of the NADPH oxidase 5 (NOX5), *J. Biol. Chem.* 279 (2004) 18583–18591.

- [42] J.M. McCord, I. Fridovich, Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte hemocuprein (hemocuprein), *J. Biol. Chem.* 244 (1969) 6049–6055.
- [43] R. Radi, G. Peluffo, M.N. Alvarez, M. Naviliat, A. Cayota, Unraveling peroxynitrite formation in biological systems, *Free Radic. Biol. Med.* 30 (2001) 463-488.
- [44] N. Hauptmann, J. Grimsby, J.C. Shih, E. Cadenas, The metabolism of tyramine by monoamine oxidase A/B causes oxidative damage to mitochondrial DNA, *Arch. Biochem. Biophys.* 335 (1996) 295-304.
- [45] S.J. Stohs, D. Bagch, Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions, *Free Radic. Biol. Med.* 18 (1995) 321–336.
- [46] K. Chen, S.R. Thomas, J.F.Jr. Keaney, Beyond LDL oxidation: ROS in vascular signal transduction, *Free Radic. Biol. Med.* 35 (2003) 117-132.
- [47] E.A. Veal, A.M. Day, B.A. Morgan, Hydrogen peroxide sensing and signaling, *Mol. Cell* 26 (2007) 1-14.
- [48] D.P. Buchczyk, L.O. Klotz, K. Lang, C. Fritsch, H. Sies, High efficiency of 5-aminolevulinic-acid-photodynamic treatment using UVA irradiation, *Carcinogenesis* 22 (2001) 879-883.
- [49] M.J. Steinbeck, A.U. Khan, M.J. Karnovsky, Intracellular singlet oxygen generation by phagocytosing neutrophils in response to particles coated with a chemical trap, *J. Biol. Chem.* 267 (1992) 13425-13433.
- [50] P.R. Gardner, I. Fridovich, Superoxide sensitivity of the Escherichia coli aconitase, *J. Biol. Chem.* 266 (1991) 19328-19333.
- [51] B. Brune, K.U. Schmidt, V. Ullrich, Activation of soluble guanylate cyclase by carbon monoxide and inhibition by superoxide anion, *Eur. J. Biochem.* 192 (1990) 683-688.
- [52] C.E. Cooper, G.R. Lynagh, K.P. Hoyes, R.C. Hider, R. Cammack, J.B. Porter, The relationship of intracellular iron chelation to the inhibition and regeneration of human ribonucleotide reductase, *J. Biol. Chem.* 271 (1996) 20291-20299.
- [53] S. Watanabe, A. Kita, K. Kobayashi, K. Miki, Crystal structure of the [2Fe-2S] oxidative-stress sensor SoxR bound to DNA, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 105 (2008) 4121-4126.
- [54] J. Wu, W.R. Dunham, B. Weiss, Overproduction and physical characterization of SoxR, a [2Fe-2S] protein that governs an oxidative response regulon in Escherichia coli, *J. Biol. Chem.* 270 (1995)10323–10327.
- [55] E. Hidalgo, J.M.Jr. Bollinger, T.M. Bradley, C.T. Walsh, B. Dimple, Binuclear [2Fe-2S] clusters in the Escherichia coli SoxR protein and role of the metal centers in transcription, *J. Biol. Chem.* 270 (1995) 20908–20914.

- [56] H. Ding, E. Hidalgo, B. Demple, The redox state of the [2Fe-2S] clusters in SoxR protein regulates its activity as a transcription factor, *J. Biol. Chem.* 271 (1996) 33173-33175.
- [57] H. Liu, R. Colavitti, I.I. Rovira, T. Finkel, Redox-dependent transcriptional regulation, *Circ. Res.* 97 (2005) 967-974.
- [58] P.J. Pomposiello, M.H. Bennik, B. Demple, Genome-wide transcriptional profiling of the *Escherichia coli* responses to superoxide stress and sodium salicylate, *J. Bacteriol.* 183 (2001) 3890–3902.
- [59] H.J. Forman, I. Fridovich, Superoxide dismutase: a comparison of rate constants, *Arch. Biochem. Biophys.* 158 (1973) 396-400.
- [60] G. Storz, L.A. Tartaglia, B.N. Ames, Transcriptional regulator of oxidative stress-inducible genes: direct activation by oxidation, *Science* 248 (1990) 189-194.
- [61] H. Choi, S. Kim, P. Mukhopadhyay, S. Cho, J. Woo, G. Storz, S.E. Ryu, Structural basis of the redox switch in the OxyR transcription factor, *Cell* 105 (2001) 103-113.
- [62] M. Zheng, F. Aslund, G. Storz, Activation of the OxyR transcription factor by reversible disulfide bond formation, *Science* 279 (1998) 1718–1721.
- [63] J.M. Denu, K.G. Tanner, Specific and reversible inactivation of protein tyrosine phosphatases by hydrogen peroxide: evidence for a sulfenic acid intermediate and implications for redox regulation, *Biochemistry* 37 (1998) 5633–5642.
- [64] S.R. Lee, K.S. Kwon, S.R. Kim, S.G. Rhee, Reversible inactivation of protein-tyrosine phosphatase 1B in A431 cells stimulated with epidermal growth factor, *J. Biol. Chem.* 273 (1998) 15366–15372.
- [65] C. Hidalgo, R. Bull, M.I. Behrens, P. Donoso, Redox regulation of RyR-mediated Ca<sup>2+</sup> release in muscle and neurons, *Biol. Res.* 37 (2004) 539–552.
- [66] X.D. Tang, L.C. Santarelli, S.H. Heinemann, T. Hoshi, Metabolic regulation of potassium channels, *Annu. Rev. Physiol.* 66 (2004) 131–159.
- [67] E. Giannoni, F. Buricchi, G. Raugei, G. Ramponi, P. Chiarugi, Intracellular reactive oxygen species activate Src tyrosine kinase during cell adhesion and anchorage-dependent cell growth, *Mol. Cell. Biol.* 25 (2005) 6391-6403.
- [68] Z.A. Wood, L.B. Poole, P.A. Karplus, Peroxiredoxin evolution and the regulation of hydrogen peroxide signaling, *Science* 300 (2003) 650-653.
- [69] C.C. Winterbourn, M.B. Hampton, Thiol chemistry and specificity in redox signaling, *Free Radic. Biol. Med.* 45 (2008) 549-561.
- [70] J.R. Stone, An assessment of proposed mechanisms for sensing hydrogen peroxide in mammalian systems, *Arch. Biochem. Biophys.* 422 (2004) 119-124.

