

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

На правах рукописи

Богданова Юлия Антоновна

**Исследование редокс-зависимых процессов в живых  
системах с помощью хемогенетических инструментов**

Специальность 1.5.3 - «Молекулярная биология»

Диссертация на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Научный руководитель  
д.б.н. Белоусов Всеволод Вадимович

Москва – 2021

## Оглавление

Список сокращений .....	6
Введение.....	9
Актуальность темы исследования и степень ее разработанности .....	9
Цели и задачи.....	10
Научная новизна работы .....	11
Теоретическая и практическая значимость работы.....	12
Апробация результатов .....	13
Глава 1. Обзор литературы.....	15
1.1. Активные формы кислорода .....	15
1.1.1. Виды АФК.....	15
1.1.2. Источники пероксида водорода в клетке .....	17
1.1.3. Антиоксидантные системы .....	23
1.1.4. Транспорт пероксида водорода .....	34
1.2. Пероксид водорода как сигнальная молекула.....	35
1.3. Генераторы АФК.....	39
1.3.1. CALI.....	39
1.3.2. KillerRed и SuperNova.....	41
1.3.3. miniSOG.....	43
1.3.4. Оксидаза D-аминокислот .....	44
1.4. Детекция пероксида водорода .....	47
1.4.1. Методы, основанные на использовании HRP .....	48
1.4.2. Краски на основе бороната .....	49
1.4.3. 2',7'-дихлородигидрофлуоресцин .....	50
1.4.4. Биосенсоры, основанные на roGFP .....	51

1.4.5.	FRET-биосенсоры .....	53
1.4.6.	Семейство биосенсоров НуPer.....	53
2.	Материалы и методы .....	56
2.1.	Материалы .....	56
2.1.1.	ДНК-векторы .....	56
2.1.2.	Реактивы и расходные материалы для молекулярно-биологических работ.....	56
2.1.3.	Бактериальные среды.....	57
2.1.4.	Оборудование и программное обеспечение для молекулярно-биологических работ.....	57
2.1.5.	Эукариотические клеточные линии, культуральные среды и расходные материалы .....	58
2.1.6.	Оборудование для работы с клеточными линиями .....	59
2.1.7.	Оборудование и программное обеспечение для имаджинга....	59
2.1.8.	Соединения, использовавшиеся при имаджинге .....	59
2.2.	Молекулярно-биологические методы.....	59
2.2.1.	Аmplификация ДНК методом полимеразной цепной реакции (ПЦР)	59
2.2.2.	Электрофорез в агарозном геле .....	60
2.2.3.	Рестрикция .....	61
2.2.4.	Лигирование ДНК фрагментов.....	61
2.2.5.	Трансформация методом «heat-shock» химически-компетентных E.coli.....	62
2.2.6.	Электрическая трансформация электрически-компетентных клеток E.coli	62
2.2.7.	Скрининг бактериальных клонов .....	63

2.2.8.	Выделение плазмидной ДНК.....	63
2.2.9.	Получение локализованных в различных клеточных компартаментах конструкторов.....	63
2.2.10.	Получение генетических конструкторов DAAO с измененной субстратной специфичностью .....	65
2.2.11.	Получение конструкторов с NuPer7 .....	65
2.2.12.	Получение конструкторов под кардиомиоцит-специфичным промотором	66
2.3.	Работа с эукариотическими клетками.....	67
2.3.1.	Клеточные культуры HeLa Kyoto и HEK293T и трансфекция.	67
2.3.2.	Проточная цитометрия .....	67
2.3.3.	Микроскопия клеток HeLa Kyoto.....	68
2.3.4.	Ингибиторный анализ.....	68
2.3.5.	Измерение активности TrxR и содержания GSH в клетках, подвергшихся ингибиторному анализу .....	68
2.3.6.	Клеточная культура PC-12 и ее трансфекция .....	69
2.3.7.	Выделение и ведение первичной нейрональной культуры .....	70
2.3.8.	Трансфекция нейрональной культуры.....	71
2.4.	Обработка полученных изображений .....	72
2.4.1.	Анализ изображений.....	72
2.4.2.	Анализ кимографов.....	72
3.	Результаты и обсуждение.....	73
3.1.	Оптимизация хемогенетического генератора H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> для использования в различных живых системах .....	73
3.1.1.	В результате анализа литературы в работе мы использовали RgDAAO	73

3.1.2. Тестирование D-аминокислот как возможных субстратов DAAO в клеточных системах.....	75
3.2. Изучение вклада антиоксидантных систем в ограничении диффузии пероксида водорода.....	80
3.2.1. Создание локализованных в ядре и в цитозоле генераторов H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	81
3.2.2. Локализованная в ядре DAAO позволяет визуализировать ограничение диффузии H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	83
3.2.3. Тиоредоксин играет ключевую роль в ограничении диффузии пероксида водорода.....	87
3.3. Применение DAAO для изменения редокс-статуса нейронов .....	90
3.3.1. С помощью DAAO можно успешно изменять редокс-статус клеток линии PC-12.....	91
3.3.2. DAAO проявляет активность на внутренних субстратах при экспрессии в клетках нейрональной культуры .....	94
3.3.3. Внесение точечной мутации в окружение активного центра DAAO не привело к значительному снижению ее активности в отношении D-серина	97
3.4. Разработка кардиомиоцит-специфичной версии фьюза Нурег-DAAO	99
4. Заключение .....	104
Список литературы .....	107

## Список сокращений

3-AT - 3-amino-1,2,4-triazole, 3-амино-1,2,4-триазол

AQP – aquaporin, аквапорин

ATP - adenosine triphosphate, аденозинтрифосфат

BSO – buthionine sulfoximine, бутионин сульфоксимин

CALI - chromophore-assisted laser or light inactivation, инактивация светом при помощи хромофора

CFP - cyan fluorescent protein, голубой флуоресцентный белок

срmApple – circularly permuted mApple, циклически пермутированный mApple

срYFP – circularly permuted yellow fluorescent protein, циклически пермутированный желтый флуоресцентный белок

DAAO - D-amino-acid oxidase, оксидаза D-аминокислот

DCFH – 2'-7'dichlorofluorescin, 2',7'-дихлородигидрофлуоресцин

DMSO – dimethylsulfoxide, диметилсульфоксид

DUOX - dual oxidase

eCFP – enhanced cyan fluorescent protein, усиленный голубой флуоресцентный белок

eYFP - enhanced yellow fluorescent protein, усиленный желтый флуоресцентный белок

FAD - flavin adenine dinucleotide, флавинадениндинуклеотид окисленный

FADH2 – flavin adenine dinucleotide, флавинадениндинуклеотид восстановленный

FBS – fetal bovine serum, телячья эмбриональная сыворотка крови

FMN - flavin mononucleotide, флавинмононуклеотид

FRET - Förster resonance energy transfer, Фёрстеровский перенос энергии

GAPDH - Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase, глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа

GFP - green fluorescent protein, зеленый флуоресцентный белок

GPx - glutathione peroxidase, глутатионпероксидаза

GSH - глутатион окисленный

GSSG – глутатион восстановленный

GTP – guanosine triphosphate, гуанозинтрифосфат

HBSS - Hanks' balanced salt solution, раствор солей Хэнкса

HRP - horseradish peroxidase, пероксидаза хрена

IMS - intermembrane space, межмембранное пространство митохондрий

LB - Lysogeny broth

LOV-домен - light-oxygen-voltage-sensing domain, свето-кислородо-чувствительный домен

NADPH - nicotinamide-adenine dinucleotide phosphate,  
никотинамидадениндинуклеотидфосфат

HI-HS - Heat-Inactivated Horse Serum, инактивированная нагреванием сыворотка крови лошади

NF-κB - nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells

NOX - NADPH oxidase, НАДФН-оксидаза

NRF2 - nuclear factor erythroid 2-related factor 2

Prx – peroxiredoxin, пероксиредоксин

PTP - protein tyrosine phosphatase, протеин-тирозин фосфатаза

PTS - сигнал пероксисомальной локализации

roGFP - redox-sensitive green fluorescent protein, редокс-чувствительный зеленый флуоресцентный белок

SOB – Super Optimal Broth

SOD - superoxide dismutase, супероксиддисмутаза

ТАЕ буфер - трис-ацетатный буфер

TrxR - thioredoxin reductase, тиоредоксинредуктаза

АФК – активные формы кислорода

ДМЕМ - Модифицированная по способу Дульбекко среда Игла

МЕМ - Minimum Essential Medium, среда Игла

ПЦР – полимеразная цепная реакция

УФ – ультрафиолет

ЭТЦ - электрон-транспортная цепь



## Введение

Актуальность темы исследования и степень ее разработанности

Активные формы кислорода (АФК) – химически активные соединения, содержащие кислород. Термин широко используется в биологии и медицине. На середину 2021 года Web of Science содержал более 161 тысячи записей, включающих название «reactive oxygen species», более 15 тысяч публикаций добавляется в него каждый год, что примерно соответствует скорости в 1 публикацию каждые полчаса. АФК участвуют во множестве клеточных процессов: как акторы редокс-сигналинга, участвующие в тонкой настройке клеточных процессов, а также как агенты патологических процессов, чем и объясняется глубокий интерес к ним научного сообщества.

Одним из подходов в изучении функций АФК является активация их синтеза внутриклеточными источниками. Этот подход часто сопровождается грубым вмешательством в функционирование клетки. Разобщители ЭТЦ митохондрий и активаторы NOX вносят множество изменений в функционирование клетки, не связанных напрямую с действием АФК. Таким образом, существует большая потребность в использовании генераторов АФК, не связанных напрямую с физиологическими процессами клетки. Другим широко распространенным способом изучения функций АФК является добавление внешних АФК или их генераторов в среду для роста или имаджинга клеток. Действие АФК как сигнальных молекул при этом драматически зависит от места их генерации и локального окружения в определенных компартментах клетки.

В лаборатории научного руководителя данной работы был разработан хемогенетический генератор пероксида водорода: фермент на основе оксидазы D-аминокислот дрожжей (DAAO) [190]. Фермент способен к окислительному дезаминированию исключительно D-изомеров аминокислот, что позволяет

говорить об отсутствии его активности в большей части живых систем в отсутствие нехарактерных для эукариотов субстратов, его активность можно регулировать через доступ к субстрату. Также неоспоримым преимуществом ДААО является продукт его реакции – пероксид водорода. Пероксид водорода на данный момент признан основной АФК, участвующей в сигналинге и во многих патологических процессах за счет его способности реагировать с редокс-активными клеточными тиолами, относительной стабильности в клеточных условиях и способности проникать через биологические мембраны [208].

С помощью ДААО уже был проведен ряд работ, демонстрирующих неоспоримые плюсы данного генератора АФК. Например, с ее помощью наблюдали существенную разницу в активации путей фосфорилирования при генерации пероксида водорода в различных клеточных компартментах и при внесении внешнего  $H_2O_2$  [258]. Возможность локализовать ДААО в определенных органеллах не раз использовалась для изучения взаимодействия пулов редокс-активных соединений [274; 283]. Однако авторы данной работы видели огромное поле для применения ДААО в различных живых системах для решения различных вопросов редокс-биологии.

## Цели и задачи

Цель работы:

Расширить область применения хемогенетических генераторов  $H_2O_2$

Задачи:

1. Определить вклад антиоксидантных систем на ограничение диффузии  $H_2O_2$  в клетках Hela Kyoto

2. Расширить инструментарий хемогенетических генераторов
3. Протестировать возможность использовать DAAO для изменения редокс-статуса PC-12 и нейронов
4. Протестировать возможность использования DAAO в кардиомиоцитах, вызвать длительный окислительный стресс *in vivo*

### Научная новизна работы

В ходе данной работы были протестированы различные субстраты оксидазы D-аминокислот, показана возможность использования D-норвалина для генерации пероксида водорода в клетках Hela Kyoto и гиппокампальных нейронах мыши, а также отсутствие явной токсичности у продукта окислительного дезаминирования D-норвалина для клеток Hela Kyoto, что подтверждает возможность использования D-норвалина в качестве субстрата DAAO в живых системах.

Были созданы генетические конструкторы для направленной генерации пероксида водорода в ядре, цитозоле и митохондриях. Была показана возможность диффузии пероксида водорода из ядра в цитозоль, из цитозоля в ядро. Была продемонстрирована ключевая роль основанной на тиоредоксине антиоксидантной системы в ограничении диффузии пероксида водорода в цитоплазме клеток Hela Kyoto, а также включенность в этот процесс как тиоредоксиновой системы цитоплазмы, так и митохондрий.

Также нами были продемонстрированы ограничения использования цитоплазматического DAAO в качестве генератора пероксида водорода в гиппокампальных нейронах, но его применимость для изменения редокс-статуса клеток PC-12.

На основании полученных в результате этой работы конструкторов DAAO во фьюзе с биосенсором NuPer была показана возможность использования

хемогенетического генератора в кардиомиоцитах для создания концентраций пероксида водорода, достаточных для индукции окислительного стресса как на уровне первичной культуры, так и на уровне сердца мыши *in vivo*. Была показана принципиальная возможность использования D-аланина как субстрата фермента при добавлении аминокислоты в питьевую воду животных для создания хронического окислительного стресса в сердце.

### Теоретическая и практическая значимость работы

Теоретическая значимость этой работы заключается в расширении нашего понимания особенностей протекания редокс-процессов в клетках разного типа, роли различных антиоксидантных систем в формировании редокс-градиентов, а также участия пероксида водорода в патологиях сердца. Показаны ограничения использования хемогенетических генераторов АФК. Расширена палитра подходящих для хемогенетических генераторов субстратов. Все это приводит нас к более широкому пониманию возможностей системы для направленной генерации и детекции АФК. Практическая значимость включает в себя возможность разработки и тестирования ингибиторов и активаторов различных антиоксидантных систем, что особенно важно в случае системы, основанной на тиоредоксине, - ингибиторы этого пути могут использоваться в качестве противораковой терапии. Также результаты работы указывают на методы, которые могут быть использованы для моделирования окислительного стресса в широком круге органов в различных организмах. Данные методики могут быть чрезвычайно полезны для изучения, профилактики и лечения многих патологических процессов (рак, инфаркт, инсульт, нейродегенеративные заболевания, диабет, заболевания иммунной системы), включающих в себя дисбаланс образования и разрушения АФК. Также результаты работы могут быть использованы в исследовании сигнальных путей, основанных на редокс-

процессах, так как разработанная экспериментальная модель позволяет генерировать пероксид водорода в различных концентрациях и локализовать эту генерацию в определенных органеллах.

### Апробация результатов

Основные результаты работы были представлены на трех конференциях: ESF-EMBO Symposium “Thiol-based Redox switches in Life Sciences” в 2015 году, EMBO Conference on Redox Biology в 2017 году и на XXX Зимней молодежной школе «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии» в 2018 году.

По материалам работы было опубликовано 3 статьи в рецензируемых журналах.

Также представленные результаты использовались в качестве учебной задачи для участников Advanced Fluorescence Imaging Techniques в Европейской Молекулярно-Биологической Лаборатории (EMBL, Heidelberg) в 2016 и 2017 году.

#### *Статьи по результатам работы*

**Bogdanova YA**, Schultz C, Belousov VV. Local Generation and Imaging of Hydrogen Peroxide in Living Cells. // Current Protocols in Chemical Biology, 2017 Jun 19;9(2):117-127

Steinhorn B, Sorrentino A, Badole S, **Bogdanova Y**, Belousov V, Michel T. Chemogenetic generation of hydrogen peroxide in the heart induces severe cardiac dysfunction. Nature Communications, 2018 Oct 2;9(1):4044

Mishina NM\*, **Bogdanova YA\***, Ermakova YG, Panova AS, Kotova DA, Bilan D, Steinhorn B, Arnér ES, Michel T, Belousov V. Which antioxidant system shapes

intracellular H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> gradients? Antioxid Redox Signal. 2019 Mar 13. \*авторы внесли равный вклад в работу.

*Тезисы на конференциях*

**Bogdanova YA**, Matlashov ME, Belousov VV. Genetically encoded H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> producing/reporter system in neuronal cells, based on synaptically-targeted D-Amino Acid Oxidase and new version of the fluorescent indicator hyper// ESF-EMBO Symposium “Thiol-based Redox switches in Life Sciences”, 2015, Sant Feliu, Spain.

**Bogdanova YA**, Belousov VV. Fantastic DAAO and where to target it // EMBO Conference on Redox Biology, 2017, Russia

**Богданова Ю.А.**, Мишина Н.М., Ермакова Ю.Г., Белоусов В.В. Оксидаза D-аминокислот как инструмент редокс-биологии // XXX Зимняя молодежная школа «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии», 2018, Москва

## Глава 1. Обзор литературы

### 1.1. Активные формы кислорода

#### 1.1.1. Виды АФК

Активные формы кислорода могут быть разделены на нерадикальные и свободные радикалы (обладающие как минимум одним свободным электроном). Нерадикальные АФК включают пероксид водорода, органические гидропероксиды, синглетный молекулярный кислород, возбужденный карбонил, озон, гипохлорит и гипобромит. К радикальным АФК относятся супероксид анион-радикал, гидроксильный радикал, пероксильный радикал. Присутствие неспаренного электрона дает радикальным АФК набор свойств, отличающих их от нерадикальных АФК. Радикальные АФК более реакционноспособны.

- Супероксид анион-радикал ( $O_2^{\cdot -}$ )

Супероксид анион-радикал дисмутирует спонтанно или под воздействием супероксиддисмутазы в пероксид водорода и молекулярный кислород и служит основным источником пероксида водорода в клетке. Обладает отрицательным зарядом, поэтому взаимодействует с Fe-S кластерами с высокой скоростью, заряд же мешает взаимодействовать ему с тиолами и участвовать в тиольном сигналинге. Супероксид анион-радикал легко взаимодействует с другими радикалами. Особенно стоит отметить его взаимодействие с NO, приводящее к формированию пероксинитрита ( $ONOO^-$ ). Расстояние диффузии  $O_2^{\cdot -}$  невелико (~320 нм), также как и время жизни (~50 мс), поэтому взаимодействие с NO происходит предпочтительно в местах генерации супероксид анион-радикала.

- Гидроксильный радикал ( $\cdot OH$ )

Гидроксильный радикал – наиболее реакционноспособный представитель АФК. Он не специфически окисляет биомолекулы. Гидроксильный радикал формируется при взаимодействии пероксида водорода с ионами железа  $Fe^{2+}$  в реакции Фентона [107]. Время жизни и расстояние диффузии крайне коротки ( $10^{-9}$  с и 4,5 нм). Гидроксильный радикал реагирует с ближайшими молекулами в месте его генерации, поэтому области его токсичного влияния определяются локализацией ионов железа. Иницирует перекисное окисление липидов.

- Пероксильные радикалы ( $ROO\cdot$ )

Пероксильные радикалы формируются при инициации радикальной реакции полиненасыщенных липидов в перекисном окислении.

- Оксид азота ( $NO\cdot$ )

Оксид азота – очень слабый окислитель, имеет самое долгое время жизни среди АФК (~1 с). Способен проникать через мембраны и диффундировать на расстояния до 10 м. Как правило, окисляется, а не восстанавливается, инертен по отношению к большей части биомолекул. Реагирует со свободными радикалами и металлами.

- Синглетный кислород ( $^1O_2$ )

Синглетный кислород – форма молекулярного кислорода с возбужденным электроном. Может формироваться в фотоиндуцированных процессах.

- Пероксид водорода ( $H_2O_2$ )

Пероксид водорода образуется в результате действия NADPH-оксидаз, супероксиддисмутаза, в электрон-транспортной цепи митохондрий, а также как побочный продукт при функционировании множества ферментов.  $H_2O_2$  относительно стабилен (время жизни ~1 мс), способен проникать через биологические мембраны и диффундировать на большие расстояния. Пероксид водорода – сильный окислитель, но высокая энергия активации делает его



действие специфичным относительно небольшого количества клеточных субстратов. Он медленно реагирует с глутатионом, цистеинами и метионинами, но небольшая доля цистеинов в специфических белках обладает значительной реакционной способностью с  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Эта реакционная способность обусловлена особенностями строения этих белков и их окружения, что обеспечивает функционирование пероксида водорода как сигнальной молекулы, участвующей в множестве клеточных процессов

### 1.1.2. Источники пероксида водорода в клетке

Активированные моноциты и макрофаги продуцируют супероксид [14], нейтрофилы и эозинофилы используют оксиданты в противомикробной защите. Другие типы клеток контролируемо синтезируют АФК в ответ на различные стимулы. В клетках существует ряд систем, чьими единственными или дополнительными функциями является синтез АФК. К ним относятся NADPH-оксидазы, электрон-транспортная цепь митохондрий и различные оксидазы (рисунок 1).

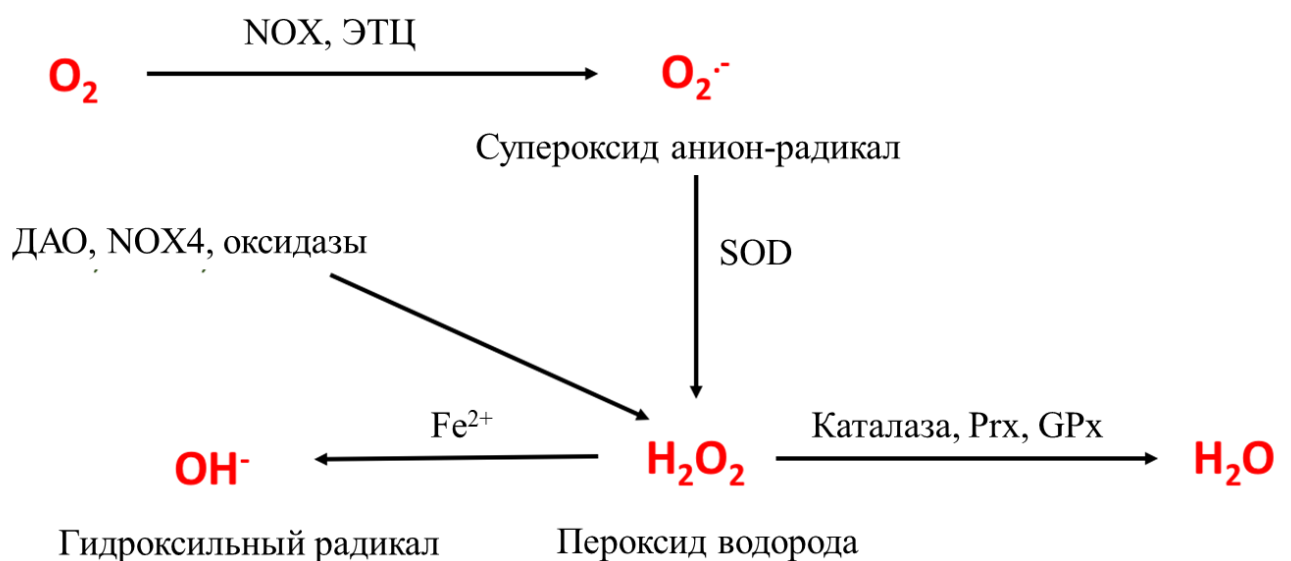


Рисунок 1 - Продукция и взаимопревращения АФК. Супероксид анион-радикал образуется из кислорода путем одноэлектронного восстановления за счет работы NADPH-оксидаз (NOX), при утечке электронов из электрон-транспортной цепи (ЭТЦ) митохондрий. За счет работы супероксиддисмутаза (SOD) из супероксида образуется пероксид водорода. Другими источниками пероксида служат NOX4 и различные оксидазы. В присутствии железа из пероксида образуется гидроксильный радикал (реакция Фентона)

#### 1.1.2.1. NADPH-оксидазы

NADPH-оксидазы (NOX) – семейство мультисубъединичных ферментов, катализирующих восстановление кислорода с использованием NADPH как донора электронов. Все члены семейства – трансмембранные белки, транспортирующие электроны через биологические мембраны. В связи с этим у белков семейства есть ряд общих обязательных черт:

- 1) NADPH-связывающий сайт у С-конца
- 2) FAD-связывающий сайт рядом с ближайшим к С-концу трансмембранным доменом
- 3) 6 консервативных трансмембранных доменов
- 4) 4 высококонсервативных связывающих гемы гистидинов

На первом шаге функционирования фермента электроны переходят от NADPH к FAD (рисунок 2). Затем с FADH<sub>2</sub> один электрон передается на железо внутреннего гема. Т.к. железо гема может принимать только один электрон за раз, пришедший на внутренний гем электрон передается на железо внешнего гема, вследствие чего внутренний гем становится способным принять второй электрон от теперь частично восстановленного FADH. На противоположной стороне мембраны электрон передается кислороду с формированием супероксида.

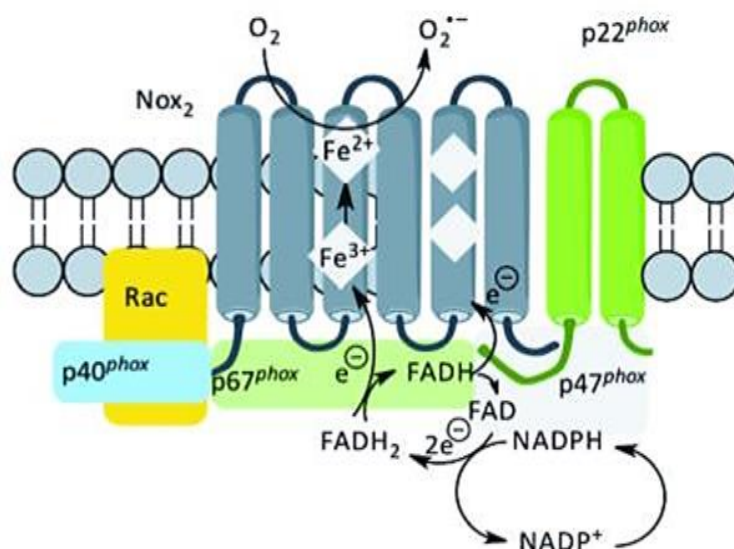


Рисунок 2 – Схема строения и функционирования NOX2 [69]

Ранние исследования NOX были проведены на нейтрофилах при изучении респираторного взрыва [14]. NOX2 была первой открытой изоформой NOX. Она состоит из 6 субъединиц:  $gp91^{phox}$  (также обозначаемая NOX2),  $p22^{phox}$ ,  $p47^{phox}$ ,  $p67^{phox}$ ,  $p40^{phox}$  и Rac (рисунок 2).  $gp91^{phox}$  – каталитическая субъединица, напрямую вовлечена в транспорт электрона.  $p22^{phox}$  – стабилизирующая субъединица, ассоциирует с организующей субъединицей  $p47^{phox}$ .  $p67^{phox}$  – субъединица-активатор,  $p40^{phox}$  – регуляторная, а Rac – GTP-связывающий белок. В неактивных нейтрофилах  $gp91^{phox}$  и  $p22^{phox}$  концентрируются в внутриклеточных компартментах (вторичных и третичных гранулах), оставшиеся субъединицы располагаются в цитозоле [40; 7]. При стимуляции фагоцитов происходит транслокация NOX2 в результате слияния гранул с плазматической мембраной или фагосомой и ее ассоциация с цитоплазматическими субъединицами [40; 129].

Хотя NOX2 часто называют фагоцитарной NADPH-оксидазой, ее мРНК была обнаружена в широчайшем круге тканей, также была показана ее экспрессия в нейронах [269], кардиомиоцитах [128], клетках скелетной мускулатуры [147], гепатоцитах [247] и многих других.

Первым описанным гомологом NOX2 была NOX1 [19; 287]. Вероятно, гены этих оксидаз появились в результате относительно недавней дупликации, последовательности белков обладают большой степенью схожести (~60%) [287]. Наибольший уровень экспрессии NOX1 наблюдается в эпителии толстой кишки [291], но также она экспрессируется и во многих других типах клеток [287; 160; 76].

NOX3 также имеет большую схожесть по аминокислотному составу и структуре белка с NOX2. Основным местом ее экспрессии служат клетки внутреннего уха [18], показано ее участие в работе вестибулярного аппарата, восприятии гравитации и баланса [221]. Фермент константно активен и продуцирует супероксид, но может быть дополнительно активирован [312].

NOX1-NOX3 представляют из себя эволюционно близкую группу ферментов. NOX4 существенно от них отличается. Изначально NOX4 была определена как NADPH-оксидаза почек [110; 272], позже была показана экспрессия в других типах клеток [285; 315; 316; 343]. Основным детектируемым продуктом активного фермента является пероксид водорода [210]. Предполагается, что внеклеточная петля NOX4 обладает супероксиддисмутазной активностью [294] и ускоряет спонтанную дисмутацию супероксида в  $H_2O_2$ . Для функционирования фермента необходимы только две субъединицы (NOX4 и  $p22^{phox}$ ), для её активации не требуются цитоплазматические субъединицы [210]. NOX4, вероятно, вовлечена в чувствительность клеток к кислороду и участвует в их ответе на гипоксию и гипероксию [202; 226], показана ее вовлеченность в регуляцию формирования дисульфидных связей [238].

NOX5 экспрессируется во множестве различных типов клеток [20; 64]. NOX5 не зависит от цитоплазматических субъединиц,  $p22^{phox}$  и Rac [20]. Ее активность напрямую зависит от концентрации внутриклеточного кальция и регулируется кальмодулином через кальмодулин-связывающий домен на С-конце

[303]. Функции, выполняемые этой оксидазой, не до конца ясны - ген NOX5 отсутствует у грызунов, что затрудняет ее изучение [26].

DUOX1 и DUOX2 экспрессируются в большом количестве в клетках щитовидной железы, а также в клетках эпителия дыхательных путей [263] и желудочно-кишечного тракта [115] и в простате [322]. Главной отличительной чертой DUOX является присутствие седьмого трансмембранного домена и домена гомологии пероксидаз (peroxidase homology domain) во внеклеточной N-концевом участке. Для их активности не нужны дополнительные субъединицы, но она зависит от кальция [8] и фосфорилирования [249]. DUOX2 производит  $H_2O_2$  – субстрат для тиреопероксидазы, необходимый при синтезе тиреоидных гормонов [57]. Точная функция DUOX1 до конца не ясна. Несмотря на то, что все NOX по сути своей являются одноэлектронными переносчиками, при функционировании обеих изоформ DUOX был детектирован только пероксид водорода, но не супероксид [86; 172].

Открытие NOX поменяло существовавшее восприятие АФК как токсичных побочных продуктов метаболических реакций. Функционирование NOX регулируется множеством сигнальных путей, в которые, как мы теперь понимаем, вплетается и редокс-сигналинг, необходимый для регуляции и настройки множества клеточных функций.

#### 1.1.2.2. Электрон-транспортная цепь митохондрий

В последнее время стало очевидно, что АФК, образующиеся в результате функционирования ЭТЦ митохондрий, являются не просто случайными побочными продуктами окислительного метаболизма, но вовлечены в сигнальные пути клетки. Митохондрии, как главные энергетические станции клетки и узлы протекания многих метаболических путей с помощью АФК, с легкостью

отображают метаболическое состояние клетки и помогают в его регуляции. Образующиеся в митохондриях АФК участвуют в иммунном ответе [329], апоптозе [29], дифференцировке [189], автофагии [63] и других процессах.

Первые данные о том, что митохондрии способны к продуцированию АФК, были получены в 1966 году [149], после чего ряд работ Чейнса и коллег подтвердили формирование пероксида водорода выделенными препаратами митохондрий [43; 61; 178]. Позже было показано, что пероксид водорода формируется при дисмутации супероксида [102], параллельно была открыта митохондриальная супероксиддисмутаза [327].

В митохондриях млекопитающих было обнаружено 10 разных сайтов генерации супероксида/пероксида водорода в ЭТЦ и ассоциированных с ней ферментах (ферменты цикла Кребса,  $\beta$ -окисления и т.д.). Чаще всего основными местами генерации АФК называют комплексы I и III ЭТЦ [207]. Комплекс I несет два сайта генерации АФК: флавин в NADH-окисляющем сайте и восстанавливающий убихинон сайт [309]. За генерацию АФК в комплексе III отвечает хинон-окисляющий сайт ( $III_{O_2}$ ) [240]. Другие сайты включают 2-оксиглутаратдегидрогеназу [50], пируватдегидрогеназу [282], комплекс II [241], глицерол-3-фосфатдегидрогеназу [218], а также систему электронпереносащий флавопротеин/ETF:Q оксидоредуктаза  $\beta$ -окисления жирных кислот [227], пролиндегидрогеназу [213] и дигидрооротатдегидрогеназу [218]. Продукция АФК в этих сайтах в значительной степени зависит от протон-движущей силы, соотношения  $NADH/NAD^+$  и восстановленного коэнзима Q к окисленному и локальной концентрации кислорода. Вследствие этого полученные на выделенных препаратах митохондрий данные не отображают реального участия каждой из вышеперечисленных систем в формировании супероксида и пероксида водорода *in vivo* [118]. Однако, доказаны, например, регулируемые изменения в общем количестве продуцируемых митохондриями АФК в случае иммунного ответа [329; 250].

### 1.1.2.3. Другие эндогенные источники $H_2O_2$

Всего в клетках человека обнаружено около 34 продуцирующих пероксид водорода или супероксид ферментов (исключая NOX). Нарушения функционирования части из них, как предполагается, ведут к различным редокс-обусловленным патологическим процессам [180; 259; 339], также они могут участвовать в процессах редокс-сигналинга [209].