- [71] L.B. Poole, P.A. Karplus, A. Claiborne, Protein sulfenic acids in redox signaling, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 44 (2004) 325-347.
- [72] J.W. Lee, S. Soonsanga, J.D. Helmann, A complex thiolate switch regulates the *Bacillus subtilis* organic peroxide sensor OhrR, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 104 (2007) 8743-8748.
- [73] H.A. Woo, H.Z. Chae, S.C. Hwang, K.S. Yang, S.W. Kang, K. Kim, S.G. Rhee, Reversing the inactivation of peroxiredoxins caused by cysteine sulfinic acid formation, *Science* 300 (2003) 653-656.
- [74] B. Biteau, J. Labarre, M.B. Toledano, ATP-dependent reduction of cysteine-sulphinic acid by *S. cerevisiae* sulphiredoxin, *Nature* 425 (2003) 980-984.
- [75] A.V. Budanov, A.A. Sablina, E. Feinstein, E.V. Koonin, P.M. Chumakov, Regeneration of peroxiredoxins by p53-regulated sestrins, homologs of bacterial AhpD, *Science* 304 (2004) 596-600.
- [76] P. Ghezzi, Regulation of protein function by glutathionylation, *Free Radic. Res.* 39 (2005) 573-580.
- [77] G.P. Bienert, A.L. Moller, K.A. Kristiansen, A. Schulz, I.M. Moller, J.K. Schjoerring, T.P. Jahn, Specific aquaporins facilitate the diffusion of hydrogen peroxide across membranes, *J. Biol. Chem.* 282 (2007) 1183-1192.
- [78] H. Sies, Oxidative stress: oxidants and antioxidants, *Exp. Physiol.* 82 (1997) 291-295.
- [79] I. Fridovich, Superoxide radical and superoxide dismutases, *Annu. Rev. Biochem.* 64 (1995) 97-112.
- [80] J.A. Tainer, E.D. Getzoff, J.S. Richardson, D.C. Richardson, Structure and mechanism of copper, zinc superoxide dismutase, *Nature* 306 (1983) 284-287.
- [81] P.J. Hart, M.M. Balbirnie, N.L. Ogiwara, A.M. Nersissian, M.S. Weiss, J.S. Valentine, D. Eisenberg, A structure-based mechanism for copper-zinc superoxide dismutase, *Biochemistry* 38 (1999) 2167-2178.
- [82] G.E. Borgstahl, H.E. Parge, M.J. Hickey, W.F. Jr. Beyer, R.A. Hallewell, J.A. Tainer, The structure of human mitochondrial manganese superoxide dismutase reveals a novel tetrameric interface of two 4-helix bundles, *Cell* 71 (1992) 107-118.
- [83] H.M. Hassan, I. Fridovich, Enzymatic defenses against the toxicity of oxygen and of streptonigrin in *Escherichia coli*, *J. Bacteriol.* 129 (1977) 1574-1583.
- [84] H.M. Hassan, I. Fridovich, Intracellular production of superoxide radical and of hydrogen peroxide by redox active compounds, *Arch. Biochem. Biophys.* 196 (1979) 385-395.
- [85] H.D. Youn, E.J. Kim, J.H. Roe, Y.C. Hah, S.O. Kang, A novel nickel-containing superoxide

- dismutase from *Streptomyces* spp, *Biochem. J.* 318 (1996) 889-896.
- [86] G. Rotilio, L. Morpurgo, C. Giovagnoli, L. Calabrese, B. Mondovi, Studies of the metal sites of copper proteins. Symmetry of copper in bovine superoxide dismutase and its functional significance, *Biochemistry* 11 (1972) 2187-2192.
- [87] G. Rotilio, R.C. Bray, E.M. Fielden, A pulse radiolysis study of superoxide dismutase, *Biochim. Biophys. Acta* 268 (1972) 605-609.
- [88] D. Klug-Roth, I. Fridovich, J. Rabani, Pulse radiolytic investigation of superoxide catalyzed disproportionation. Mechanism for bovine superoxide dismutase, *J. Am. Chem. Soc.* 95 (1973) 2786-2790.
- [89] A.F. Miller, Superoxide dismutases: active sites that save, but a protein that kills, *Curr. Opin. Chem. Biol.* 8 (2004) 162-168.
- [90] P.R. Gardner, I. Raineri, L.B. Epstein, C.W. White, Superoxide radical and iron modulate aconitase activity in mammalian cells, *J. Biol. Chem.* 270 (1995) 13399-13405.
- [91] E.M. Fielden, P.B. Roberts, The mechanism of action of superoxide dismutase from pulse radiolysis and electron paramagnetic resonance. Evidence that only half the active sites function in catalysis, *Biochem. J.* 139 (1974) 49-60.
- [92] P. Chelikani, I. Fita, P.C. Loewen, Diversity of structures and properties among catalases, *Cell. Mol. Life Sci.* 61 (2004) 192-208.
- [93] B. Chance, H. Sies, A. Boveris, Hydroperoxide metabolism in mammalian organs, *Physiol. Rev.* 59 (1979) 527-605.
- [94] B. Hofmann, H.-J. Hecht, L. Flohe, Peroxiredoxins, *Biol. Chem.* 383 (2002) 347-364.
- [95] Z.A. Wood, E. Schroder, J.R. Harris, L.B. Poole, Structure, mechanism and regulation of peroxiredoxins, *Trends Biochem. Sci.* 28 (2003) 32-40.
- [96] A. Claiborne, J.I. Yeh, T.C. Mallett, J. Luba, E.J. Crane 3rd, V. Charrier, D. Parsonage, Protein-sulfenic acids: diverse roles for an unlikely player in enzyme catalysis and redox regulation, *Biochemistry* 38 (1999) 15407-15416.
- [97] Y. Manevich, S.I. Feinstein, A.B. Fisher, Activation of the antioxidant enzyme 1-CYS peroxiredoxin requires glutathionylation mediated by heterodimerization with pi GST, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101 (2004) 3780-3785.
- [98] Y. Manevich, A.B. Fisher, Peroxiredoxin 6, a 1-Cys peroxiredoxin, functions in antioxidant defense and lung phospholipid metabolism. *Free Radic. Biol. Med.* 38 (2005) 1422-1432.
- [99] S.G. Rhee, T.S. Chang, Y.S. Bae, S.R. Lee, S.W. Kang, Cellular regulation by hydrogen peroxide, *J. Am. Soc. Nephrol.* 14 (2003) S211-S215.

- [100] T.S. Chang, W. Jeong, S.Y. Choi, S. Yu, S.W. Kang, S.G. Rhee, Regulation of peroxiredoxin I activity by Cdc2-mediated phosphorylation, *J. Biol. Chem.* 277 (2002) 25370–25376.
- [101] C.M. Reynolds, J. Meyer, L.B. Poole, An NADH-dependent bacterial thioredoxin reductase-like protein in conjunction with a glutaredoxin homologue form a unique peroxiredoxin (AhpC) reducing system in *Clostridium pasteurianum*, *Biochemistry*, 41(2002) 1990–2001.
- [102] K.H. Koo, S. Lee, S.Y. Jeong, E.T. Kim, H.J. Kim, K. Kim, K. Song, H.Z. Chae, Regulation of thioredoxin peroxidase activity by C-terminal truncation, *Arch. Biochem. Biophys.* 397 (2002) 312–318.
- [103] T. Rabilloud, M. Heller, F. Gasnier, S. Luche, C. Rey, R. Aebersold, M. Benahmed, P. Louisot, J. Lunardi, Proteomics analysis of cellular response to oxidative stress. Evidence for in vivo overoxidation of peroxiredoxins at the active site, *J. Biol. Chem.* 277 (2002) 19396–19401.
- [104] E. Wagner, S. Luche, L. Penna, M. Chevallet, A. Van Dorsselaer, E. Leize-Wagner, T. Rabilloud, A method for detection of overoxidation of cysteines: peroxiredoxins are oxidized in vivo at the active-site cysteine during oxidative stress, *Biochem. J.* 366 (2002) 777–785.
- [105] Z.A. Wood, L.B. Poole, P.A. Karplus, Peroxiredoxin evolution and the regulation of hydrogen peroxide signaling, *Science* 300 (2003) 650–653.
- [106] H.A. Woo, H.Z. Chae, S.C. Hwang, K.S. Yang, S.W. Kang, K. Kim, S.G. Rhee, Reversing the inactivation of peroxiredoxins caused by cysteine sulfonic acid formation, *Science* 300 (2003) 653–656.
- [107] T.S. Chang, W. Jeong, H.A. Woo, S.M. Lee, S. Park, S.G. Rhee, Characterization of mammalian sulfiredoxin and its reactivation of hyperoxidized peroxiredoxin through reduction of cysteine sulfinic acid in the active site to cysteine, *J. Biol. Chem.* 279 (2004) 50994–51001.
- [108] S.G. Rhee, S.W. Kang, W. Jeong, T.S. Chang, K.S. Yang, H.A. Woo, Intracellular messenger function of hydrogen peroxide and its regulation by peroxiredoxins, *Curr. Opin. Cell Biol.* 17 (2005) 183–189.
- [109] K.P. Bhabak, G. Mugesh, Functional mimics of glutathione peroxidase: bioinspired synthetic antioxidants, *Acc. Chem. Res.* 43 (2010) 1408–1419.
- [110] L. Flohe, W.A. Gunzler, H.H. Schock, Glutathione peroxidase: selenoenzyme. *FEBS Lett.* 32 (1973) 132–134.
- [111] A. Holmgren, Thioredoxin structure and mechanism: conformational changes on oxidation of the active-site sulfhydryls to a disulfide, *Structure* 3 (1995) 239–243.