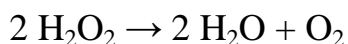
В пероксисомах проходит множество метаболических процессов, сопровождающихся образованием АФК [278]. Идентичность пероксисом как клеточных органелл изначально была обусловлена их способностью к продукции и элиминации пероксида водорода [87]. Вероятно пероксисомы способны служить источником цитоплазматического сигнального  $H_2O_2$  [105].

### 1.1.3. Антиоксидантные системы

Антиоксиданты – широкий круг соединений, включающий ферменты, разрушающие АФК, а также соединения, взаимодействующие с АФК с большой скоростью, что позволяет сохранить другие биомолекулы. Уровень и состав антиоксидантов зависит от типа ткани, клеток и органелл, от физиологического состояния организма, они способны меняться в течение дня [217].

#### 1.1.3.1. Каталаза

Каталазы – класс ферментов, осуществляющих катализ дисмутации пероксида водорода в кислород и воду



Каталаза является одним из первых открытых ферментов, изначально как «свойство некоторых тканей разлагать пероксид водорода в кислород», а затем как отдельный фермент [177]. Каталаза – большой, мультидоменный фермент, активный в тетрамерной форме.

Каждая субъединица каталаз млекопитающих состоит из 2-х глобулярных  $\alpha$ -спиралей и  $\beta$ -бочки, домены связаны с помощью длинной петли, которая также участвует в формировании тетрамера. Субъединицы содержат гем с  $\text{Fe}^{3+}$  [306]. При взаимодействии с первой молекулой пероксида водорода активный центр фермента переходит в состояние  $\text{Fe}^{4+}$  + порфирин  $\pi$ -катионный радикал, Комплекс I. С комплексом I затем взаимодействует вторая молекула пероксида водорода, возвращая гем в базовое состояние. Также каждая единица связывает по одной молекуле NADPH, чья функция не до конца ясна [158].

Каталаза является одним из самых изобильных пероксисомальных белков в клетке. На своем C-конце каталаза несет неканоничный сигнал пероксисомальной локализации (PTS1), с которым для импорта каталазы в пероксисому связывается белок PEX5 [239]. В ряде случаев каталаза может оставаться в цитоплазме или переходить в ядро [170; 340].

Главной функцией каталазы является разрушение образующегося в большом количестве в пероксисомах пероксида водорода. При мутациях в PTS1, предотвращающих транспорт каталазы в пероксисомы, наблюдается окислительный стресс и метаболические нарушения, ведущие к различным патологиям [154; 144]. Полное отсутствие каталазы в клетках млекопитающих не приводит к значительным врожденным аномалиям, хоть и может повысить риск некоторых заболеваний, также такие клетки оказываются более чувствительны к окислительному стрессу [114; 132]. В соответствие с этим наблюдением рядом работ показана активация каталазы при окислительном стрессе [54; 55; 288].



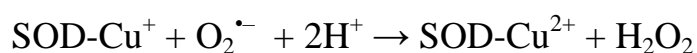
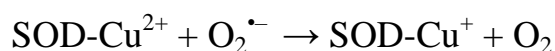
Уровень участия каталазы в регуляции редокс-статуса цитоплазмы и других органелл при этом остается неизвестным.

### 1.1.3.2. Супероксиддисмутаза

Супероксиддисмутазы (SOD) – ферменты, каталитически конвертирующие супероксид анион радикал в пероксид водорода. Супероксид является умеренно реакционноспособной молекулой, но участвует в ряде реакций, в результате которых формируются другие АФК. Особо важна в данном случае реакция с NO, приводящая к формированию пероксинитрита – сильного окисляющего агента, способного взаимодействовать с различными биомолекулами [25]. Таким образом, контролируя концентрацию супероксида, SOD также контролирует концентрацию пероксинитрита и пероксида водорода. Фермент чрезвычайно эффективен и действует практически со скоростью реакции, контролируемой диффузией ( $\sim 2 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ ) [104].

Первая супероксиддисмутаза была открыта более полувека назад [192]. На данный момент у млекопитающих выделяют 3 изоформы SOD: цитоплазматическая Cu/Zn SOD (SOD1), митохондриальная Mn SOD (SOD2) и внеклеточная Cu/Zn SOD (SOD3).

Cu/Zn SOD состоят из двух (SOD1) или четырех (SOD3) субъединиц, каждая из которых содержит по одному иону меди и цинка. В каталитической реакции участвует ион меди, проходя через цикл:

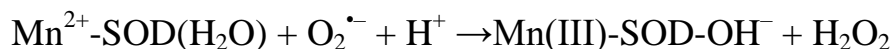
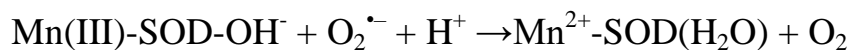


Ион цинка не участвует в каталитическом цикле, но помогает стабилизировать фермент [84].

SOD1 локализуется преимущественно в цитоплазме, однако небольшая ее доля направляется после синтеза в межмембранное пространство митохондрий (IMS). Вероятно, именно локализуемая в IMS SOD1 важна для защиты клетки от окислительного стресса [205]. Остающаяся же в цитоплазме SOD1 может выполнять ряд других функций, таких как буферизация цинка [326] и меди [77], исполнение роли транскрипционного фактора [310] и участника редокс-сигналинга [205].

Внеклеточная SOD3 – гликопротеин с высокой аффинностью к гепарансульфатам, вследствие чего SOD3 остается привязанной к гликокаликсу. Это позволяет ей участвовать в дисмутации образующегося под воздействием NOX супероксида и участвовать в процессах клеточного сигналинга [97].

Mn SOD (SOD2) осуществляет сходную с Cu/Zn SOD реакцию. Фермент «в покое» связывает  $\text{OH}^-$ , поэтому механизм реакции может быть записан следующим образом:



Mn SOD обычно содержит 4 субъединицы, каждая субъединица несет по иону Mn.

Аминокислотные последовательности Mn SOD и Cu/Zn SOD, их расшифрованные кристаллические структуры и каталитические механизмы различаются в большой степени, что позволяет говорить о том, что эти два типа SOD возникли независимо друг от друга в ответ на увеличение концентрации  $\text{O}_2$  два миллиарда лет назад [279].

Раковые клетки практически всегда показывают сниженную активность Mn SOD, активность Cu/Zn SOD в них также часто ниже нормы [125]. Нормализация активности Mn SOD приводит к частичной нормализации их фенотипа [134]. Известно, что боковой амиотрофический склероз вызван мутацией в гене SOD1,

но патофизиологический механизм все еще неизвестен [257]. Также с нарушением работы SOD связывают ряд других заболеваний, таких как бесплодие мужчин [341], аутоагрессия и самоповреждения [101].

Mn SOD необходима для выживания организма: мыши, не экспрессирующие SOD2 были способны прожить меньше месяца после рождения [167]. Особенно чувствительны к отсутствию функциональной SOD2 оказались потребляющие большое количество кислорода ткани: сердечные и скелетные мышцы [211], клетки мозга [145]. Предполагается, эффект от отсутствия SOD2 вызван большой концентрацией белков с железо-серными кластерами в ЭТЦ и цикле трикарбоновых кислот [211], чувствительных к супероксиду, а также повышенной вероятностью формирования пероксинитрита в компартментах, содержащих повышенную концентрацию  $O_2^{\bullet-}$  [47]. SOD2 (-/+) гетерозиготы также демонстрируют признаки окислительного стресса и функциональных изменений митохондрий, но близкую к нормальной продолжительность жизни [225].

### 1.1.3.3. Пероксиредоксины

Пероксиредоксины (Prx) – большое семейство пероксидаз, катализирующих восстановление пероксида водорода, алкилгидропероксидов и пероксинитрита [236]. Все пероксиредоксины содержат консервативный остаток цистеина ( $C_p$ ) вблизи N-конца молекулы, служащий сайтом окисления пероксидами [338]. Большинство, но не все, пероксиредоксины содержат также второй консервативный цистеин ( $C_R$ ) в C-концевой области. На основании присутствия/отсутствия и положения этого цистеина пероксиредоксины разделяют на двуцистеиновое (2-Cys), атипичное двуцистеиновое (атипичное 2-Cys) и одноцистеиновое (1-Cys) подсемейства [248]. Клетки млекопитающих способны экспрессировать 6 изоформ пероксиредоксинов: 4 изоформы 2-Cys (PrxI

– PrxIV), одну атипичную 2-Cys изоформу (PrxV) и одну 1-Cys изоформу (PrxVI). Эти изоформы отличаются в своей локализации и предпочитаемом субстрате (Таблица 1).

Таблица 1

## Пероксиредоксины млекопитающих [248]

Изоформа пероксиредоксина	Локализация	Основной субстрат
PrxI	Цитозоль и ядро	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
PrxII	Цитозоль и ядро	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
PrxIII	Митохондрии	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
PrxIV	ЭПР	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
PrxV	Пероксисомы, митохондрии, цитоплазма	Алкилгидропероксиды, пероксинитрит
PrxVI	Цитоплазма	Алкилгидропероксиды

Структура пероксиредоксинов формирует высокоафинный сайт связывания пероксида водорода, создающий вокруг C<sub>p</sub> окружение, делающее этот цистеин высокочувствительным к окислению пероксидом водорода, что позволяет белкам этого семейства выполнять антиоксидантные функции с чрезвычайно высокой эффективностью [228].

Все белки этого семейства – димеры (оба типа 2-Cys пероксиредоксинов формируют декамеры из димеров) [236]. C<sub>p</sub> окисляется пероксидом водорода с выделением молекулы воды. В случае 2-Cys пероксиредоксинов образовавшаяся сульфеновая неустойчивая промежуточная форма реагирует с C<sub>R</sub> второй субъединицы димера и формирует дисульфидную связь. Эта дисульфидная связь после восстанавливается тиоредоксином (рисунок 3) [131].

Атипичные 2-Cys и 1-Cys пероксиредоксины также сначала подвергаются окислению C<sub>p</sub>. Атипичные 2-Cys формируют внутрисубъединичную дисульфидную связь, при этом они также функционируют только в форме димера [265]. Эта дисульфидная связь также восстанавливается тиоредоксином. В случае 1-Cys пероксиредоксинов C<sub>R</sub> отсутствует, после окисления C<sub>p</sub> он формирует дисульфидную связь с  $\pi$ -изоформой глутатион-S-трансферазы ( $\pi$ GST) [182; 243]. Молекула глутатиона (GSH) разрушает дисульфидную связь в этом гетеродимере, оставаясь связанной с C<sub>p</sub> и высвобождая  $\pi$ GST. При взаимодействии с другой молекулой глутатиона пероксидаза деглутатионируется, что завершает каталитический цикл [98].

Пероксиредоксины не содержат никаких редокс-активных кофакторов, свою антиоксидантную функцию они выполняют только с помощью цистеинов с особыми свойствами, созданными их окружением. C<sub>p</sub> пероксиредоксинов обладает pK<sub>a</sub> в районе 5,2 – 6,3 благодаря особой структуре активного центра ферментов. C<sub>p</sub> окружен основными аминокислотными остатками (аргинин и гистидин), которые стабилизируют тиолат-анион, облегчая нуклеофильную атаку на пероксид водорода с образованием S-OH группы [65]. pK<sub>a</sub> типичной тиольной группы равняется ~8,3 и константа скорости второго порядка при взаимодействии низкомолекулярного тиола с пероксидами оценивается в районе  $\sim 20 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  [335]. Константа скорости второго порядка при взаимодействии пероксиредоксинов с H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> оценивается в районе  $10^7$ - $10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ , что делает их основными мишенями пероксида водорода в клетке [183; 73].

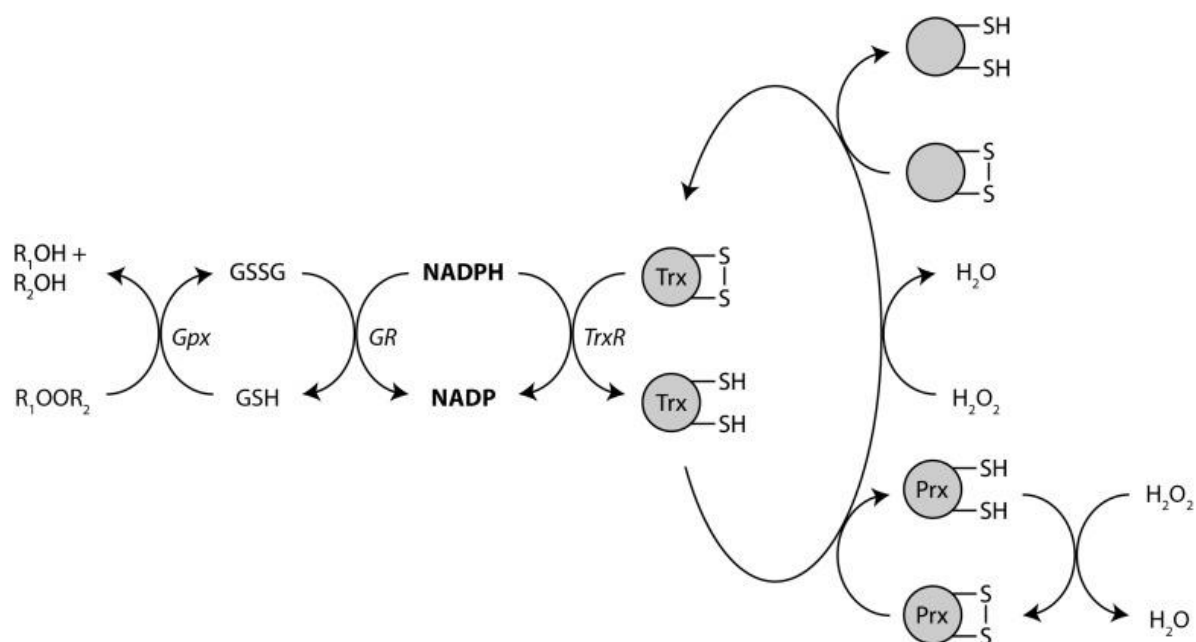


Рисунок 3 – Схема антиоксидантного действия и взаимосвязи пероксиредоксинов (Prx), тиоредоксинов (Trx) и глутатионпероксидаз (Gpx). Также указаны тиоредоксинредуктаза (TrxR) и глутатионредуктаза (GR)

При изучении кинетических свойств пероксиредоксинов было обнаружено, что со временем их пероксидазная активность снижается, а вызвано это гиперокислением  $C_p$  в сульфиновую форму ( $-SO_2H$ ) [342; 62]. Гиперокисление свойственно только для 2-Cys пероксиредоксинов, разные изоформы внутри подсемейства также обладают разной чувствительностью с гиперокислению [228]. Гиперокисленная форма может быть восстановлена сульфидредоксином с использованием энергии гидролиза АТФ и тиола GSH или тиоредоксина [337; 35].

#### 1.1.3.4. Тиоредоксиновая система

Тиоредоксины – семейство небольших редокс-активных белков. Они несут консервативный сайт -Trp-Cys-Gly-Pro-Cys-Lys-, который способен обратимо окисляться с формированием дисульфидного мостика при восстановлении дисульфидов своих субстратах [237]. Окисленный тиоредоксин после этого

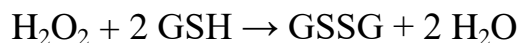
восстанавливается при помощи тиоредоксинредуктазы в NADPH-зависимом процессе. Тиоредоксинредуктазы млекопитающих – FAD-содержащие гомодимеры, они также содержат консервативный сайт с двумя цистеинами, способными к обратимому окислению, сходному с окислением тиоредоксина. Для функционирования фермента необходим С-концевой селеноцистеин – через него электрон передается с NADPH через FAD и цистеины тиоредоксинредуктазы на цистеин тиоредоксина.

Тиоредоксины и тиоредоксинредуктазы существуют в изоформах 1 и 2, локализующихся в цитоплазме или митохондриях соответственно. Для тиоредоксинредуктазы существует изоформа 3, экспрессирующаяся лишь в определенных тканях (семенники), также называемая тиоредоксинглутатионредуктаза [12].

Тиоредоксинредуктазы необходимы для всех процессов, в которые вовлечен тиоредоксин. Не удивительно, что они оказываются критичными для множества физиологических и патологических процессов, таких как апоптоз [305], рак [264], паразитозы [42], хронические воспаления и аутоиммунные заболевания [24] и нейродегенеративные заболевания [70], а поиск ингибиторов тиоредоксинредуктаз – важной клинической задачей [24]. Особенно широкое применение ингибиторы тиоредоксинредуктазы приобрели в терапии рака: раковые клетки в связи с особенностями их метаболизма обладают повышенным уровнем генерации АФК, ингибирование антиоксидантных систем приводит к их гибели [108; 121; 181].

#### 1.1.3.5. Глутатионпероксидазы

Глутатионпероксидазы (GPx) – ферменты, восстанавливающие пероксид водорода/органические пероксиды до воды/соответствующего спирта с использованием восстановительных эквивалентов глутатиона:



У человека обнаружена экспрессия 8 различных GPx, GPx1-4 и 6 являются селенопротеинами – их активный сайт содержит остаток селеноцистеина [307].

GPx1 – первая открытая глутатионпероксидаза, локализуется в цитоплазме, а также в небольшом количестве в ядре, митохондриях и в части типов клеток в пероксисомах [94; 277]. Была показана ее большая эффективность в разрушении пероксида водорода [72], также она активна в отношении пероксидов липидов [203]. Относительный уровень вовлеченности GPx1 и пероксиредоксинов в поддержание редокс-статуса клетки остается предметом дебатов [103]. Известно, что нокаутированные по GPx1 мыши не демонстрируют очевидных патологий без индукции в них окислительного стресса [99].

GPx2 экспрессируется в клетках эндотелия, особенно много ее в клетках желудочно-кишечного тракта [67; 46]. Если GPx1 занимает одну из нижних строчек в иерархии селенопротеинов (ее экспрессия прекращается в первую очередь при недостатке селена), то GPx2 занимает противоположную сторону [334]. Нокаутированные по GPx2 мыши при этом также демонстрируют практически нормальным фенотип [100], и только двойные нокауты по GPx1 и 2 подвержены острым воспалениям кишечника и образованию злокачественных опухолей [68; 93].

GPx3 – внеклеточный гликопротеин, содержится в плазме крови и других телесных жидкостях. В качестве источника восстановительных эквивалентов GPx3 может использовать глутатион, тиоредоксин и глутатионредуктазу, но их концентрации во внеклеточных жидкостях считаются недостаточными для функционирования GPx3 [36]. Нокауты по GPx3 не демонстрируют явных



аномалий и симптомов [216]. Предполагается участие GPx3 в супрессии роста и пролиферации раковых клеток [9].

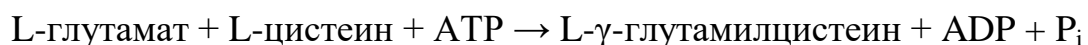
GPx4 млекопитающих экспрессируется в трех разных формах: митохондриальной, не-митохондриальной и ядерной [140]. В иерархии селенопротеинов она занимает промежуточное место. Нокауты не-митохондриальной формы летальны на ранних стадиях эмбрионального развития [139]. Митохондриальная и ядерная формы экспрессируются в придатках яичка и участвуют в сперматогенезе, выполняя структурную роль [313].

GPx5 – цистеинсодержащая глутатионпероксидаза, также экспрессируется в придатках яичек и защищает ДНК от повреждений по не до конца ясному механизму [299]. GPx6 мало изучена, GPx7 и 8 локализуются в ЭПР и участвуют в фолдинге белков [318; 41].

#### 1.1.3.6. Глутатион

Глутатион (GSH) – трипептид, превалирующая тиол-содержащая молекула в клетке. Окисляется с формированием дисульфида. Глутатион синтезируется в цитоплазме всех клеток млекопитающих, наиболее активны клетки печени. Митохондрии содержат от 10 до 20% клеточного глутатиона, но не способны к его синтезу и активно транспортируют его в матрикс из цитоплазмы [186].

Глутаматцистеинлигаза ( $\gamma$ -глутамилцистеинсинтетаза) катализирует первый шаг синтеза глутатиона:



Следующий шаг биосинтеза катализирует глутатионсинтетаза:



Соотношение восстановленного глутатиона к окисленному в клетках остается высоким благодаря действию фермента глутатионредуктазы:



Глутатионредуктазы животных обычно содержат 2 субъединицы, каждая несет по молекуле FAD в активном центре [301]. NADPH восстанавливает FAD, после чего электроны переходят на дисульфидную связь в активном центре, а затем используются для восстановления глутатиона.

#### 1.1.4. Транспорт пероксида водорода

Долгое время считалось, что пероксид водорода перемещается через мембраны свободно за счет пассивной диффузии без вовлечения в транспорт каких-либо белков. Позже были продемонстрированы мембранные градиенты пероксида [11], соответствующие физико-химическим свойствам  $\text{H}_2\text{O}_2$ : полярность молекулы превышает полярность воды, вследствие чего пассивная диффузия пероксида через мембраны должна проходить с меньшей скоростью, чем для молекул воды. Схожесть свойств молекул воды и пероксида водорода (дипольного момента, диэлектрической константы и молекулярного диаметра) привела к гипотезе, что в транспорте  $\text{H}_2\text{O}_2$  через биологические мембраны могут участвовать белки аквапорины, позже подтвержденной экспериментально [32; 88]

Аквапорины – белки-каналы, облегчающие транспорт воды и других молекул через биологические мембраны [111]. Клетки млекопитающих экспрессируют 13 разных аквапоринов (AQP0–12), которые можно разделить на основании пропускаемых ими молекул на подгруппы. AQP3, -8, -9 и -11 способны пропускать пероксид водорода, вследствие чего выделяются в группу

пероксиринов [300; 32; 323]. Способность AQP5 проводить через себя пероксид водорода остается предметом обсуждения [32; 251].

Аквапорины играют важную роль в редокс-гомеостазе. AQP8, локализующийся на внутренней мембране митохондрий, облегчает диффузию пероксида водорода из матрикса митохондрий в цитоплазму [162; 184] и через плазматическую мембрану [31]. Была показана редокс-регуляция AQP8, локализующегося на плазматической мембране [195]. Также было показано участие AQP3 в облегчении диффузии пероксида водорода, образующегося в результате активности NOX [198; 120]. AQP11 локализуется на мембранах ЭПР и потенциально является важной частью регуляторной системы его редокс-статуса [30].

## 1.2. Пероксид водорода как сигнальная молекула

Основным механизмом, по которому АФК выполняют свои сигнальные функции, является модификация тиолов целевых белков [235]. Другие классы молекул, такие как не-кодирующие РНК [171] и микро-РНК [153], также могут быть редокс-чувствительными, но данные процессы намного менее изучены.

Процентная доля цистеинов в протеоме сложных эукариот составляет 2,2%, тогда как у архей и прокариот она намного ниже (0,5%) [201]. При этом присутствующие цистеины в белках достаточно консервативны, что дает возможность говорить об их функциональной значимости для белков [151]. Эти функции не ограничиваются участием в каталитических процессах в составе активных центров ферментов, но участвуют в связывании ионов металлов, а также в тонкой настройке функционирования белков через редокс-процессы.

Критический первый шаг в редокс-сигналинге через белки – взаимодействие пероксида водорода с остатком цистеина в форме тиолата ( $S^-$ ) с

формированием сульфената ( $\text{SO}^-$ ) (рисунок 4). Этого может быть достаточно для изменения функционирования белка, также это может вести к другим реакциям, таким как формирование внутри- и межмолекулярных дисульфидных связей ( $\text{SS}$ ) или глутатионилированию ( $\text{SSG}$ ) цистеина. Супероксиданион радикал может реагировать с железосерными кластерами, изменяя функционирование ферментов, например, аконитазы [58]. При взаимодействии с  $\text{NO}$  супероксиданион радикал формирует пероксинитрит, способный взаимодействовать с тирозинами белков, также приводя к изменениям их функций [21]. Сам по себе  $\text{NO}$  может взаимодействовать с остатками цистеинов и приводить к их  $\text{S}$ -нитрозилированию.

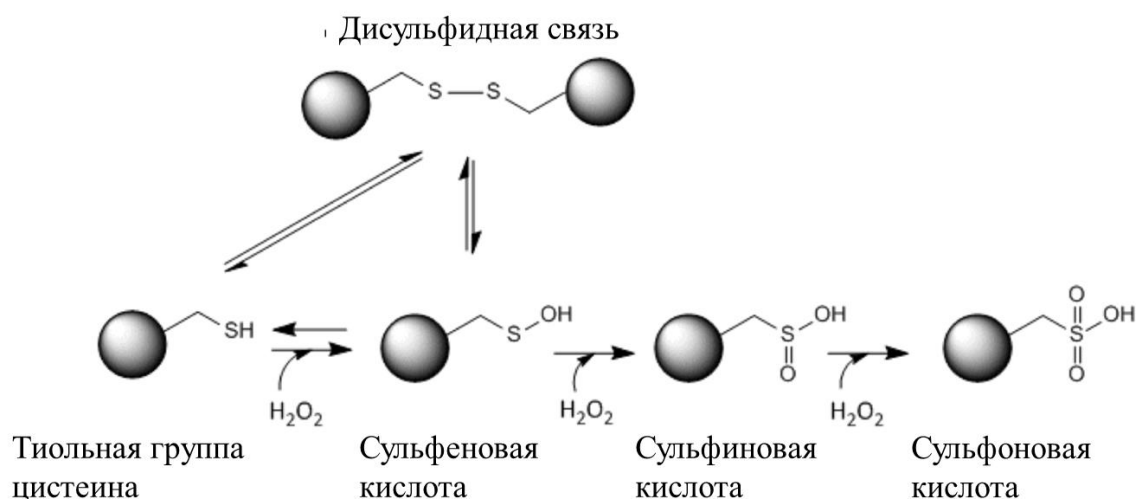


Рисунок 4 - Редокс-химия тиолов

Реакция тиолов с  $\text{H}_2\text{O}_2$  включает нуклеофильную атаку тиолата на  $\text{H}_2\text{O}_2$ , таким образом реакционная способность остатка цистеина определяется  $\text{pK}_a$  его сульфгидрильной группы. Её  $\text{pK}_a$  без вовлечения белкового окружения равняется 8,3, что означает, что только 10% цистеинов ионизированы при физиологическом  $\text{pH}$ . В белках электростатическое окружение  $-\text{SH}$  группы способно делать её более кислой и увеличивать ее реакционную способность с пероксидом водорода,

т.к. большая доля будет существовать в форме тиолата. Нуклеофильность тиолата также может быть существенно изменена локальным белковым окружением [95].

Подсчеты показывают, что около 10-20% цистеиновых остатков, присутствующих в протеоме эукариот, могут быть окислены в аэробных условиях [150]. Эти цистеины входят в состав ферментов, транспортеров, рецепторов и транскрипционных факторов [16]. Различные белки, такие как элементы цитоскелета, белки теплового шока, белки скаффолда и многие рибонуклеопротеины содержат высокочувствительные к окислению цистеины [113]. Было продемонстрировано, что часть цистеиновых белков оказываются экспонированы в растворитель и доступны для редокс-регуляции только после структурных изменений, вызванных стимуляцией клетки ростовыми факторами [27].

Кроме остатков цистеина окислению пероксидом водорода могут также подвергаться остатки селеноцистеина и метионина. Селеноцистеин – намного более редкая аминокислота, кодируемая стоп-кодоном UGA в присутствии последовательности вставки селеноцистеина в мРНК. По своим химическим свойствам селеноцистеин напоминает цистеин, но обладает  $pK_a \sim 5,2$ , вследствие чего быстрее реагирует с пероксидом водорода при физиологических pH [328]. Селеноцистеин включен только в 25 белков, экспрессирующихся в клетках человека, но среди них основные редокс-белки тиоредоксинредуктаза и глутатионпероксидазы. Участие метионина в редокс-сигналинге намного менее изучено.

Важной особенностью редокс-сигналинга является его локальность и существование градиентов пероксида водорода, формируемых под воздействием баланса активностей ферментов-генераторов  $H_2O_2$  и антиоксидантных систем. Градиенты пероксида особенно важны в процессе эмбрионального развития [6], воспаления [188] и миграции клеток [222].

Самым известным примером редокс-регулируемых ферментов являются протеин-тирозин фосфатазы (protein tyrosine phosphatases, РТР), катализирующие гидролиз фосфотирозинов в белках. Была показана инактивация ферментов этого класса в присутствии микромолярных концентраций пероксида водорода вследствие окисления каталитически активного цистеинового остатка [80]. Данный механизм участвует в повышении общего уровня фосфорилирования белков при воздействии ростовых факторов [289; 246].

В редокс-регулируемом ответе на окислительный стресс участвует система NRF2–KEAP1 [224]. KEAP1 функционирует как ингибитор NRF2. Окисление его цистеинов ведет к формированию гомодимера, который способен препятствовать убиквитинилированию NRF2, что повышает его стабильность и позволяет ему транслоцироваться в ядро. В ядре NRF2 играет роль фактора транскрипции для нескольких белков, участвующих в антиоксидантной защите клетки.

Транскрипционный фактор NF-κB обладает сложной сетью регуляции его работы. NF-κB играет ключевую роль в переходе к воспалению, которое ассоциировано с большой продукцией пероксида водорода. В зависимости от контекста H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> может играть как роль его активатора, так и ингибитора [214]. Пероксид водорода в цитоплазме способен активировать NF-κB при окислении и активации киназы ингибитора NF-κB – фермента, снижающего стабильность ингибитора NF-κB. Также пероксид водорода способен окислять сам NF-κB по цистеину, находящемуся в его ДНК-связывающем регионе. Таким образом, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, образующийся в ядре клетки, ингибирует связывание NF-κB с ДНК, снижая его транскрипционную активность.

Также редокс-регуляция важна в клеточном ответе на гипоксию [325], функционировании многих ионных каналов [37], эмбриологическом развитии организмов [302], процессах регенерации [194], иммунном ответе и воспалениях [208], инсулиновом ответе [324] и во многих других процессах.

### 1.3. Генераторы АФК

#### 1.3.1. CALI

Инактивация светом при помощи хромофора (Chromophore-assisted laser or light inactivation, CALI) – техника, позволяющая нарушать функционирование белков при помощи АФК контролируемым светом образом [148]. Метод основан на использовании фотосенсибилизаторов, способных поглощать энергию поглощенного света и передавать ее другим молекулам. Как правило при поглощении фотона молекула переходит в синглетное активированное состояние, а затем в триплетное, из которого и происходит передача энергии. В зависимости от природы сенсибилизатора, они могут продуцировать синглетный кислород или супероксиданионрадикал.

Первоначально метод включал в себя связанную с антителом краску малахитовый зеленый, которая позволила «выключать» ферменты щелочную фосфатазу и  $\beta$ -галактозидазу [148]. Такой вариант метода используют до сих пор, особенно в изучении функционирования нейронов [1; 138]. Основным продуктом CALI с использованием малахитового зеленого являются свободные радикалы [173]. Очевидным недостатком данного варианта метода является необходимость инъецировать краску вместе с антителом, а также вероятность того, что связывание антитела само по себе может нарушить функционирование белка [155].

Как альтернативу малахитовому зеленому также используют флуоресцин изотиоцианат, который в 50 раз более эффективен в продукции АФК [290]. Флуоресцин наиболее часто используется в комбинации с генетически-кодируемыми тагам [116]. В таком случае используют его производное FlAsH-EDT<sub>2</sub>, способное проникать через биологические мембраны [185]. FlAsH-EDT<sub>2</sub> не флуоресцирует в своей изначальной форме, но становится флуоресцентным при

связывании с тетра-цистеиновым мотивом. Другая краска, ReAsH, также связывается с тетрацистеиновым мотивом и продуцирует АФК с еще большей эффективностью, а также имеет пик возбуждения при больших световых длинах волн, что снижает вероятность вызвать повреждение молекул светом самим по себе [308]. Однако эти подходы также имеют ряд недостатков, основным из которых является неспецифическое связывание красок с богатыми цистеином белками [284; 124].

Улучшенные версии тагов помогают решить эту проблему. SNAP-таг – пептид, состоящий из 182 аминокислотных остатков. Он был получен на основании O<sup>6</sup>-алкилгуанин-ДНК-метилтрансферазы – суицидального фермента, осуществляющего репарацию ДНК с помощью переноса метила с O-метилгуанина на собственный остаток цистеина, после чего фермент не регенерирует. SNAP-таг добавляется к белку интереса посредством генетических манипуляций, после чего белок оказывается способен связывать O<sup>6</sup>-бензилгуанин-производные красок [156; 155].

Эозин – еще один фотосенсибилизатор, продуцирующий на порядок больше синглетного кислорода, чем флуоресцин. Эозин использовали в комбинации с другим пептидным тагом, HaloTag7, также созданном на основании необратимо связывающего с собой субстрат фермента [295].

При дизайне экспериментов с FlAsH, ReAsH и эозином необходимо помнить, что основным образующимся в ходе реакции фотосенсибилизации АФК служит синглетный кислород, способный к диффузии на относительно длинные расстояния, вследствие чего вполне вероятно повреждение не только целевых белков [23].

Зеленый флуоресцентный белок (GFP), а также его варианты eYFP и eCFP также использовались в CALI [242; 193; 321]. Флуоресцентные белки оказались существенно менее эффективными в продукции АФК, также они требуют больших интенсивностей светового облучения. Для решения последней проблемы



были применены подходы с дву- и многофотонным возбуждением CALI [298; 271]. Причиной низкой эффективности продукции АФК флуоресцентными белками служит большая степень изолированности хромофора от внешней среды.