- [112] E.S. Arner, A. Holmgren, Physiological functions of thioredoxin and thioredoxin reductase, *Eur. J. Biochem.* 267 (2000) 6102-6109.
- [113] J. Nordberg, E.S. Arner, Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system, *Free Radic. Biol. Med.* 31 (2001) 1287–1312.
- [114] G. Spyrou, E. Enmark, A. Miranda-Vizuete, J. Gustafsson. Cloning and expression of a novel mammalian thioredoxin. *J. Biol. Chem.* 272 (1997) 2936–2941.
- [115] A. Miranda-Vizuete, J. Ljung, A.E. Damdimopoulos, J.A. Gustafsson, R. Oko, M. Pelto- Huikko, G. Spyrou, Characterization of Sptrx, a novel member of the thioredoxin family specifically expressed in human spermatozoa, *J. Biol. Chem.* 276 (2001) 31567–31574.
- [116] K. Hirota, M. Matsui, S. Iwata, A. Nishiyama, K. Mori, J. Yodoi, AP-1 transcriptional activity is regulated by a direct association between thioredoxin and Ref-1, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94 (1997) 3633–3638.
- [117] H. Martin, M. Dean, Identification of a thioredoxin-related protein associated with plasma membranes, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 175 (1991) 123–128.
- [118] R. Bertini, O.M. Howard, H.F. Dong, J.J. Oppenheim, C. Bizzarri, R. Sergi, G. Caselli, S. Pagliei, B. Romines, J.A. Wilshire, M. Megozzi, H. Nakamura, J. Yodoi, K. Pekkari, R. Gurunath, A. Holmgren, L.A. Herzenberg, P. Grezzi. Thioredoxin, a redox enzyme released in infection and inflammation, is a unique chemoattractant for neutrophils, monocytes, and T cells, *J. Exp. Med.* 189 (1999) 1783–1789.
- [119] G. Powis, D. Mustacich, A. Coon, The role of the redox protein thioredoxin in cell growth and cancer, *Free Radic. Biol. Med.* 29(2000) 312–322.
- [120] A. Holmgren, M. Bjornstedt, Thioredoxin and thioredoxin reductase, *Methods Enzymol.* 252 (1995) 199–208.
- [121] A. Miranda-Vizuete, A.E. Damdimopoulos, G. Spyrou, cDNA cloning, expression and chromosomal localization of the mouse mitochondrial thioredoxin reductase gene(1), *Biochim. Biophys. Acta.* 1447 (1999) 113-118.
- [122] Q.A. Sun, Y. Wu, F. Zappacosta, K.T. Jeang, B.J. Lee, D.L. Hatfield, V.N. Gladyshev, Redox regulation of cell signaling by selenocysteine in mammalian thioredoxin reductases, *J. Biol. Chem.* 274 (1999) 24522–24530.
- [123] Q.A. Sun, I. Kirnarsky, S. Sherman, V.N. Gladyshev, Selenoprotein oxidoreductase with specificity for thioredoxin and glutathione systems, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98 (2001) 3673–3678.

- [124] S.M. Kanzok, A. Fechner, H. Bauer, J.K. Ulschmid, H.M. Muller, J. Botella-Munoz, S. Schneuwly, R. Schirmer, K. Becker, Substitution of the thioredoxin system for glutathione reductase in *Drosophila melanogaster*, *Science* 291 (2001) 643–646.
- [125] L. Zhong, E.S. Arner, J. Ljung, F. Aslund, A. Holmgren, Rat and calf thioredoxin reductase are homologous to glutathione reductase with a carboxyl-terminal elongation containing a conserved catalytically active penultimate selenocysteine residue, *J. Biol. Chem.* 273 (1998) 8581–8591.
- [126] K. Fritz-Wolf, S. Urig, K. Becker, The structure of human thioredoxin reductase 1 provides insights into C-terminal rearrangements during catalysis, *J. Mol. Biol.* 370 (2007) 116–127.
- [127] L. Zhong, A. Holmgren, Essential role of selenium in the catalytic activities of mammalian thioredoxin reductase revealed by characterization of recombinant enzymes with selenocysteine mutations, *J. Biol. Chem.* 275 (2000) 18121–18128.
- [128] M. Bjornstedt, M. Hamberg, S. Kumar, J. Xue, A. Holmgren, Human thioredoxin reductase directly reduces lipid hydroperoxides by NADPH and selenocystine strongly stimulates the reaction via catalytically generated selenols, *J. Biol. Chem.* 270 (1995) 11761–11764.
- [129] A.P. Fernandes, A. Holmgren, Glutaredoxins: glutathione-dependent redox enzymes with functions far beyond a simple thioredoxin backup system, *Antioxid. Redox Signal.* 6 (2004) 63–74.
- [130] M. Lundberg, C. Johansson, J. Chandra, M. Enoksson, G. Jacobsson, J. Ljung, M. Johansson, A. Holmgren, Cloning and expression of a novel human glutaredoxin (Grx2) with mitochondrial and nuclear isoforms, *J. Biol. Chem.* 276 (2001) 26269–26275.
- [131] R.A. Wingert, J.L. Galloway, B. Barut, H. Foott, P. Fraenkel, J.L. Axe, G.J. Weber, K. Dooley, A.J. Davidson, B. Schmid, B.H. Paw, G.C. Shaw, P. Kingsley, J. Palis, H. Schubert, O. Chen, J. Kaplan, L.I. Zon, Deficiency of glutaredoxin 5 reveals Fe-S clusters are required for vertebrate haem synthesis, *Nature* 436 (2005) 1035–1039.
- [132] C. Berndt, C. Hudemann, E.M. Hanschmann, R. Axelsson, A. Holmgren, C.H. Lillig, How does iron-sulfur cluster coordination regulate the activity of human glutaredoxin 2? *Antioxid. Redox Signal.* 9 (2007) 151–157.
- [133] M. Deponte, S. Urig, L.D. Arscott, K. Fritz-Wolf, R. Reau, C. Herold-Mende, S. Koncarevic, M. Meyer, E. Davioud-Charvet, D.P. Ballou, C.H. Williams Jr., K. Becker, Mechanistic studies on a novel, highly potent gold-phosphole inhibitor of human glutathione reductase, *J. Biol. Chem.* 280 (2005) 20628–20637.