### 1.3.2. KillerRed и SuperNova

KillerRed – производная форма anm2CP, нефлуоресцирующего хромопротеина *Anthomedusae sp* [49]. Белок имеет сходную с GFP структуру, но его флуорофор соединен с внешней средой напрямую через длинную полость, играющую важную роль в его функционировании как фотосенсибилизатора [231; 253]. KillerRed имеет пик возбуждения и пик эмиссии флуоресценции при 585 нм и 610 нм соответственно. Его эффективность в генерации АФК (преимущественно супероксида) на 3 порядка выше эффективности GFP [319]. Белок продуцирует в основном супероксиданионрадикал [266].

KillerRed активно использовался в CALI [81; 10; 22]. CALI с применением KillerRed позволяет специфически инактивировать структурно очень сходные изоформы белков, чего невозможно добиться с использованием антител. Таким образом были дифференцированы роли различных аквапоринов в функционировании водного баланса клетки [22].

Также KillerRed был использован для внесения повреждений в ДНК [267]. Для этого с белком гистона H2B был связан тандем KillerRed, который позволял останавливать деление клеток при облучении, при чем как *in vitro*, так и в трансгенном головастике *Xenopus*. Также использование фьюзов с белками, связывающимися с TRE-кассетами, позволило вносить при помощи KillerRed точечные повреждения в ДНК [164].

Направление KillerRed в различные органеллы с помощью специфических сигналов локализации позволяло вызывать локальный окислительный стресс в

пероксисомах [144], митохондриях [49; 270] и лизосомах [268]. Генерация АФК в митохондриях вызывала деполяризацию их мембран и каспаза-зависимый апоптоз, также апоптоз вызывали АФК, генерируемые в лизосомах. Таким образом KillerRed позволяет изучать роль локальных редокс-процессов в различных патологических процессах.

Образующиеся при активации KillerRed АФК способны нарушать целостность плазматических мембран, что оказывается смертельно для клеток. Таким образом с помощью KillerRed получалось специфически уничтожать глиальные клетки в мышинной сетчатке [52], специфические типы нейронов в мозге *Danio rerio* [168; 79] и *C. elegans* [159; 333], что позволило изучить функции различных нейрональных путей.

Стимуляция клеточной гибели и запуск патологических процессов – не единственная область применения KillerRed. Белок успешно применялся в изучении физиологических процессов, таких как АФК-кальциевый кросс-ток между митохондриями и ЭПР [39]. В ходе эксперимента было показано, что локальные выбросы кальция из цистерн ЭПР вызывают локальное повышение концентрации пероксида водорода. Генерации малых количеств АФК на мембране митохондрий при помощи KillerRed в свою очередь также способны вызвать кальциевые токи из ЭПР.

С помощью KillerRed было имитировано действие NOX2 и показана необходимость участия АФК в запуске демонстрации антигена дендритными клетками [83].

Использование KillerRed с митохондриальным сигналом локализации позволило изучить локальное сокращение числа дендритных шипиков каспаза-зависимым образом [92]. Данный процесс ограничивается с помощью протеасом и белками группы ингибиторов апоптоза и не приводит к апоптотической смерти нейрона. Фармакологические и генетические подходы активации каспазы-3 в таком случае не позволяют добиться локальности процесса, но это удается при

использовании KillerRed, продуцирующего АФК только в местах облучения светом определенной длины волны.

Внесением точечной замены в хромофор KillerRed был создан его вариант KillerOrange, имеющий два пика возбуждения флуоресценции (455 нм и 514 нм) и один пик эмиссии (555 нм) [260]. Белок имеет высокий уровень фототоксичности и может быть использован параллельно с KillerRed. Другой интересной модификацией KillerRed является его фьюз с люциферазой KillerFirefly, функционирующий за счет биOLUMИнесцентного резонансного переноса энергии [141].

Основным недостатком KillerRed является то, что белок существует в форме димера и способен значительно нарушать подвижность связанного с ним белка [273], поэтому внесением нескольких точечных мутаций была создана его мономерная форма SuperNova [296]. SuperNova обладает близкими свойствами по возбуждению и эмиссии флуоресценции и по способности генерировать АФК. SuperNova успешно использовался для CALI [311; 157; 142; 133], а также для направленной генерации АФК в ряде органелл [220].

### 1.3.3. miniSOG

miniSOG – маленький мономерный белок (106 аминокислотных остатков), созданный на основе фоточувствительного белка фототропина 2 *Arabidopsis thaliana* [275]. Изначально miniSOG был создан для целей электронной микроскопии и использовался для окисления диаминобензидина образующимся при освещении синглетным кислородом [51; 179].

Фототропин содержит LOV-домен, связывающий FMN, который сам по себе является фотосенсибилизатором [15]. При поглощении света FMN формирует связь с остатком цистеина LOV-домена белка, что изменяет его

структуру и служит для детекции света растением. В miniSOG этот остаток цистеина был заменен на остаток глицина, вследствие чего поглощенная FMN энергия может быть потрачена на образование АФК. miniSOG поглощает свет длиной волны 488 нм и флуоресцирует при 500 и 528 нм [255]. Эффективность miniSOG зависит от концентрации FMN [256]. Основным продуктом его фотоактивации изначально считался синглетный кислород, но позже было показано, что белок продуцирует большое количество супероксида [229].

Белок активно применяется в CALI. С помощью фьюза miniSOG с белками пресинаптических везикул добивались ингибирования выброса медиатора активированными нейронами [244]. Применение CALI при экспрессии такого фьюза в *C. elegans* позволяло добиться обратимого паралича червя [174].

Также miniSOG активно использовался для направленного убийства клеток: интернейронов и моторных нейронов *C. Elegans* [106; 109], клеток рака молочной железы [200]. С помощью miniSOG получалось добиться и внесения мутаций в геном *C. Elegans* [212].

Внесением мутаций в ген, кодирующий miniSOG, были получены его версии SOPP и SOPP3, обладающие повышенным уровнем генерации синглетного кислорода [330; 331].

#### 1.3.4. Оксидаза D-аминокислот

Оксидаза D-аминокислот (DAAO) – FAD-зависимый фермент пероксисом, катализирующий окислительное дезаминирование D-аминокислот с образованием соответствующей  $\alpha$ -кетокислоты и аммония (рисунок 5). Восстановленный FAD окисляется затем молекулой кислорода с образованием пероксида водорода. DAAO была открыта более 85 лет назад [161]. С тех пор DAAO была описана у

множества про- и эукариотических видов. Не встречается она только у растений за исключением *Chlorella vulgaris* [230].

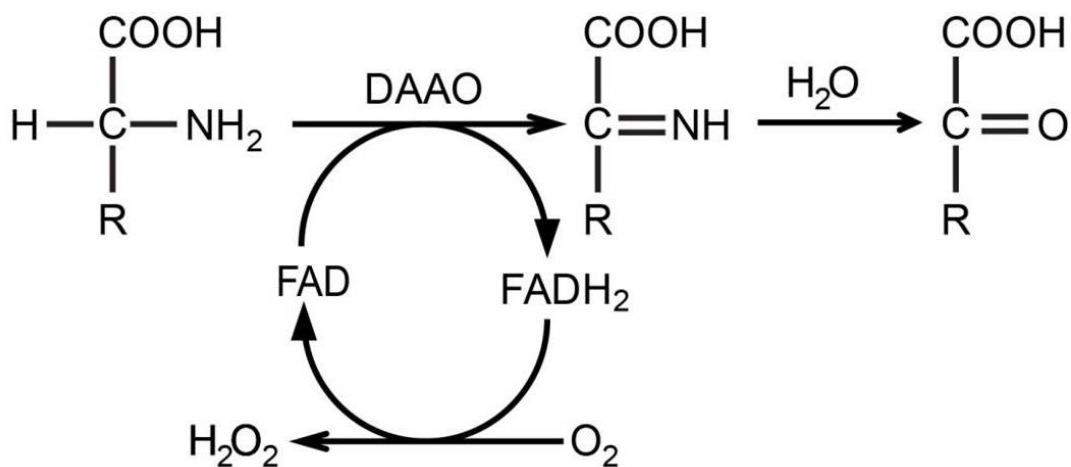


Рисунок 5 – Схема функционирования DAAO

DAAO *Rhodotorula gracilis* (RgDAAO) активно используется в биотехнологических производствах для каталитического преобразования цефалоспорина C в 7-аминоцефалоспоровую кислоту. Механизм ее действия, биохимические свойства и субстратная специфичность хорошо описаны, поэтому именно эта форма была выбрана в качестве генератора АФК [122]. DAAO дрожжей менее склонна к окислению и инактивации образующимся пероксидом водорода, чем другие хорошо изученные изоформы, экспрессирующиеся в клетках млекопитающих [233]. Также она имеет более высокую каталитическую активность вследствие особенностей регуляции доступа субстрата к активному центру. Фермент существует в форме димера, что позволяет стабилизировать связывание FAD.

Активность фермента и количество образующегося пероксида водорода легко регулируется через манипуляцию концентрацией доступного субстрата, который, как правило, присутствует в эукариотических клетках в следовых количествах [122]. Использование D-аланина в концентрациях 1-10 мМ в клеточной среде позволяло создавать в клетках концентрации пероксида водорода

от 10 до 100 нм, что позволяет моделировать как физиологические, так и патологические процессы [190].

Основным продуктом DAAO служит пероксид водорода – АФК, играющий наиболее важную роль в редокс-сигналинге клетки. DAAO – незаменимый инструмент в изучении редокс-зависимых процессов, например, особенностей эмбрионального развития. Известно, что во многих развивающихся тканях существуют градиенты пероксида водорода. С помощью DAAO были определены особенности формирования градиента гомеобелка Engrailed в формирующемся мозге *Danio Rerio* под воздействием разницы редокс-статусов различных его частей [6].

С помощью DAAO была показана существенная разница в активации различных путей фосфорилирования в эндотелиальных клетках при генерации пероксида водорода в ядре, цитозоле и кавеолах клеток и при внесении внешнего  $H_2O_2$  [258]. Возможность локализовать DAAO в определенных органеллах не раз использовалась для изучения взаимодействия пулов редокс-активных соединений различных компартментов [274; 283].

Значимость пересечения сигнальных путей, зависящих от кальция и от АФК, давно известна. С помощью DAAO был показан еще один механизм взаимодействия двух систем: пероксид водорода ингибирует депо-управляемый вход кальция (Store-operated calcium entry, SOCE) – процесс, важный для пролиферации и дифференцировки клеток [112].

Также с помощью DAAO изучали роль пероксида водорода в действии противораковых препаратов [136].

Таким образом, бесспорными достоинствами DAAO как генератора АФК служат:

- Основной продукт –  $H_2O_2$  – также является основной сигнальной редокс-молекулой

- Фермент абсолютно не активен в отсутствии субстрата
- Количество образующегося  $H_2O_2$  можно регулировать через доступ фермента к определенным количествам субстрата
- Существует возможность варьировать последовательность гена фермента и создавать его фьюзы с другими белками или сигналами направленного клеточного транспорта, таким образом, добиваясь компарментализации образующегося пероксида водорода

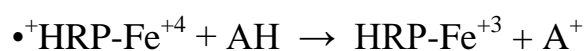
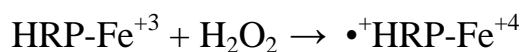
К минусам DAAO можно отнести его потребность в димеризации для функционирования, а также вероятную невозможность его использования в тех тканях, где предполагается наличие D-аминокислот. В различных отделах мозга обнаружена активность фермента серинрацемазы, катализирующего рацемизацию L- и D-серина [336]. Связывание D-серина необходимо для активации NMDA-рецепторов [74], вследствие чего данная аминокислота присутствует в клетках мозга в значимых концентрациях. Также в тканях мозга обнаружен D-аспарат, за чей синтез также отвечает серинрацемаза [143].

#### 1.4. Детекция пероксида водорода

Для детекции пероксида водорода было создано множество методов, в том числе основанных на применении нанотрубок [344], гиперполяризации [175], ультразвука [215], масс-спектрометрии [71] и хемилюминесцирующих наночастицах [169]. В этой главе основное внимание будет уделено флуоресцентным краскам и генетически-кодируемым биосенсорам, как получившим наиболее широкое применение в изучении сигнальных функций пероксида водорода.

### 1.4.1. Методы, основанные на использовании HRP

Один из самых чувствительных и специфичных для оценки внеклеточного пероксида водорода методов основан на способности пероксидазы хрена катализировать  $\text{H}_2\text{O}_2$ -зависимое окисление детекторного вещества, поставляющего реакции электроны [44].



Где  $\bullet^+\text{HRP-Fe}^{+4}$  – катион-радикал феррилпорфирина HRP

Данный метод позволяет использовать флуоресценцию или UV/видимую спектрофотометрию для определения  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Возможно определение угасания флуоресценции изначально флуоресцентного вещества (скополетин) [44] или же увеличения флуоресценции образующегося вещества из изначально не флуоресцентного: диацетилдихлорофлуоресцина [96], р-гидроксифенилацетата [137], гомованиловой кислоты (3-метокси-4-гидроксифенилуксусная кислота) [254] или Amplex Red (N-ацетил-3,7-дигидроксифеноксазин) [345]. Также могут использоваться не-флуоресцентные краски такие как тетраметилбензидин [281], образующие после окисления окрашенные соединения.

Метод получил популярность в 60-80е для изучения лейкоцитов, способных продуцировать пероксид водорода в больших количествах. В то время скополетин и гомованиловая кислота считались очень чувствительными пробами в этой модели, однако концентрации  $\text{H}_2\text{O}_2$  в ней во много раз превосходит те, что считаются сейчас физиологическими. С развитием концепта клеточного сигналинга потребовалась разработка более чувствительных красок.

Amplex Red – бесцветное не-флуоресцентное вещество, окисляемое HRP в резорурфин. С его помощью можно определить до 5 пикомоль/л  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Amplex Red обладает рядом недостатков. Он высоко фоточувствителен и на свету формирует резорурфин без участия фермента. HRP катализирует образование резорурфина в



присутствии пероксинитрита [78]. Митохондриальные карбоксилэстеразы образуют резорруфин даже в отсутствие кислорода,  $H_2O_2$  или пероксидаз.

Даже следовые концентрации каталазы в сыворотке в клеточной среде приводят к занижению оцениваемой концентрации пероксида водорода независимо от типа используемой краски.

Данный метод применим для широкого круга образцов, таких как ткани растений [48; 60] и животных [13], кровеносные сосуды животных [292], клеточные системы [53; 146] и выделенные митохондрии [293].

Amplex Ultrared – более стабильное и потенциально более чувствительная краска на пероксид водорода была применена в сочетании с микродиализом тканей и органов крыс *in vivo* [163].

#### 1.4.2. Краски на основе бороната

Первые сведения о способности пероксида водорода реагировать с боронатами были получены еще в 1930 г [2], они вдохновили первые краски, созданные в 2003 г, на данный момент их более 20 и это один из самых быстро развивающихся классов красок [199; 4; 82; 176; 197]. Основанные на боронате краски – органические соединения, несущие борный электрофильный центр, связанный с функциональными группами различных классов: алифатическими, ароматическими, флуорогенными или несущими в своем составе люциферин. В мягких щелочных условиях эти краски взаимодействуют с  $H_2O_2$  с образованием соответствующего гидроксила или фенола с высвобождением соответствующей функциональной группы, вызывающей изменение в поглощении пробы, ее флуоресценции или FRET. Использование данного типа красок не сложно, но требует высокой концентрации краски.

Краски этого класса успешно применялись в клеточных культурах для изучения диффузии  $H_2O_2$  через аквапорины [198] и *in vivo* [317], однако большая часть экспериментов проводилась в условиях оверэкспрессии или добавленного извне пероксида водорода. Также была показана даже большая чувствительность большей части красок этого класса к пероксинитриту, чем к пероксиду водорода [276; 346], что ставит под сомнение полученные с их помощью данные.

#### 1.4.3. 2',7'-дихлородигидрофлуоресцин

Окисление 2',7'-дихлородигидрофлуоресцина (DCFH) приводит к образованию флуоресцентного продукта 2',7'-дихлорофлуоресцина, эта реакция была изначально предложена как специфическая для детекции пероксида водорода [219]. Метод крайне прост и пользуется огромной популярностью для детекции внутриклеточного (с использованием диацетатной формы краски) и внеклеточного  $H_2O_2$ . Однако многие исследования сейчас указывают на недостатки DCFH как краски на  $H_2O_2$ .

DCFH не способен реагировать с пероксидом водорода напрямую без следовых количеств редокс-активных металлов (железо, медь), вариация в внутриклеточной концентрации этих металлов значительным образом влияет на результаты экспериментов [252; 38; 297].  $H_2O_2$ -зависимое окисление DCFH также в большой степени зависит от присутствия гем-содержащих компонентов таких как гематин, пероксидазы или цитохром с [252; 166; 59]. В их присутствии к окислению DCFH также способны гидропероксиды липидов. Пероксидазы и редокс-активные металлы способны вызывать окисление DCFH и в отсутствие пероксида водорода [166; 165]. Одноэлектронное окисление DCFH приводит к формированию радикала DCFH, который легко реагирует с кислородом с образованием супероксида, который дисмутирует с образованием дополнительного пероксида водорода, в результате чего флуоресцентный сигнал

оказывается искусственным образом завышен [38]. К окислению DCFH также способны пероксинитрит, гидроксильный радикал и HOCl [75].

Дигидрородамин 123 (DHR) – аналог DCFH, накапливающийся в митохондриях также обладает многими из вышеперечисленных недостатков.

#### 1.4.4. Биосенсоры, основанные на roGFP

Сенсоры семейства roGFP (redox-sensitive green fluorescent proteins) были созданы путем встраивания двух цистеинов в 147 и 204 позиций смежных  $\beta$ -листов поверхности GFP [119]. Эти цистеины находятся в достаточной близости от хромофора, чтобы при формировании дисульфидной связи изменения в конформации белка приводили к изменению интенсивности флуоресценции [119]. Хромофор GFP состоит из трех аминокислот Ser65, Tyr66 и Gly67. Эти аминокислоты подвергаются пост-трансляционной модификации циклизации, после которой происходит дегидратация и окисление с формированием зрелого хромофора. Фенольный кислород хромофора может существовать в нейтральной (протонированной) и анионной (депротонированной) формах, которые имеют два отдельных выраженных пика возбуждения флуоресценции [45]. Протон обратимо переходит от Tyr66 к Glu222 с задействованием Ser205. Небольшие структурные изменения ведут к значительным изменениям в уровне протонирования Tyr66, что отражается в противоположных сдвигах интенсивностей максимумов возбуждения флуоресценции.

Изначально было создано 2 версии сенсора, которые использовались для измерения редокс-статуса клеток, но не для изучения сигнальных процессов клетки, т.к. реакция roGFP с  $H_2O_2$  происходит медленно. При этом чувствительными сенсоры являлись только в относительно восстановленной среде ( $E'^0$  -291 и -280mV для roGFP1 и roGFP2 соответственно). Для преодоления

этих затруднений, roGFP2 был слит с пероксидазой Orp1 (Gpx3) *Saccharomyces cerevisiae*, гомологом глутатионпероксидаз 4 и 5 млекопитающих [117]. Идея данного фьюза основана на модели редокс-эстафеты (рисунок 6), в которой редокс-чувствительный цистеин специфично окисляется пероксидом водорода в сульфеновую кислоту, после чего передает окисление целевому белку. На данном механизме основана активация Orp1-Yap дрожжей [304], а также пероксиредоксин 2-STAT3 клеток млекопитающих [280].

Сенсор roGFP-Orp1 состоит из Orp1, фьюзированной с C-концом roGFP с помощью линкера, состоящего из 32 аминокислот, что гарантирует гибкость и подвижность частей белка. Сенсор является ратиометрическим с двумя пиками возбуждения флуоресценции 405 и 488 нм и эмиссией в районе 510-530 нм. Ратиометрическое увеличение сигнала 405/488 происходит при увеличении концентрации пероксида водорода или снижении скорости обратного восстановления тиоредоксинами, глутатионредуктазами или глутатионом. Сигнал не является рН-чувствительным.

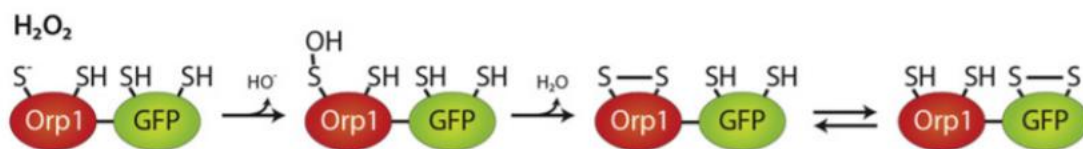


Рисунок 6 - Схема функционирования roGFP-Orp1 [5]

Динамический диапазон roGFP-Orp1 не велик, но позволяет использовать его не только в клеточных моделях [3; 123; 127; 130], но и *in vivo* при развитии *Drosophila* [5] и в сердечной ткани живой *Danio rerio* [223].

На идее редокс-эстафеты построен также биосенсор roGFP2-Tsa2, в структуре которого к roGFP добавлен Tsa2 – пероксиредоксин *S. cerevisiae* [206]. Данный биосенсор оказывается окислен на ~50% в клеточных «нормальных»

условиях без стресса, вследствие чего способен реагировать на изменение редокс-статуса клетки в любую из двух сторон. roGFP2-Tsa2 был использован *in vivo* в изучении роли пероксида водорода в развитии *C. Elegans* [126]. Похожими свойствами обладает roGFP2-Trx1.C169S, сконструированный на основании пероксиредоксина Trx1 из *Schizosaccharomyces pombe* [56].

#### 1.4.5. FRET-биосенсоры

С использованием редокс-чувствительных белков дрожжей Orp1 и Yap1 были сконструированы два FRET-сенсора на пероксид водорода OxyFRET и PerFRET [89]. В обоих случаях H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-чувствительные участки встроены между флуоресцентными белками Cerulean и Venus. Биосенсор OxyFRET включает N- и C-концевые домены Yap1, богатые цистеином. Биосенсор PerFRET в качестве сенсорной части содержит белок Orp1 и C-концевой домен Yap1. Пероксид водорода вызывает пропорциональное его концентрации нарастание и угасание FRET-сигнала OxyFRET и PerFRET, соответственно. Оба сенсора незначительно чувствительны к изменениям pH.

#### 1.4.6. Семейство биосенсоров HyPer

В семейство на данный момент входит 5 сенсоров: HyPer [28], HyPer2 [187], HyPer3 [34], HyPer7 [222], HyPerRed [90]. Функционирование биосенсоров HyPer основано на структурных перестройках в редокс-чувствительном домене OxyR *E. Coli* (рисунок 7), связанным через короткие пептидные линкеры с циклически пермутированным флуоресцентным белком cpYFP (cpmApple в случае с HyPerRed). В результате окисления редокс-чувствительного цистеина OxyR в сульфеновую кислоту он покидает гидрофобный карман и реагирует с другим

цистеином OxyR, в результате формируется дисульфидный мостик [66], а структура сенсора изменяется с одновременным изменением его флуоресцентных свойств. Основанные на cpYFP НуPer являются ратиометрическими сенсорами: они обладают двумя пиками возбуждения флуоресценции в 420 нм и 500 нм и одним пиком эмиссии в 520 нм, при окислении сенсора интенсивность флуоресценции возбуждаемой светом в 420 нм снижается, а в 500 нм пропорционально повышается.

Первая версия биосенсора обладала узким диапазоном ответа (на уровне roGFP-Orp1) в клеточных условиях. К счастью, небрежность при рутинном переклонировании привела к открытию НуPer2, отличающимся от НуPer точечной мутацией Ala406Val и имеющим значительно более широкий диапазон ответа, но существующий в клетках в форме димера и обладающий меньшей чувствительностью. Из него позже был создан НуPer3 – биосенсор со сниженным с помощью точечной мутации His34Tyr уровнем димеризации. Ощутимым минусом этих сенсоров является их высокая рН-чувствительность в физиологическом диапазоне - контрольные конструкции Cys199Ser, не чувствительные к пероксиду водорода, даже используются в качестве самостоятельных рН-сенсоров под названием SypHer [91; 191; 232].

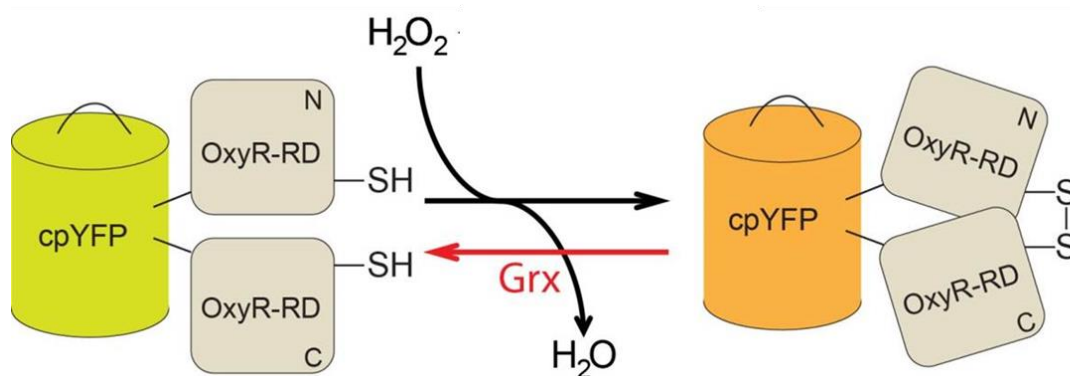


Рисунок 7 – Схема строения сенсоров семейства НуPer

Новейшая версия биосенсора семейства – HyPer7 [222]. HyPer7 несет OxyR из *Neisseria meningitides* и несколько мутаций в cpYFP. Вследствие внесенных изменений сенсор оказался ярче, потерял pH-чувствительность, но приобрел редчайшую для биосенсоров чувствительность к пероксиду водорода, вследствие чего может функционировать только в условиях его физиологических концентраций.

Отдельно стоит упомянуть версию биосенсора TriPer. Вышеперечисленные биосенсоры были непригодны для использования в окислительных условиях люмена ЭПР [196], т.к. редокс-чувствительный цистеин в них оказывался окислен и реагировал со вторым цистеином OxyR с формированием дисульфидной связи. Для решения задачи измерения концентраций пероксида водорода в ЭПР в структуру биосенсора был введен третий цистеин, вследствие чего часть дисульфидных связей перестраивалась и редокс-чувствительный цистеин оказывался свободен для взаимодействия с H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

Еще одним аналогом HyPer является NeonOxIrr, cpYFP в котором заменен на cpNeonGreen [286]. Данный сенсор отличается крайне медленной скоростью восстановления, вследствие чего хорошо подходит для отображения концентраций пероксида водорода в фиксированных образцах, обработанных в процессе приготовления N-этилмалеимидом – алкилирующим тиолы агентом. Это позволяет получить «фотографии» распределения H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, существовавшего в живой ткани.

Биосенсоры семейства HyPer снискали широкую популярность и были использованы в изучении роли пероксида водорода на процессы, протекающие в отдельных компартментах клеток, клетках, тканях и *in vivo* в целых организмах, таких как *C. Elegans*, *Danio rerio* и *Xenopus laevis* [33].

## 2. Материалы и методы

### 2.1. Материалы

#### 2.1.1. ДНК-векторы

pC1-HyPer (Евроген), pTagRFP-keratin (Евроген), pCMV-DAO (синтезированный конструкт), pCMV-HyPer-DAO, pHyPer-nuc (Евроген), pC1-HyPer-Red (Addgene 48249), pC1-HyPer3 (Addgene 42131), pHyPer-dMito vector (Евроген), pCAGGS-Raichu-RhoA-CR (Addgene 40258), pcs2-HyPer7, pAAV-CMV, pLVT-1 (Евроген)

#### 2.1.2. Реактивы и расходные материалы для молекулярно-биологических работ

Набор реактивов Tersus Plus PCR kit для ПЦР, T4 ДНК лигаза с 5X Quick ligation, набор для выделения плазмидной ДНК Plasmid Miniprep, набор Plasmid Midiprep 2.0, набор для очистки ДНК из геля и реакционных смесей Cleanup Standard, 10X Overnight ligation буферами, готовая смесь для ПЦР ScreenMix (Евроген); NEBuilder HiFi DNA assembly system (New England Biolabs), набор Plasmid Midi Kit (100) (Qiagene); набор diaGene для элюции ДНК из агарозного геля и реакционных смесей (Диа-М); ферменты рестрикции BamHI, NheI, Sall, BglII, AgeI, EcoRI, XbaI, HindIII в соответствующих буферах, ДНК-маркёры 1Kb (SibEnzyme). Компетентные химические и электрические клетки штамма X11 Blue (Invitrogen); канамицин, ампициллин, этанол 95%, агароза, изопропанол (ПанЭко), AzuraQuant cDNA synthesis kit, AzuraQuant Green Fast qPCR Master Mix (Azura Genomics), Protoscript II first strand cDNA synthesis kit (New England Biolabs). ДНК-



электрофорез проводили в Трис-ацетатном буфере (40 мМ Трис-ацетат, 1 мМ ЭДТА, рН 8.0), пробы наносили в буфере с добавками (0.25% бромфеноловый синий, 50% глицерин).

Секвенирование и синтез праймеров осуществляла компания Евроген, Россия.

### 2.1.3. Бактериальные среды

Среда LB (0,5% дрожжевой экстракт; 1% триптон; 0,1% NaCl; 0,01 мМ Трис-HCl, рН 8,0).

Среда SOB (0,55% дрожжевой экстракт; 2% триптон; 10 мМ NaCl; 10 мМ KCl; 20 мМ Mg<sup>2+</sup>; 0,01 мМ Трис-HCl, рН 8,0).

### 2.1.4. Оборудование и программное обеспечение для молекулярно-биологических работ

Камера для электрофореза Mini-Sub Cell GT, источник питания PowerPac Basic, электропоратор MicroPulser (Bio-Rad); магнитная мешалка MS-3000 (BioSan); центрифуга Centrifuge 5810 R, центрифуга Minispin, автоматические пипетки (Eppendorf); NanoDrop 2000 (Thermo Scientific), настольный термостат Гном (ДНК-Технология); бактериальный термостат BD 115 (Binder); амплификатор Biorad C-1000 Touch (MJ Research); анализатор изображения Alpha Imager 2000, УФ-трансиллюминатор TFP/M/WL (Alpha Innotech Inc.); настольная центрифуга CM-6M (ELMI), StepOneplus RT-PCR thermocycler (Applied Biosciences)

Для конструирования векторов использовали программу SnapGene и онлайн-сервис Benchling, для анализа ДНК-последовательностей – SeqMan пакета DNASTAR.

#### 2.1.5. Эукариотические клеточные линии, культуральные среды и расходные материалы

Клеточные линии HEK 293 и HeLa Kyoto предоставлены лабораторией Carsten Schultz, EMBL Heidelberg. Клетки линии PC-12 предоставлены лабораторией Jürgen Klingauf, Institut für Medizinische Physik und Biophysik, Münster.

Среда DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium), пенициллин-стрептомицин 100х, раствор Версена, трипсин, FBS, MEM (ПанЭко); трансфекционный агент FuGENE HD (Promega); добавка GlutaMAX 100х, раствор HBSS (Hanks' Balanced Salt Solution) без кальция и магния 10х, DMEM, MEM, B27 50х, Инактивированная лошадиная сыворотка (HI-HS), NGF (Gibco), трансфекционный агент Lipofectamine LTX, среда Neurobasal, поли-D-лизин mol wt 70,000-150,000, краситель TO-PRO 3 Ready Flow Reagen, соли Tyrode, трансфекционный агент Effectene 3000 (Invitrogen); буферный раствор HEPES 1M (Хеликон), RGD-пептид (Sigma), микроскопные стекла 18 мм (Glaswarenfabrik Karl Hecht GmbH, Sondheim, Germany), трипановый синий, бикарбонат натрия, D-глюкоза, планшеты 24-луночные и 96-луночные, культуральные чашки

Protein Assay Kit (Sigma-Aldrich), трансфектин (Bio-Rad), набор реагентов для электропорации Mouse Neuron Nucleofector Kit (Lonza), GSH/GSSG Ratio Detection Assay Kit II, Thioredoxin Reductase Assay Kit (Abcam).

Раствор Кребса-Рингера (140 mM NaCl, 5 mM KCl, 2 mM CaCl<sub>2</sub>, 1 mM MgCl, 10 mM D-глюкозы, 10 mM HEPES; pH 7.4)

### 2.1.6. Оборудование для работы с клеточными линиями

Ламинарный бокс 2го класса защиты (ESI-FluFrance), CO<sub>2</sub>-инкубатор (Thermo Scientific), водяная баня.

### 2.1.7. Оборудование и программное обеспечение для имаджинга

Конфокальный микроскоп TSC SP2, широкопольный флуоресцентный микроскоп Leica DMI 6000B (Leica Microsystem), флуоресцентный микроскоп BZ-9000 (Keyence).

Для анализа изображений использовали программу ImageJ (EMBL), обработка полученных данных – в OriginPro (OriginLab).