- [134] P.A. Karplus, G.E. Schulz, Substrate binding and catalysis by glutathione reductase as derived from refined enzyme: substrate crystal structures at 2 Å resolution, *J. Mol. Biol.* 210 (1989) 163–180.
- [135] G.E. Schulz, R.H. Schirmer, W. Sachsenheimer, E.F. Pai, The structure of the flavoenzyme glutathione reductase, *Nature* 273 (1978) 120–124.
- [136] S.J. Padayatty, A. Katz, Y. Wang, P. Eck, O. Kwon, J.H. Lee, S. Chen, C. Corpe, A. Dutta, S.K. Dutta, M. Levine, Vitamin C as an antioxidant: evaluation of its role in disease prevention, *J. Am. Coll. Nutr.* 22 (2003) 18-35.
- [137] S. Shigeoka, T. Ishikawa, M. Tamoi, Y. Miyagawa, T. Takeda, Y. Yabuta, K. Yoshimura, Regulation and function of ascorbate peroxidase isoenzymes, *J. Exp. Bot.* 53(2002) 1305-1319.
- [138] E. Herrera, C. Barbas, Vitamin E: Action, metabolism and perspectives, *J. Physiol. Biochem.* 57 (2001) 43–56.
- [139] M.G. Traber, J. Atkinson, Vitamin E, antioxidant and nothing more, *Free Radic. Biol. Med.* 43(2007) 4–15.
- [140] M. Freitas, J.L. Lima, E. Fernandes, Optical probes for detection and quantification of neutrophils' oxidative burst. A review, *Anal. Chim. Acta.* 649 (2009) 8-23.
- [141] G. Bartosz, Use of spectroscopic probes for detection of reactive oxygen species, *Clin. Chim. Acta.* 368 (2006) 53-76.
- [142] R.E. Schopf, J. Mattar, W. Meyenburg, O. Scheiner, K.P. Hammann, E.M. Lemmel, Measurement of the respiratory burst in human monocytes and polymorphonuclear leukocytes by nitro blue tetrazolium reduction and chemiluminescence, *J Immunol Methods*, 67 (1984) 109-117.
- [143] A. Gomes, E. Fernandes, J.L. Lima, Fluorescence probes used for detection of reactive oxygen species, *J. Biochem. Biophys. Methods* 65 (2005) 45-80.
- [144] J.G. Mohanty, J.S. Jaffe, E.S. Schulman, D.G. Raible, A highly sensitive fluorescent micro-assay of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> release from activated human leukocytes using a dihydroxyphenoxazine derivative, *J. Immunol. Methods* 202 (1997) 133-141.
- [145] J.P. Crow, Dichlorodihydrofluorescein and dihydrorhodamine 123 are sensitive indicators of peroxynitrite in vitro: implications for intracellular measurement of reactive nitrogen and oxygen species, *Nitric Oxide* 1 (1997) 145–157.
- [146] N.W. Kooy, J.A. Royall, H. Ischiropoulos, J.S. Beckman, Peroxynitrite-mediated oxidation of dihydrorhodamine 123, *Free Radic. Biol. Med.* 16 (1994) 149–156.
- [147] E.W. Miller, O. Tulyathan, E.Y. Isacoff, C.J. Chang, Molecular imaging of hydrogen peroxide produced for cell signaling, *Nat. Chem. Biol.* 3 (2007) 263-267.

- [148] S.G. Rhee, T.S. Chang, W. Jeong, D. Kang, Methods for detection and measurement of hydrogen peroxide inside and outside of cells, *Mol. Cells* 29 (2010) 539-549.
- [149] H. Zhao, S. Kalivendi, H. Zhang, J. Joseph, K. Nithipatikom, J. Vásquez-Vivar, B. Kalyanaraman, Superoxide reacts with hydroethidine but forms a fluorescent product that is distinctly different from ethidium: potential implications in intracellular fluorescence detection of superoxide, *Free Radic. Biol. Med.* 34 (2003) 1359-1368.
- [150] K. Setsukinai, Y. Urano, K. Kakinuma, H.J. Majima, T. Nagano, Development of novel fluorescence probes that can reliably detect reactive oxygen species and distinguish specific species, *J. Biol. Chem.* 278 (2003) 3170–3175.
- [151] Y. Li, H. Zhu, M.A. Trush, Detection of mitochondria-derived reactive oxygen species production by the chemilumigenic probes lucigenin and luminol, *Biochim. Biophys. Acta* 1428 (1999) 1-12.
- [152] R.C. Allen, Phagocytic leukocyte oxygenation activities and chemiluminescence: a kinetic approach to analysis, *Methods Enzymol.* 133 (1986) 449-493.
- [153] W. Ying, NAD<sup>+</sup> and NADH in cellular functions and cell death, *Front. Biosci.* 11 (2006) 3129 -3148.
- [154] C.C. Alano, W. Ying, R.A. Swanson, Poly(ADP-ribose) polymerase-1-mediated cell death in astrocytes requires NAD<sup>+</sup> depletion and mitochondrial permeability transition, *J. Biol. Chem.* 279 (2004) 18895-18902.
- [155] C.C. Alano, P. Garnier, W. Ying, Y. Higashi, T.M. Kauppinen, R.A. Swanson, NAD<sup>+</sup> depletion is necessary and sufficient for poly(ADP-ribose) polymerase-1-mediated neuronal death, *J. Neurosci.* 30 (2010) 2967-2978.
- [156] J. Rutter, M. Reick, L.C. Wu, S.L. McKnight, Regulation of clock and NPAS2 DNA binding by the redox state of NAD cofactors, *Science* 293 (2001) 510-514.
- [157] M. Ziegler, New functions of a long-known molecule. Emerging roles of NAD in cellular signaling, *Eur. J. Biochem.* 267 (2000) 1550-1564.
- [158] A. Lehninger, D.L. Nelson, M.M. Cox, *Lehninger Principles of Biochemistry* (5th ed.), Freeman 2008.
- [159] R.L. Veech, L.V. Eggleston, H.A. Krebs, The redox state of free nicotinamideadenine dinucleotide phosphate in the cytoplasm of rat liver, *Biochem. J.* 115 (1969) 609-619.
- [160] M. Stubbs, R.L. Veech, H.A. Krebs, Control of the redox state of the nicotinamide-adenine dinucleotide couple in rat liver cytoplasm, *Biochem. J.* 126 (1972) 59-65.
- [161] Р. Марри, Д. Греннер, П. Мейес, В. Родуэлл. Биохимия человека. Издательство "МИР", Москва, том 1, (2004).

- [162] G. Magni, A. Amici, M. Emanuelli, G. Orsomando, N. Raffaelli, S. Ruggieri, Enzymology of NAD<sup>+</sup> homeostasis in man, *Cell Mol. Life Sci.* 61(2004) 19-34.
- [163] F. Berger, C. Lau, M. Dahlmann, M. Ziegler, Subcellular compartmentation and differential catalytic properties of the three human nicotinamide mononucleotide adenylyltransferase isoforms, *J. Biol. Chem.* 280 (2005) 36334-36341.
- [164] N. Raffaelli, L. Sorci, A. Amici, M. Emanuelli, F. Mazzola, G. Magni, Identification of a novel human nicotinamide mononucleotide adenylyltransferase, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 297 (2002) 835-840.
- [165] M. Schweiger, K. Hennig, F. Lerner, M. Niere, M. Hirsch-Kauffmann, T. Specht, C. Weise, S. L. Oei, M. Ziegler, Characterization of recombinant human nicotinamide mononucleotide adenylyl transferase (NMNAT), a nuclear enzyme essential for NAD synthesis. *FEBS Lett.* 492 (2001) 95-100.
- [166] D. D'Amours, S. Desnoyers, I. D'Silva, G. G. Poirier, Poly(ADP-ribosyl)ation reactions in the regulation of nuclear functions, *Biochem. J.* 342 (1999) 249-268.
- [167] M.C. McKenna, H. S. Waagepetersen, A. Schousboe, U. Sonnewald, Neuronal and astrocytic shuttle mechanisms for cytosolic-mitochondrial transfer of reducing equivalents: Current evidence and pharmacological tools, *Biochem. Pharmacol.* 71 (2006) 399-407.
- [168] H.S. Waagepetersen, H. Qu, A. Schousboe, U. Sonnewald, Elucidation of the quantitative significance of pyruvate carboxylation in cultured cerebellar neurons and astrocytes, *J. Neurosci. Res.* 66 (2001) 763-770.
- [169] S.L. Bruzzone, L. Guida, E. Zocchi, L. Franco, A. De Flora, Connexin 43 hemichannels mediate Ca<sup>2+</sup>-regulated transmembrane NAD<sup>+</sup> fluxes in intact cells, *FASEB J.* 15 (2001) 10-12.
- [170] C. Verderio, S. Bruzzone, E. Zocchi, E. Fedele, U. Schenk, A. De Flora, M. Matteoli, Evidence of a role for cyclic ADP-ribose in calcium signalling and neurotransmitter release in cultured astrocytes, *J. Neurochem.* 78 (2001) 646-657.
- [171] W. Ying, P. Garnier, R. A. Swanson, NAD<sup>+</sup> repletion prevents PARP-1-induced glycolytic blockade and cell death in cultured mouse astrocytes, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 308 (2003) 809-813.
- [172] K. Zhu, R. A. Swanson, W. Ying, NADH can enter into astrocytes and block poly(ADP-ribose) polymerase-1- mediated astrocyte death, *Neuroreport* 16 (2005) 1209-1212.
- [173] V. J. Starai, I. Celic, R. N. Cole, J. D. Boeke, J. C. Escalante-Semerena, Sir2-dependent activation of acetyl-CoA synthetase by deacetylation of active lysine, *Science* 298 (2002) 2390-2392.