### 2.1.8. Соединения, использовавшиеся при имаджинге

D-аланин, D-норвалин, D-норлейцин, D-серин, D-треонин, D-лизин, D-аргинин, L-бутионин-сульфоксимин (BSO), 3-амино-1,2,4-триазол (3-AT), ауранофин (Sigma-Aldrich); AlamarBlue (Bio-Rad); Tri-1; H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, L-аланин (Диа-М)

## 2.2. Молекулярно-биологические методы

### 2.2.1. Амплификация ДНК методом полимеразной цепной реакции (ПЦР)

Для амплификации фрагментов ДНК использовали ген-специфичные праймеры. Реакционная смесь для ПЦР содержала следующие компоненты: матричная ДНК (1-10 нг), термостабильную полимеразу Tersus, буфер полимеразы Tersus 10x, прямой и обратный олигонуклеотидные праймеры (10 мкМ), смесь dNTP. Суммарный объем реакции составлял 50 мкл. Для проведения реакции использовали следующий протокол:

- 1) 95°C – 1 минута
- 2) 95°C – 30 секунд
- 3) 59-61 °C – 30 секунд
- 4) 72 °C – 1 минута на 1 kb фрагмента
- 5) 72 °C – 5 минут

Проводили 21-25 циклов амплификации пунктов 2-4, пункты 1 и 5 выполнялись единожды.

В случае необходимости получения генов, кодирующих фьюзы двух белков или при внесении точечных замен в последовательности, был использован метод overlap extension PCR cloning. В этом случае применялись две пары праймеров: концевые обычной длины и более длинные, несущие в себе последовательности, перекрывающиеся с концами второй половины фьюза. Также в этом случае использовали более сложную программу амплификации, включающую стадию, при которой ПЦР осуществлялась с помощью этих перекрывающихся участков без участия концевых праймеров, после чего эти праймеры добавляли в ПЦР-смесь для амплификации полной последовательности.

### 2.2.2. Электрофорез в агарозном геле

Разделение и анализ длин фрагментов ДНК проводили с помощью электрофореза в 1-2% агарозном геле, приготовленном на буфере TAE.

Визуализацию ПЦР-продуктов проводили с использованием бромистого этидия (0.5 мкг/мл). Идентификация длин фрагментов проводилась с помощью маркера 1kb DNA Ladder, пробы вносили в смеси с буфером 4X Gel Loading Dye, Blue. Для проведения электрофореза использовали камеры, наполненные TAE-буфером, при напряжении на источнике тока 100-140V.

Для оценки результатов электрофореза использовали трансиллюминатор TF20M с УФ-лампой и камерой.

Фрагменты, соответствующие по длине ожидаемому продукту, вырезали из геля при помощи скальпеля. Полученные кусочки геля, содержащие фрагменты ДНК, подвергали экстракции ДНК при помощи набора Cleanup Standard согласно протоколу производителя.

### 2.2.3. Рестрикция

Рестрикцию проб ДНК проводили при помощи эндонуклеаз рестрикции FastDigest в буфере FastDigest Green (ThermoFisher). Пробы инкубировали с рестриктазами при 37°C в течение 15-45 минут, после чего анализировали с помощью электрофореза в агарозном геле, после чего осуществляли очистку при помощи набора Cleanup Standard.

### 2.2.4. Лигирование ДНК фрагментов

Лигазную реакцию фрагментов ДНК проводили с помощью лигазы фага T4 в соответствующем буфере. Соотношение вектора и вставки варьировалось в зависимости от длин использовавшихся фрагментов и составляло от 1:3 до 1:10 соответственно. Реакционную смесь инкубировали при 14°C ночь в

твердотельном термостате. Также использовали вариант быстрого лигирования в 5X Quick ligation buffer. В этом случае смесь оставляли на столе на 15 минут, после чего весь объем использовали для химической трансформации клеток XL Blue.

#### 2.2.5. Трансформация методом «heat-shock» химически-компетентных E.coli

Использовали химически-компетентные клетки E.coli штамма XL1-Blue. Фасовку клеток объемом 75 мкл размораживали на льду в течение 5-10 минут, вносили плазмидную ДНК в количестве 1-50 нг. После добавки ДНК клетки инкубировали 20 минут на льду, переносили на 45 секунд в твердотельный термостат, нагретый до 42°C, подвергая их таким образом тепловому шоку. Затем клетки переносили в ледяной SOB на 3 минуты. Суспензию подращивали при 37°C в течение 45-60 минут, после чего рассеивали на чашки с твердой средой LB-агар, содержащей селективный антибиотик, и инкубировали ночь при 37°C.

#### 2.2.6. Электрическая трансформация электрически-компетентных клеток E.coli

Электрически-компетентные клетки E.coli штамма XL1-Blue в течение 5-10 минут размораживали на льду, после чего вносили лигазную смесь объемом не больше 1\10 аликвоты клеток и сразу же перемещали в охлажденные на льду кюветы для электропорации. Осуществляли электропорацию согласно протоколу производителя прибора MicroPulser, после чего переносили клетки в 1 мл охлажденного SOB, подращивали при 37°C в течение 45 минут, рассеивали на

чашки с твердой средой LB-агар, содержащей селективный антибиотик, и инкубировали ночь при 37°C.

#### 2.2.7. Скрининг бактериальных клонов

Выросшие на селективном антибиотике колонии бактерий скалывали при помощи зубочисток и переносили в 10мкл предварительно замешанной смеси Screenmix и специфичных к ДНК-вставке праймеров, проводили ПЦР и проверяли наличие ДНК-фрагментов необходимой длины методом электрофореза в агарозном геле.

#### 2.2.8. Выделение плазмидной ДНК

Плазмидную ДНК нарабатывали в полученных путем химической или электрической трансформации клетках *E.coli* штамма XL1-Blue. Для этого часть клонов переносили в среду LB объемом 4-100 мл, содержащую селективный антибиотик и оставляли на ночь (10-16 часов) при 37°C и при постоянном перемешивании. Плазмидную ДНК из биомассы бактерий выделяли при помощи китов Plasmid Miniprep, Plasmid Midiprep или QIAGEN-tip 100 согласно протоколу производителя. Концентрацию плазмидной ДНК и ее частоту в элюате оценивали при помощи NanoDrop2000.

#### 2.2.9. Получение локализованных в различных клеточных компартментах конструкторов

pCAGGS-HyPer-кератин был создан методом overlap extension PCR cloning. HyPer был амплифицирован с pC1-HyPer с помощью 5`-GCAACGCCTCTGACGGTGGTGGGTCTGGTGGTATGGAGATGGCGAGCCAGC-3` и 5`-AATTTCTAGATTAAACCGCCTGTTTTAAAАСТТТATCGAAATGGC-3` праймеров. Кератин был амплифицирован с pTagRFP-keratin с помощью 5`-AATTGAATTCGCCACCATGAGCTTCACCACTCGCTCCA-3` и 5`-CCACCGTCAGAGGCGTTGCCCCCAGTTCCGGAATGCCTCAGAACTTTGGTGT CATTGGT-3`. Получившийся ПЦР-продукт рестрицировали EcoRI и XbaI, после чего лигировали в pCAGGS-Raichu-RhoA-CR.

Для получения pC1-DAAO-NLS, DAAO был амплифицирован с pCMV-DAAO с помощью праймеров 5`-ACCGCTAGCGCCACCATGCAATTGCACAGCCAGAAGAGG -3` и 5`-ACCAAGCTTTTACTACSTTTCTCTTCTTTTTTGGATCTACSTTTCTCTTCTTTT TTGGATCTACSTTTCTCTTCTTTTTTGGATCGCTCTCCCTAGCTGCGC-3`, после чего рестрицирован NheI и HindIII и лигирован в pHyPer-nuc на место HyPer.

Для получения pC1-DAAO-NES, DAAO был амплифицирован с pCMV-DAAO с помощью праймеров 5`-ACCGCTAGCGCCACCATGTCCGTCCTGACGCC-3` и 5`-ACCAAGCTTTTACAGGGTCAGCCGCTCCAGGGGGGGCAGGCTCTCCCTAGC TGCGC-3` после чего рестрицирован NheI и HindIII и лигирован в pHyPer-nuc на место HyPer.

Для получения pC1-HyPerRed-NLS, HyPerRed был амплифицирован с pC1-HyPer-Red с помощью праймеров 5`-AATTGCTAGCGCCACCATGGAGATGGCGAGCCAGC-3` и 5`-AATTAGATCTGAGTCCGGAACCGCCTGTTTTAAAАСТТТATCGAAATGGC-3`. ПЦР-продукт был рестрицирован с помощью NheI и BglII и лигирован в pHyPer-nuc.



Для получения рLCMV-НyPer3-mito, НyPer3 был амплифицирован с рС1-НyPer3 с помощью праймеров 5`-  
 АТСТGGАТССАССGGТССGСАСGGАGАТGGСGАGССАGСА-3` и 5`-  
 СGСАGТССGАСТТАААССGССТGТТТТААААСТТТАТСG-3`, рестрицирован с  
 помощью VamHI и SalI. Двойной сигнал митохондриальной локализации был  
 вырезан из рНyPer-dMito с помощью рестриктаз NheI и VamHI, после чего оба  
 фрагмента были лигированы в рLCMV-Puro вектор.

Последовательности всех полученных конструкторов были подтверждены  
 методом секвенирования.

#### 2.2.10. Получение генетических конструкторов DAAO с измененной субстратной специфичностью

Для получения замены Y236A последовательность НyPer-DAAO  
 амплифицировали с помощью двух пар праймеров 5`-  
 ААТАGААТТССGССАССАТG GАGАТGGСАAGССАGСАG-3`, 5`-  
 GGТСССААТССGССGАСТССGGСGGТТССGССАСАGАТСАСТТС-3` и 5`-  
 GАAGТGАТСТGTGGСGGAАССGССGAGТССGGСGАТТGGGАСС-3`, 5`-  
 ААТАТСТАGАТСАGСТТСССТАGСТGС-3` методом overlap extension PCR  
 cloning с вектора рс1-НyPer-DAAO, рестрицировали с помощью рестриктаз EcoRI  
 и XbaI и лигировали в рСАGGS-Raichu-RhoA-CR.

Последовательности всех полученных конструкторов были подтверждены  
 методом секвенирования.

#### 2.2.11. Получение конструкторов с НyPer7

pLVT-1-HyPer7-DAAO был создан методом overlap extension PCR cloning. HyPer7 был амплифицирован с pcs2-HyPer7 с помощью 5`- AACAGCTAGCGCCACCATGCACCTGGCTAATG-3` и 5`- CCACCGGTTCCACCTCCGGTATCGCAGATGAAGCTAACACCATGCAG-3` праймеров. DAAO была амплифицирована с pc1-HyPer-DAAO с помощью 5`- GTGGAACCGGTGGTGGAGGTACCCACAGCCAGAAGAGGGTGGTTCG-3` и 5`- GATCGTCGACTTAGCTCTCCSTAGCTGCGCCG-3`. Получившийся ПЦР-продукт рестрицировали NheI и Sall, после чего лигировали в pLVT-1.

Последовательность полученного конструкта была подтверждена методом секвенирования.

#### 2.2.12. Получение конструктов под кардиомиоцит-специфичным промотором

Фьюзы HyPer-DAAO-NES и SypHer2-DAAO-NES были получены при помощи NEBuilder HiFi DNA assembly system. HyPer/SypHer2 были амплифицированы при помощи праймеров 5'- GATTCGAACATCGATTGAATTCGCCACCATGGAGATGGCA-3' и 5'- TGTGACCACTACCACCAACCGCCTGTTTTAAACTTTATCG 3', DAAO-NES - 5'- AGGCGGTTGGTGGTAGTGGTCACAGCCAGAAGAGGGTG-3' и 5'- GCGCTGCTCGAGGCAAGCTTACAGGGTCAGCCGCTC-3'. Полученные ПЦР-продукты были рестрицированы с помощью EcoRI и HindIII и лигированы в AAV-CMV. CMV промотор был заменен на cTnT между сайтами рестрикции NcoI и SacI.

Конструкты были собраны в частицы AAV9 в Children's Hospital Boston Viral Vector core. Приблизительно  $10^{12}$  вирусных частиц суспендировали в 100

мкл фосфатного буфера и закалывали внутривенно самцам крыс линии Wistar возрастом 3-4 недели.

### 2.3. Работа с эукариотическими клетками

#### 2.3.1. Клеточные культуры HeLa Kyoto и HEK293T и трансфекция

Клетки HeLa Kyoto и HEK293T растили в среде DMEM с добавлением 100 ед/мл пенициллина, 100 ед/мл стрептомицина, 2 мМ L-глутамина и 10% FCS при 37°C в атмосфере, содержащей 5% CO<sub>2</sub>. Каждый второй день клетки рассаживали с использованием 0.25% раствора трипсин-ЭДТА.

Для имаджинга клетки культивировали на чашках со стеклянным дном. Через 24 часа после рассадки при достижении клетками конfluence 50-60% клетки трансфецировали с помощью FuGene HD согласно протоколу производителя.

#### 2.3.2. Проточная цитометрия

Клетки HeLa Kyoto инкубировали с 2-оксвалериановой кислотой в течение суток. Далее клетки снимали с чашек с помощью 0.25% трипсин-ЭДТА, предварительно отобрав среду в пробирку. Полученную суспензию центрифугировали при 800 rpm в течение 13 мин на настольной центрифуге СМ-6М. Осадок ресуспендировали в 100 мкл среды. Затем к клеткам добавляли 8 мкл красителя TO-PRO 3 и инкубировали в течение 15 мин при комнатной температуре. После этого суспензию разводили в PBS и анализировали на проточном цитофлуориметре.

### 2.3.3. Микроскопия клеток HeLa Kyoto

Через 1 или 2 дня после трансфекции среду заменяли на 1,8 мл предварительно нагретой среды для имаджинга Tyrode с добавлением 20 mM HEPES и 20 mM глюкозы. Имаджинг проводили на флуоресцентном микроскопе Leica 6000 с помощью масляного объектива HCX PL APO lbd.BL 63×1.4NA в термостатируемом боксе. Изменение интенсивности флуоресценции HyPer измеряли при помощи стандартных CFP (Ex 436/20 нм, Em 480/40 нм) и GFP (Ex 470/40 нм, Em 525/50 нм) фильтр-кубиков, HyPerRed - TX2 (Ex 560/40 нм, Em 645/75), каждые 10 – 20 секунд. После 6-12 кадров делали добавки D-аминокислот в 200 мкл Tyrode, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> в 100 мкл Tyrode.

### 2.3.4. Ингибиторный анализ

BSO и 3-AT растворяли в mQ в концентрациях 100 mM и 1 M, соответственно, и хранили при -20C. Клетки инкубировали с BSO в концентрации 0,5 mM в течение 22 часов и с 10 mM 3-AT в течение 2 часов перед имаджингом.

Ауранофин растворяли в DMSO в концентрации 14,3 mM и хранили при -4C. Ауранофин и Trt-1 добавляли к клеткам в концентрации 1 мкМ и инкубировали 1 час перед имаджингом.

### 2.3.5. Измерение активности TrxR и содержания GSH в клетках, подвергшихся ингибиторному анализу

Для измерения активности TrxR мы использовали Thioredoxin Reductase Assay Kit. Данный кит основан на взаимодействии TrxR с 5,5'-дитиобис (2-нитробензойной) кислотой (DTNB), которая в NADPH-зависимой реакции восстанавливается в 5-тио-2-нитробензойную кислоту (TNB<sup>2-</sup>), окрашенной в яркий желтый цвет ( $\lambda_{\text{max}} = 412 \text{ нм}$ ). Ауранофин и Tri-1 добавлялись к клеткам HeLa Kyoto в концентрации 1 мкМ и 10 мкМ, после чего клетки инкубировались в течение одного часа. Контрольные образцы обрабатывались только DMSO в количестве 5 мкл. Для приготовления образцов мы использовали  $2 \times 10^6$  клеток. Все измерения проводились в прозрачных 96-луночных планшетах с плоским дном с помощью Tecan Infinite 200 Pro согласно протоколу производителя. Кинетические кривые измерялись при OD 412 нм в течение 100 минут.

Для измерения количества глутатиона мы использовали GSH/GSSG Ratio Detection Assay Kit II. Компоненты этого кита становятся флуоресцентными после прямого взаимодействия с восстановленным глутатионом. HeLa Kyoto инкубировались с 0,5 мМ BSO в течение 22 часов. В качестве контроля использовали не подвергавшиеся инкубации с ингибитором клетки. Для приготовления образцов использовали  $3 \times 10^6$  клеток. Все измерения проводили согласно протоколу производителя. Мы измеряли флуоресценцию при  $E_x/E_m = 490/520$  на Tecan Infinite 200 Pro в черных плоскодонных 96-луночных планшетах.

Концентрацию белка в обоих экспериментах измеряли, используя Bicinchoninic Acid Protein Assay Kit.