- [174] J. T. Rodgers, C. Lerin, W. Haas, S. P. Gygi, B. M. Spiegelman, P. Puigserver, Nutrient control of glucose homeostasis through a complex of PGC-1 $\alpha$  and SIRT1, *Nature*, 434 (2005), 113-118.
- [175] M. Zoratti, I. Szabo, The mitochondrial permeability transition, *Biochim. Biophys. Acta.* 1241 (1995) 139-176.
- [176] D. R. Green, J. C. Reed, Mitochondria and apoptosis, *Science*, 281 (1998) 1309-1312.
- [177] N. Pollak, C. Dolle, M. Ziegler, The power to reduce: pyridine nucleotides – small molecules with a multitude of functions, *Biochem. J.* 402 (2007) 205–218.
- [178] M. Kaerberlein, M. McVey, L. Guarente, The SIR2/3/4 complex and SIR2 alone promote longevity in *Saccharomyces cerevisiae* by two different mechanisms, *Genes. Dev.* 13 (1999) 2570-2580.
- [179] W. Ying, NAD<sup>+</sup> and NADH in brain functions, brain diseases and brain aging, *Front. Biosci.* 12 (2007) 1863-1888.
- [180] G. Blander, L. Guarente, The Sir2 family of protein deacetylases, *Annu. Rev. Biochem.* 73 (2004) 417-435.
- [181] A. Smogorzewska, T. de Lange, Regulation of telomerase by telomeric proteins, *Annu. Rev. Biochem.* 73 (2004) 177-208.
- [182] K. Grube, A. Burkle. Poly(ADP-ribose) polymerase activity in mononuclear leukocytes of 13 mammalian species correlates with species-specific life span, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89 (1992) 11759-11763.
- [183] A. Burkle, J. Diefenbach, C. Brabeck, S. Beneke, Ageing and PARP, *Pharmacol. Res.* 52 (2005) 93-99.
- [184] M. J. Eliasson, K. Sampei, A. S. Mandir, P. D. Hurn, R. J. Traystman, J. Bao, A. Pieper, Z. Q. Wang, T. M. Dawson, S. H. Snyder, V. L. Dawson, Poly(ADP-ribose) polymerase gene disruption renders mice resistant to cerebral ischemia, *Nat. Med.* 3 (1997) 1089-1095.
- [185] P. Narasimhan, M. Fujimura, N. Noshita, P. H. Chan, Role of superoxide in poly(ADP-ribose) polymerase upregulation after transient cerebral ischemia, *Brain. Res. Mol. Brain. Res.* 113 (2003) 28-36.
- [186] T. Tokime, K. Nozaki, T. Sugino, H. Kikuchi, N. Hashimoto, K. Ueda, Enhanced poly(ADP-ribosyl)ation after focal ischemia in rat brain, *J. Cereb. Blood. Flow. Metab.* 18 (1998) 991-997.
- [187] M. Endres, Z. Q. Wang, S. Namura, C. Waeber, M. A. Moskowitz, Ischemic brain injury is mediated by the activation of poly(ADP-ribose)polymerase, *J. Cereb. Blood. Flow. Metab.* 17 (1997) 1143-1151.

- [188] M.C. LaPlaca, J. Zhang, R. Raghupathi, J.H. Li, F. Smith, F.M. Bareyre, S.H. Snyder, D.I. Graham, T.K. McIntosh, Pharmacologic inhibition of poly(ADP-ribose) polymerase is neuroprotective following traumatic brain injury in rats. *J. Neurotrauma*. 18 (2001) 369-376.
- [189] A.A. Pieper, D.J. Brat, D.K. Krug, C.C. Watkins, A. Gupta, S. Blackshaw, A. Verma, Z. Q. Wang, S.H. Snyder, Poly(ADP-ribose) polymerase-deficient mice are protected from streptozotocin-induced diabetes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 96 (1999) 3059-3064.
- [190] S.W. Suh, K. Aoyama, Y. Chen, P. Garnier, Y. Matsumori, E. Gum, J. Liu, R.A. Swanson, Hypoglycemic neuronal death and cognitive impairment are prevented by poly(ADP-ribose) polymerase inhibitors administered after hypoglycemia, *J. Neurosci*. 23 (2003) 10681-10690.
- [191] L. Davidovic, M. Vodenicharov, E.B. Affar, G.G. Poirier, Importance of poly(ADP-ribose) glycohydrolase in the control of poly(ADP-ribose) metabolism, *Exp. Cell. Res.* 268 (2001) 7-13.
- [192] L. Rossi, M. Denegri, M. Torti, G.G. Poirier, A. I. Scovassi, Poly(ADP-ribose) degradation by postnuclear extracts from human cells, *Biochimie* 84 (2002) 1229-1235.
- [193] A.H. Guse, Second messenger function and the structure-activity relationship of cyclic adenosine diphosphoribose (cADPR), *FEBS J.* 272 (2005) 4590-4597.
- [194] H.C. Lee, Multiplicity of Ca<sup>2+</sup> messengers and Ca<sup>2+</sup> stores: a perspective from cyclic ADP-ribose and NAADP, *Curr. Mol. Med.* 4 (2004) 227-237.
- [195] H.C. Lee, T.F. Walseth, G.T. Bratt, R.N. Hayes, D.L. Clapper, Structural determination of a cyclic metabolite of NAD<sup>+</sup> with intracellular Ca<sup>2+</sup> mobilizing activity, *J. Biol. Chem.* 264 (1989) 1608—1615.
- [196] M. Kolisek, A. Beck, A. Fleig, R. Penner, Cyclic ADPribose and hydrogen peroxide synergize with ADP-ribose in the activation of TRPM2 channels, *Mol. Cell* 18 (2005) 61-69.
- [197] F.J. Kuhn, I. Heiner, A. Luckhoff, TRPM2: a calcium influx pathway regulated by oxidative stress and the novel second messenger ADP-ribose, *Pflugers Arch.* 451 (2005) 212-219.
- [198] A. Gasser, G. Glassmeier, R. Fliegert, M.F. Langhorst, S. Meinke, D. Hein, S. Kruger, K. Weber, I. Heiner, N. Oppenheimer, J. R. Schwarz, A. H. Guse, Activation of T cell calcium influx by the second messenger ADP-ribose, *J. Biol. Chem.* 281 (2006) 2489-2496.
- [199] O. Grubisha, L.A. Rafty, C.L. Takanishi, X. Xu, L. Tong, A.L. Perraud, A.M. Scharenberg, J.M. Denu, Metabolite of SIR2 reaction modulates TRPM2 ion channel, *J. Biol. Chem.* 281(2006) 14057-14065.
- [200] D. Corda, M. Di Girolamo, Functional aspects of protein mono-ADP-ribosylation, *EMBO J.* 22 (2003) 1953-1958.

- [201] M. Di Girolamo, N. Dani, A. Stilla, D. Corda, Physiological relevance of the endogenous mono(ADP-ribose)ylation of cellular proteins. *FEBS J.* 272 (2005) 4565-4575.
- [202] F. Aswad, H. Kawamura, G. Dennert, High sensitivity of CD4+CD25+ regulatory T cells to extracellular metabolites nicotinamide adenine dinucleotide and ATP: a role for P2X7 receptors, *J. Immunol.* 175 (2005) 3075-3083.
- [203] R. A. North, E. A. Barnard. Nucleotide receptors. *Curr. Opin. Neurobiol.* 7 (1997) 346-357.
- [204] J.M. Lee, G. J. Zipfel, D.W. Choi, The changing landscape of ischaemic brain injury mechanisms, *Nature* 399 (1999) 7-14.
- [205] H.C. Lee, Multiplicity of Ca<sup>2+</sup> messengers and Ca<sup>2+</sup> stores: a perspective from cyclic ADP-ribose and NAADP, *Curr. Mol. Med.* 4 (2004) 227-237.
- [206] E. Brailoiu, D. Churamani, X. Cai, M.G. Schrlau, G.C. Brailoiu, X. Gao, R. Hooper, M.J. Boulware, N.J. Dun, J.S. Marchant, S. Patel, Essential requirement for two-pore channel 1 in NAADP-mediated calcium signaling, *J. Cell Biol.* 186 (2009) 201-209.
- [207] E. Brailoiu, R. Hooper, X. Cai, G.C. Brailoiu, M.V. Keebler, N.J. Dun, J.S. Marchant, S. Patel, An ancestral deuterostome family of two-pore channels mediates nicotinic acid adenine dinucleotide phosphate-dependent calcium release from acidic organelles, *J. Biol. Chem.* 285 (2010) 2897-2901.
- [208] A.I. Kaplin, S.H. Snyder, D.J. Linden, Reduced nicotinamide adenine dinucleotide-selective stimulation of inositol 1,4,5-trisphosphate receptors mediates hypoxic mobilization of calcium. *J. Neurosci.* 16 (1996) 2002-2011.
- [209] A.V. Zima, J.A. Copello, L.A. Blatter, Differential modulation of cardiac and skeletal muscle ryanodine receptors by NADH, *FEBS Lett.* 547 (2003) 32-36.
- [210] A. V. Zima, J.A. Copello, L.A. Blatter, Effects of cytosolic NADH/NAD<sup>+</sup> levels on sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> release in permeabilized rat ventricular myocytes. *J. Physiol.* 555 (2004) 727-741.
- [211] Q. Zhang, D.W. Piston, R.H. Goodman, Regulation of corepressor function by nuclear NADH, *Science* 295 (2002) 1895-1897.
- [212] J. Rutter, M. Reick, L.C. Wu, S.L. McKnight, Regulation of clock and NPAS2 DNA binding by the redox state of NAD cofactors, *Science*, 293 (2001) 510-514.
- [213] S. Bruzzone, L. Guida, E. Zocchi, L. Franco, A. De Flora, Connexin 43 hemi channels mediate Ca<sup>2+</sup>-regulated transmembrane NAD<sup>+</sup> fluxes in intact cells, *FASEB J.* 15 (2001) 10-12.
- [214] T. Patschkowski, D.M. Bates, P.J. Kiley, Mechanisms for sensing and responding to oxygen deprivation in Bacterial Stress Responses, Washington, ASM Press 2000.

- [215] P.A. Jordan, A.J. Thomson, E.T. Ralph, J.R. Guest, J. Green, FNR is a direct oxygen sensor having a biphasic response curve, *FEBS Lett.* 416 (1997) 349–352.
- [216] W. Zhang, G.N. Jr Phillips, Structure of the oxygen sensor in *Bacillus subtilis*: signal transduction of chemotaxis by control of symmetry, *Structure* 11 (2003) 1097–1110.
- [217] D. Brekasis, M.S.B. Paget, A novel sensor of NADH/NAD<sup>+</sup> redox poise in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *EMBO J.* 22 (2003) 4856–4865.
- [218] E. A. Sickmier, D. Brekasis, S. Paranawithana, J.B. Bonanno, M.S.B. Paget, S.K. Burley, C.L. Kielkopf, X-Ray structure of a Rex-family repressor/NADH complex insights into the mechanism of redox sensing. *Structure* 13 (2005) 43–54.
- [219] J.K. McLaughlin, C.M. Strain-Damerell, K. Xie, D. Brekasis, A.S. Soares, M.S.B. Paget, C.L. Kielkopf, Structural basis for NADH/NAD<sup>+</sup> redox sensing by a Rex family repressor, *Mol. Cell* 38 (2010) 563–575.
- [220] E. Wang, M.C. Bauer, A. Rogstam, S. Linse, D.T. Logan, C. Wachenfeldt, Structure and functional properties of the *Bacillus subtilis* transcriptional repressor Rex. *Mol. Microbiol.* 69(2008) 466–478.
- [221] O.H. Lowry, J.V. Passonneau, D.W. Schulz, M.K. Rock, The measurement of pyridine nucleotides by enzymatic cycling, *J. Biol. Chem.* 236 (1961) 2746-2755.
- [222]. C.R. Zerez, S.J. Lee, K.R. Tanaka, Spectrophotometric determination of oxidized and reduced pyridine nucleotides in erythrocytes using a single extraction procedure, *Anal. Biochem.* 164 (1987) 367-373.
- [223] W. Xie, A. Xu, E.S. Yeung, Determination of NAD(+) and NADH in a single cell under hydrogen peroxide stress by capillary electrophoresis, *Anal. Chem.* 81 (2009) 1280-1284.
- [224]. W. Denk, J.H. Stricker, W.W Webb, Two-photon laser scanning fluorescence microscopy, *Science.* 248 (1990) 73-76.
- [225] H. Schneckenburger, M. Wagner, P. Weber, W.S. Strauss, R. Sailer, Autofluorescence lifetime imaging of cultivated cells using a UV picosecond laser diode, *J. Fluoresc.* 14 (2004) 649–654.
- [226] S. Huang, A.A. Heikal, W.W. Webb, Two-photon fluorescence spectroscopy and microscopy of NAD(P)H and flavoprotein, *Biophys. J.* 82 (2002) 2811–2825.
- [227] G.H. Patterson, S.M. Knobel, P. Arkhammar, O. Thastrup, D.W. Piston, Separation of the glucose-stimulated cytoplasmic and mitochondrial NAD(P)H responses in pancreatic islet beta cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97 (2000) 5203–5207.
- [228] K.A. Kasischke, H.D. Vishwasrao, P.J. Fisher, W.R. Zipfel, W.W. Webb, Neural activity triggers neuronal oxidative metabolism followed by astrocytic glycolysis, *Science* 305 (2004) 99–103.

- [229] Q. Yu, A.A. Heikal, Two-photon autofluorescence dynamics imaging reveals sensitivity of intracellular NADH concentration and conformation to cell physiology at the single-cell level, *J. Photochem. Photobiol. B.* 95 (2009) 46–57.
- [230] S. Lisby, R. Gniadecki, H.C. Wulf, UV-induced DNA damage in human keratinocytes: quantitation and correlation with long-term survival, *Exp. Dermatol.* 14 (2005) 349–355.
- [231] R. Gniadecki, T. Thorn, J. Vicanova, A. Petersen, H.C. Wulf, Role of mitochondria in ultraviolet-induced oxidative stress, *J. Cell Biochem.* 80 (2000) 216–222.
- [232] A. Hopt, E. Neher, Highly nonlinear photodamage in two-photon fluorescence microscopy, *Biophys. J.* 80 (2001) 2029–2036.
- [233] G.H. Patterson, D.W. Piston, Photobleaching in two-photon excitation microscopy, *Biophys. J.* 78 (2000) 2159–2162.
- [234] P.D. Reiss, P.F. Zuurendonk, R.L. Veech, Measurement of tissue purine, pyrimidine, and other nucleotides by radial compression high-performance liquid chromatography, *Anal. Biochem.* 140 (1984) 162–171.
- [235] W. Ying, NAD<sup>+</sup>/NADH and NADP<sup>+</sup>/NADPH in cellular functions and cell death: regulation and biological consequences, *Antioxid. Redox Signal.* 10 (2008) 179–206.
- [236] F. Lerner, M. Niere, A. Ludwig, M. Ziegler, Structural and functional characterization of human NAD kinase, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 288 (2001) 69–74.
- [237] J.B. Jackson, Proton translocation by transhydrogenase, *FEBS Lett.* 555 (2003) 176–177.
- [238] J. Rydstrom, Mitochondrial NADPH, transhydrogenase and disease, *Biochim. Biophys. Acta.* 1757 (2006) 721–726.
- [239] M. Deponte, Glutathione catalysis and the reaction mechanisms of glutathione-dependent enzymes, *Biochim. Biophys. Acta.* 1830 (2013) 3217–3266.
- [240] O. Shimomura, F.H. Johnson, Y. Saiga. Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusan, *Aequorea*, *J. Cell. Comp. Physiol.* 59 (1962) 223–239.
- [241] D.C. Prasher, V.K. Eckenrode, W.W. Ward, F.G. Prendergast, M.J. Cormier, Primary structure of the *Aequorea victoria* green-fluorescent protein, *Gene.* 111 (1992) 229–233.
- [242] R.Y. Tsien, The green fluorescent protein, *Annu. Rev. Biochem.* 67 (1998) 509–544.
- [243] M. Zimmer, Green fluorescent protein (GFP): applications, structure, and related photophysical behavior, *Chem. Rev.* 102 (2002) 759–781.
- [244] D.M. Chudakov, M.V. Matz, S. Lukyanov, K.A. Lukyanov, Fluorescent proteins and their applications in imaging living cells and tissues, *Physiol. Rev.* 90 (2010) 1103–1163.

- [245] M. Ormo, A.B. Cubitt, K. Kallio, L.A. Gross, R.Y. Tsien, S.J. Remington, Crystal structure of the *Aequorea victoria* green fluorescent protein, *Science* 273 (1996) 1392-1395.
- [246] D.P. Barondeau, C.D. Putnam, C.J. Kassmann, J.A. Tainer, E.D. Getzoff, Mechanism and energetics of green fluorescent protein chromophore synthesis revealed by trapped intermediate structures, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100 (2003) 12111-12116.
- [247] D.P. Barondeau, J.A. Tainer, E.D. Getzoff, Structural evidence for an enolate intermediate in GFP fluorophore biosynthesis, *J. Am. Chem. Soc.* 128 (2006) 3166-3168.
- [248] H. Niwa, S. Inouye, T. Hirano, T. Matsuno, S. Kojima, M. Kubota, M. Ohashi, F.I. Tsuji, Chemical nature of the light emitter of the *Aequorea* green fluorescent protein, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93 (1996) 13617-13622.
- [249] C.W. Cody, D.C. Prasher, W.W. Wester, F.G. Prendergast, W.W. Ward, Chemical structure of the hexapeptide chromophore of the *Aequorea* green-fluorescent protein, *Biochemistry* 32 (1993) 1212—1218.
- [250] R. Heim, D.C. Prasher, R.Y. Tsien, Wavelength mutations and posttranslational autoxidation of green fluorescent protein, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 91 (1994) 12501—12504.
- [251] M. Kondo, I.A. Heisler, D. Stoner-Ma, P.J. Tonge, S.R. Meech, Ultrafast dynamics of protein proton transfer on short hydrogen bond potential energy surfaces: S65T/H148D GFP, *J. Am. Chem. Soc.* 132 (2010) 1452-1453.
- [252] S.R. Meech, Excited state reactions in fluorescent proteins, *Chem. Soc. Rev.* 38 (2009) 2922-2934.
- [253] S.J. Remington, Fluorescent proteins: maturation, photochemistry and photophysics, *Curr. Opin. Struct. Biol.* 16 (2006) 714-721.
- [254] R. Bizzarri, C. Arcangeli, D. Arosio, F. Ricci, P. Faraci, F. Cardarelli, F. Beltram, Development of a novel GFP-based ratiometric excitation and emission pH indicator for intracellular studies, *Biophys. J.* 90 (2006) 3300-3314.
- [255] G.T. Hanson, T.B. McAnaney, E.S. Park, M.E. Rendell, D.K. Yarbrough, S. Chu, L. Xi, S.G. Boxer, M.H. Montrose, S.J. Remington, Green fluorescent protein variants as ratiometric dual emission pH sensors. 1. Structural characterization and preliminary application, *Biochemistry.* 41 (2002) 15477-15488.
- [256] R. Bizzarri, M. Serresi, S. Luin, F. Beltram, Green fluorescent protein based pH indicators for in vivo use: a review, *Anal. Bioanal. Chem.* 393 (2009) 1107-1122.
- [257] J. Llopis, J.M. McCaffery, A. Miyawaki, M.G. Farquhar, R.Y. Tsien, Measurement of cytosolic, mitochondrial, and Golgi pH in single living cells with green fluorescent proteins, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95 (1998) 6803-6808.

- [258] S. Jayaraman, P. Haggie, R.M. Wachter, S.J. Remington, A.S. Verkman, Mechanism and cellular applications of a green fluorescent protein-based halide sensor, *J. Biol. Chem.* 275 (2000) 6047-6050.
- [259] L.J. Galletta, P.M. Haggie, A.S. Verkman, Green fluorescent protein-based halide indicators with improved chloride and iodide affinities, *FEBS Lett.* 499 (2001) 220-224.
- [260] T. Forster, Zwischenmolekulare Energiewanderung und Fluoreszenz, *Ann. Phys.* 437 (1948) 55-75.
- [261] A. Periasamy. Fluorescence resonance energy transfer microscopy: a mini review. *J. Biomed. Opt.* 6 (2001) 287-291.
- [262] A. Miyawaki, J. Llopis, R. Heim, J.M. McCaffery, J.A. Adams, M. Ikura, R.Y. Tsien, Fluorescent indicators for Ca<sup>2+</sup> based on green fluorescent proteins and calmodulin, *Nature*, 388 (1997) 882-887.
- [263] M. Zaccolo, F. De Giorgi, C.Y. Cho, L. Feng, T. Knapp, P.A. Negulescu, S.S. Taylor, R.Y. Tsien, T. Pozzan, A genetically encoded, fluorescent indicator for cyclic AMP in living cells, *Nat. Cell. Biol.* 2 (2000) 25-29.
- [264] M. Zaccolo, T. Pozzan, Discrete microdomains with high concentration of cAMP in stimulated rat neonatal cardiac myocytes, *Science* 295 (2002) 1711-1715.
- [265] J.L. Bos, Epac proteins: multi-purpose cAMP targets, *Trends Biochem. Sci.* 31 (2006) 680-686.
- [266] V.O. Nikolaev, M. Bunemann, L. Hein, A. Hannawacker, M.J. Lohse, Novel single chain cAMP sensors for receptor-induced signal propagation, *J. Biol. Chem.* 279 (2004) 37215-37218.
- [267] L.M. DiPilato, X. Cheng, J. Zhang, Fluorescent indicators of cAMP and Epac activation reveal differential dynamics of cAMP signaling within discrete subcellular compartments, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101 (2004) 16513-16518.
- [268] L.M. DiPilato, J. Zhang, The role of membrane microdomains in shaping beta<sub>2</sub>-adrenergic receptor-mediated cAMP dynamics, *Mol Biosyst.* 5 (2009) 832-837.
- [269] Q. Ni, D.V. Titov, J. Zhang, Analyzing protein kinase dynamics in living cells with FRET reporters, *Methods* 40 (2006) 279-286.
- [270] X. Xu, A.L. Gerard, B.C. Huang, D.C. Anderson, D.G. Payan, Y. Luo, Detection of programmed cell death using fluorescence energy transfer, *Nucleic. Acids. Res.* 26 (1998) 2034-2035.
- [271] G.S. Baird, D.A. Zacharias, R.Y. Tsien, Circular permutation and receptor insertion within green fluorescent proteins, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96 (1999) 11241-11246.

- [272] T. Nagai, A. Sawano, E.S. Park, A. Miyawaki, Circularly permuted green fluorescent proteins engineered to sense Ca<sup>2+</sup>, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98 (2001) 3197-3202.
- [273] J. Nakai, M. Ohkura, K. Imoto, A high signal-to-noise Ca(2+) probe composed of a single green fluorescent protein, *Nat. Biotechnol.* 19 (2001) 137-141.
- [274] T. Nagai, A. Sawano, E.S. Park, A. Miyawaki, Circularly permuted green fluorescent proteins engineered to sense Ca<sup>2+</sup>, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98 (2001) 3197-3202.
- [275] Y. Zhao, S. Araki, J. Wu, T. Teramoto, Y.F. Chang, M. Nakano, A.S. Abdelfattah, M. Fujiwara, T. Ishihara, T. Nagai, R.E. Campbell, An expanded palette of genetically encoded Ca(2)(+) indicators, *Science* 333 (2011) 1888-1891.
- [276] J. Berg, Y.P. Hung, G. Yellen, A genetically encoded fluorescent reporter of ATP:ADP ratio, *Nat. Methods* 6 (2009) 161-166.
- [277] J. Wang, J. Karpus, B.S. Zhao, Z. Luo, P.R. Chen, C. He, A selective fluorescent probe for carbon monoxide imaging in living cells, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 51 (2012) 9652-9656.
- [278] V.V. Belousov, A.F. Fradkov, K.A. Lukyanov, D.B. Staroverov, K.S. Shakhbazov, A.V. Terskikh, S. Lukyanov, Genetically encoded fluorescent indicator for intracellular hydrogen peroxide, *Nat. Methods* 3 (2006) 281-286.
- [279] H. Ostergaard, A. Henriksen, F.G. Hansen, J.R. Winther, Shedding light on disulfide bond formation: engineering a redox switch in green fluorescent protein, *EMBO J.* 20 (2001) 5853-5862.
- [280] C.T. Dooley, T.M. Dore, G.T. Hanson, W.C. Jackson, S.J. Remington, R.Y. Tsien, Imaging dynamic redox changes in mammalian cells with green fluorescent protein indicators, *J. Biol. Chem.* 279 (2004) 22284-22293.
- [281] G.T. Hanson, R. Aggeler, D. Oglesbee, M. Cannon, R.A. Capaldi, R.Y. Tsien, S.J. Remington, Investigating mitochondrial redox potential with redox-sensitive green fluorescent protein indicators, *J. Biol. Chem.* 279 (2004) 13044-13053.
- [282] M. Gutscher, A.L. Pauleau, L. Marty, T. Brach, G.H. Wabnitz, Y. Samstag, A.J. Meyer, T.P. Dick, Real-time imaging of the intracellular glutathione redox potential, *Nat. Methods* 5 (2008) 553-559.
- [283] M. Gutscher, M.C. Sobotta, G.H. Wabnitz, S. Ballikaya, A.J. Meyer, Y. Samstag, T.P. Dick, Proximity-based protein thiol oxidation by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-scavenging peroxidases, *J. Biol. Chem.* 284 (2009) 31532-31540.
- [284] Y.P. Hung, J.G. Albeck, M. Tantama, G. Yellen, Imaging cytosolic NADH-NAD<sup>+</sup> redox state with a genetically encoded fluorescent biosensor, *Cell Metab.* 14 (2011) 545 – 554.

- [285] Y. Zhao, J. Jin, Q. Hu, H.M. Zhou, J. Yi, Z. Yu, L. Xu, X. Wang, Y. Yang, J. Loscalzo, Genetically encoded fluorescent sensors for intracellular NADH detection, *Cell Metab.* 14 (2011) 555 – 566.
- [286] S.N. Ho, H.D. Hunt, R.M. Horton, J.K. Pullen, L.R. Pease, Site-directed mutagenesis by overlap extension using the polymerase chain reaction, *Gene* 77 (1989) 51-59.
- [287] E.B. Van Munster, T.W.Jr. Gadella, phiFLIM: a new method to avoid aliasing in frequency-domain fluorescence lifetime imaging microscopy, *J. Microsc.* 213 (2004) 29-38.
- [288] K.N. Markvicheva, D.S. Bilan, N.M. Mishina, A.Y. Gorokhovatsky, L.M. Vinokurov, S. Lukyanov, V.V. Belousov, A genetically encoded sensor for H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> with expanded dynamic range, *Bioorg. Med. Chem.* 19 (2011) 1079-1084.
- [289] I. Kullik, M.B. Toledano, L.A. Tartaglia, G. Storz, Mutational analysis of the redox-sensitive transcriptional regulator OxyR: regions important for oxidation and transcriptional activation, *J. Bacteriol.* 177 (1995) 1275-1284.
- [290] I. Kullik, J. Stevens, M.B. Toledano, G. Storz, Mutational analysis of the redox-sensitive transcriptional regulator OxyR: regions important for DNA binding and multimerization, *J. Bacteriol.* 177 (1995) 1285-1291.
- [291] F. Aslund, M. Zheng, J. Beckwith, G. Storz, Regulation of the OxyR transcription factor by hydrogen peroxide and the cellular thiol-disulfide status, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96 (1999) 6161– 6165.
- [292] P. Niethammer, C. Grabher, A.T. Look, T.J. Mitchison, A tissue-scale gradient of hydrogen peroxide mediates rapid wound detection in zebrafish, *Nature* 459 (2009) 996-999.
- [293] L. Pase, J.E. Layton, C. Wittmann, F. Ellett, C.J. Nowell, C.C. Reyes-Aldasoro, S. Varma, K.L. Rogers, C.J. Hall, M.C. Keightley, P.S. Crosier, C. Grabher, J.K. Heath, S.A. Renshaw, G.J. Lieschke, Neutrophil-delivered myeloperoxidase dampens the hydrogen peroxide burst after tissue wounding in zebrafish, *Curr. Biol.* 22 (2012) 1818-1824.
- [294] P.I. Bastiaens, A. Squire, Fluorescence lifetime imaging microscopy: spatial resolution of biochemical processes in the cell, *Trends Cell. Biol.* 9 (1999) 48-52.
- [295] E.B. van Munster, T.W. Gadella, Fluorescence lifetime imaging microscopy (FLIM), *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* 95 (2005) 143-175.
- [296] T. Nakabayashi, H.P. Wang, M. Kinjo, N. Ohta, Application of fluorescence lifetime imaging of enhanced green fluorescent protein to intracellular pH measurements, *Photochem. Photobiol. Sci.* 7 (2008) 668-670.
- [297] B. Liang, H.R. Petty, Imaging neutrophil activation: analysis of the translocation and utilization of NAD(P)H-associated autofluorescence during antibody-dependent target oxidation, *J. Cell. Physiol.* 152 (1992) 145-156.

- [298] L. Pan, X. Zhang, K. Song, B. Tang, W. Cai, X. Wu, R.A. Rupp, J. Xu, Real-time imaging of autofluorescence NAD(P)H in single human neutrophils, *Appl. Opt.* 48 (2009) 1042-1046.
- [299] D.W. Piston, B.R. Masters, W.W. Webb, Three-dimensionally resolved NAD(P)H cellular metabolic redox imaging of the in situ cornea with two-photon excitation laser scanning microscopy, *J. Microsc.* 178 (1995) 20-27.
- [300] J.V. Rocheleau, W.S. Head, D.W. Piston, Quantitative NAD(P)H/flavoprotein autofluorescence imaging reveals metabolic mechanisms of pancreatic islet pyruvate response, *J. Biol. Chem.* 279 (2004) 31780-31787.
- [301] M.W. Slein, *Methods of Enzymatic Analysis*, Academic Press, New York, 1963.
- [302] D. Poburko, J. Santo-Domingo, N. Demaurex, Dynamic regulation of the mitochondrial proton gradient during cytosolic calcium elevations, *J. Biol. Chem.* 286 (2011) 11672-11684.
- [303] R.C. Poole, A.P. Halestrap, Transport of lactate and other monocarboxylates across mammalian plasma membranes, *Am. J. Physiol.* 264 (1993) 761-782.
- [304] A.V. Zima, J. Kockskämper, R. Mejia-Alvarez, L.A. Blatter, Pyruvate modulates cardiac sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> release in rats via mitochondria-dependent and -independent mechanisms, *J. Physiol.* 550 (2003) 765–783.