### 2.3.6. Клеточная культура PC-12 и ее трансфекция

Рост клеток PC-12 поддерживали в среде DMEM с добавлением 10% FBS, 5% HI-NS, 0.5% GlutaMAX и раствора пенициллина-стрептомицина при 37 °C и 5% содержании CO<sub>2</sub> в атмосфере.

Перед имаджингом клетки рассаживали на стекла для микроскопирования диаметром 18 мм. Перед использованием стекла промывали раствором Пирания (3 части серной кислоты и 1 часть 30% пероксида водорода), покрывали поли-D-лизином и пептидом RGD. Через 24 часа после рассадки клеток на стекла проводили трансфекцию при помощи Effectene 3000 согласно протоколу производителя. Для стимуляции дифференцировки PC-12 в нейроны ростовую среду заменяли на среду для дифференцировки, состоявшую из DMEM с добавлением 1% FBS, 0.5% GlutaMAX, пенициллина-стрептомицина и NGF. После 48 часов инкубации в среде для дифференцировки ее заменяли на свежую.

### 2.3.7. Выделение и ведение первичной нейрональной культуры

Для получения первичной эмбриональной культуры гиппокампальных нейронов использовали мышей линии C57BL/6.

Растворы для выделения предварительно охлаждались на льду.

Перед началом процедуры чашки Петри, предназначенные для посадки культуры, покрывали поли-D-лизином и помещали в CO<sub>2</sub>-инкубатор. Перед посадкой клеток чашки дважды отмывали раствором HBSS и один раз средой MEM, содержащей 5% FBS, 2 mM GlutaMax, B27, 10 mM HEPES, пенициллин-стрептомицин; pH 7.4 (MEM full).

Мышей, находящихся на 17ом дне беременности, эвтаназировали методом цервикальной дислокации. Матку извлекали через отверстие в брюшной полости, эмбрионов очищали от оболочек и помещали в раствор HBSS с добавлением 20 mM HEPES (HBSS full), затем декапитировали с помощью пинцетов и ножницами открывали доступ к мозгу. Под бинокулярным микроскопом удаляли обонятельные доли, мозжечок и продолговатый мозг, после разделяли полушария. Каждое полушарие очищали от оболочек и промежуточного мозга, затем

гиппокампы вырезали с помощью пинцетов и помещали в пробирку с раствором HBSS full. Полученные гиппокампы дважды промывали раствором HBSS full, затем инкубировали при 37°C в 0.25% растворе трипсина-ЭДТА в течение 15 минут. По окончании инкубации реакцию останавливали средой MEM full, клеточную массу суспендировали в 1 мл раствора и пропускали через сеточку диаметром 40 мкм. Для подсчета клеток использовали камеру Горяева и краситель трипановый синий. Полученную суспензию разводили до концентрации  $1.5 \cdot 10^6$  клеток/мл, на покрытые поли-D-лизином чашки наносили 100 мкл клеточной суспензии. Через 45 минут в чашки добавляли 2 мл среды MEM full. Каждые 2-3 дня 1/3 среды заменялась новой.

В ряде экспериментов для культивирования клеток также использовали нейробазальную среду (5% FBS, 2 mM GlutaMax, B27, 10 mM HEPES, пенициллин-стрептомицин; pH 7.4).

### 2.3.8. Трансфекция нейрональной культуры

Трансфекцию осуществляли при помощи реагентов Lipofectamine LTX и Reagent Plus. На 5-7 DIV из чашек, содержащих культуры нейронов, отбирали и сохраняли по 1 мл кондиционированной среды, после чего добавляли трансфекционную смесь, содержащую 200 мкл Opti-MEM, 1 мкг плазмидного вектора, 2,5 мкл Reagent Plus и 1,5 мкл Lipofectamine LTX. Реагенты смешивали в указанном порядке, инкубировали с каждым из трансфекционных агентов в течение 15 минут. После внесения трансфекционной смеси культуры инкубировали в CO<sub>2</sub>-боксе в течение 14-18 часов, после чего среду заменяли на смесь кондиционированной и свежей среды MEM full в отношении 1:1.

## 2.4. Обработка полученных изображений

### 2.4.1. Анализ изображений

Для анализа изображений использовали программу ImageJ (EMBL). При обработке снимков с участием HyPer использовали ранее описанную методику. Для импортированных изображений применяли опцию «разделить каналы» и вычитали фоновую флуоресценцию с помощью плагина «BG subtraction from ROI», предварительно выделив часть фона изображения. Далее изображения переводили в 32-битные. С помощью функции «Treshhold» исключали фоновые значения пикселей. Стэк 500 нм канала делили на стек 420 канала, используя «Image calculator». Далее выделяли в клетке зону, для которой измеряли средние значения интенсивности флуоресценции. Полученные значения анализировали в программе OriginPro.

### 2.4.2. Анализ кимографов

Изображения подвергали обработке как описано выше. Затем в стэке для HyPerRed-NLS (ядро) и стэке для HyPer3-mito (митохондрии) строили кимограф, усредняя значения в 9 пикселях вдоль линии. Из кимографа для HyPer3-mito исключались значения, соответствующие ядерной области, определенной по HyPerRed-NLS. Вычисляли значения для двух областей, соответствующих окооядерным и периферическим митохондриям, после чего определяли соотношения значений в этих областях (ROI1/ROI2).



### 3. Результаты и обсуждение

#### 3.1. Оптимизация хемогенетического генератора $H_2O_2$ для использования в различных живых системах

##### 3.1.1. В результате анализа литературы в работе мы использовали RgDAAO

В нашей лаборатории уже успешно использовали изоформу DAAO из *Rhodotorula gracilis* для контролируемой продукции пероксида водорода в эукариотических клетках [190; 274]. Так как данная работа подразумевает использование широкого круга живых систем, в первую очередь нами был проведен анализ литературы на предмет обнаружения вариантов DAAO, позволяющих использовать различные D-аминокислоты в качестве субстрата фермента. Нам известно крайне мало о способах транспорта D-аминокислот в клетки, о специфичностях различных транспортеров в разных типах клеток, об организменном распределении D-аминокислот после введения их в организм тем или иным способом. Использование гомологов DAAO с разной субстратной специфичностью позволило бы использовать оптимальный субстрат в случае разных систем.

Мы провели поиск гомологов DAAO с помощью алгоритма BLAST. Для поиска использовали последовательность U60066.1 (в базе ENA), содержащую полную кодирующую часть мРНК RgDAAO. Использовали вариацию алгоритма blastx, в которой гомология последовательностей определяется через транслированную последовательность аминокислот. Было выявлено существование DAAO во всех животных царствах.

Параллельно был проведен литературный поиск DAAO с уже описанными биохимическими характеристиками. Недостаток данных о прямых биохимических измерениях, их гетерогенность вследствие различной степени чистоты использовавшихся в экспериментах препаратов, различных условий (рН, температура) и протоколов измерений активности, а также отсутствие характерных паттернов в обнаруженных с помощью BLAST последовательностях не позволяют определить субстратную специфичность обнаруженных ферментов. Исходя из первичной обработки полученных данных, было принято решение о нецелесообразности дальнейших изысканий по данному направлению.

Анализ литературных данных выявил, что наиболее каталитически активные гомологи DAAO экспрессируются различными видами грибов. Характеристики ферментов по отношению к D-аминокислотам при этом различаются не критически. На основании проведенного анализа мы пришли к выводу, что наилучшей стратегией будет продолжение работы с уже опробованной DAAO из *Rhodotorula gracilis*. RgDAAO наиболее полно охарактеризована, проявляет сходный уровень активности к наиболее широкому набору субстратов, что предположительно позволяет использовать ее в различных экспериментальных системах, различающихся по набору аминокислотных транспортеров или чувствительности к продуктам реакции окислительного дезаминирования. Кроме того, для данной оксидазы D-аминокислот расшифрована кристаллическая структура, что позволяет проводить направленный мутагенез определенных функциональных областей фермента.

Мы рассмотрели литературные данные по имеющимся вариантам направленного мутагенеза RgDAAO. Мы отказались от всех вариантов точечных замен, которые увеличивают сродство rgDAAO к кислым и полярным аминокислотам вследствие присутствия D-аспартата и D-серина в организмах млекопитающих и их участия в модуляции нейрональной деятельности. Т.к. большая часть проведенных работ по точечному мутагенезу rgDAAO имела своей целью расширить субстратную специфичность фермента до всех возможных

аминокислот, нами не было обнаружено вариантов точечных замен, не увеличивающих чувствительности к кислым или полярным аминокислотам. В дальнейшей работе мы использовали RgDAAO дикого типа.

### 3.1.2. Тестирование D-аминокислот как возможных субстратов DAAO в клеточных системах

RgDAAO – фермент, имеющий большую практическую важность в промышленных биотехнологических процессах, вследствие чего ее кинетические параметры были определены для широкого круга субстратов [234]. *In vitro* фермент наиболее активен относительно неполярных, менее активен в случае полярных и положительно заряженных аминокислот. В случае экспрессии DAAO в эукариотических клетках важным фактором успешности определенной D-аминокислоты в качестве субстрата DAAO будет также принципиальная возможность и скорость ее транспорта в клетку. Процесс транспорта D-аминокислот в клетки по понятным причинам малоизучен.

Для характеристики эффективности фермента в условиях клеточного окружения при ограничении доступа D-аминокислоты транспортерами клетки, мы протестировали ряд D-аминокислот в HeLa Kyoto, экспрессирующих NuPer-DAAO. В качестве возможных субстратов DAAO нами были изначально рассмотрены D-лизин (D-Lys), D-аргинин (D-Arg) и D-треонин (D-Thr). Из рассмотрения был предварительно исключен D-метионин, т.к. продукт его окислительного дезаминирования 4-метилтио-2-оксобутановая кислота биологически активна при низких концентрациях и стимулирует клеточный апоптоз. Также мы исключили D-фенилаланин, т.к. фенилпируват действует на глюкозо-6-фосфатдегидрогеназу и может влиять на редокс-статус клеток. Также мы исключили из теста D-серин, так как для данной аминокислоты показано участие в сигнальных процессах клеток [74].

Мы не наблюдали значительной продукции пероксида водорода в ответ на добавление в среду для имаджинга 4 мМ D-аргинина (рисунок 9 А). Ответ сенсора на добавление 4 мМ D-лизина во многом вызван внутриклеточным изменением рН (рисунок 9 В, Г). Также значительное изменение рН наблюдалось при использовании 4 мМ D-треонина (рисунок 9 Е). Нежелательно, чтобы транспорт D-аминокислоты внутрь клетки сопровождался значительными изменениями рН, т.к. многие внутриклеточные процессы существенно от него зависят. Для D-аланина нами было показано отсутствие существенных изменений рН при добавлении в среду 4 мМ данной D-аминокислоты (рисунок 9 З).

Позже мы протестировали две непротеиногенные неполярные аминокислоты D-норлейцин (D-Nle) и D-норвалин (D-Nva) (рисунок 8). Изначально мы использовали ко-экспрессированный в клетках HeLa Kyoto сенсор HyPer7 с ДААО для исключения влияния рН на изменения в интенсивности флуоресценции сенсора в первичном тесте.

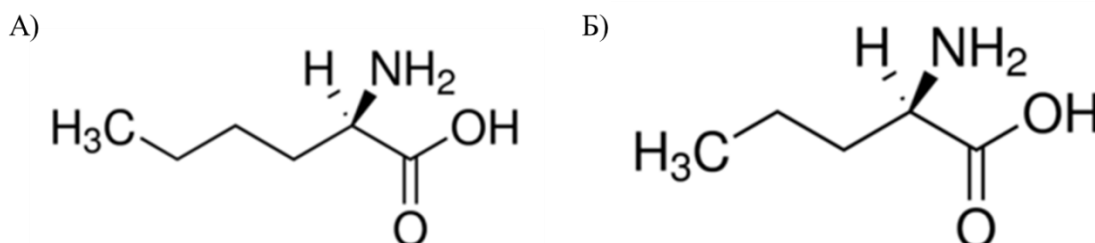


Рисунок 8 – Структуры D-норлейцина (А) и D-норвалина (Б)

D-норлейцин в концентрации 4 мМ в среде вызывал сходный с 4 мМ D-аланина уровень окисленности HyPer7 (рисунок 9 Ж).

Уже 0,2 мМ концентрация D-норвалина в среде вызывала практически полное окисление HyPer7, сравнимое с 4 мМ концентрацией D-аланина (рисунок 10 А). D-норвалин не имел выраженного эффекта на внутриклеточный рН при добавлении его в среду к HeLa Kyoto, экспрессирующим генетически-

кодируемый сенсор рН SypHer2 (рисунок 10 В), а также не вызывал

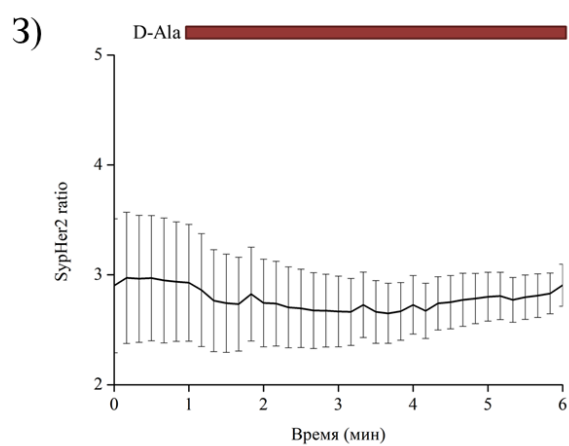
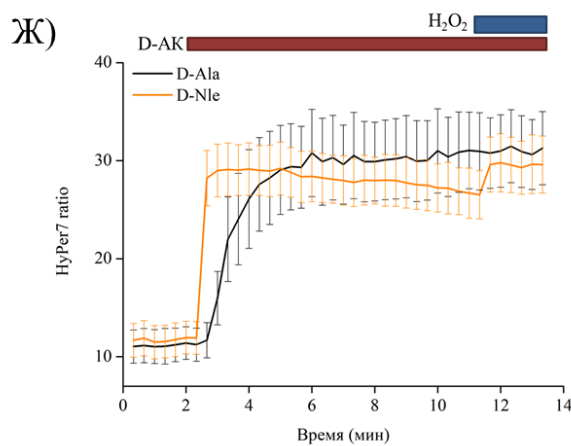
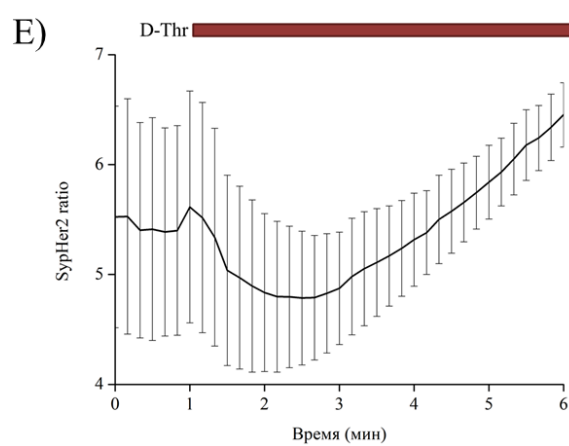
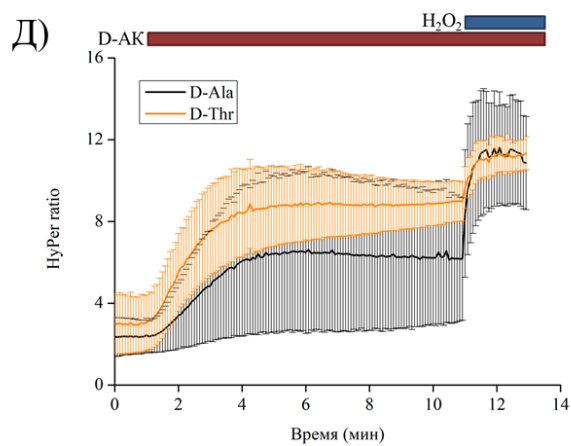
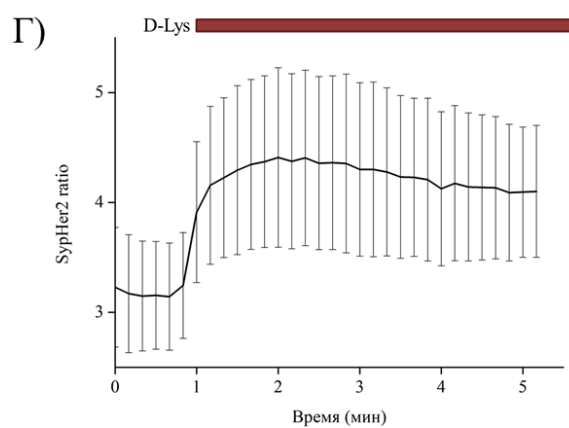
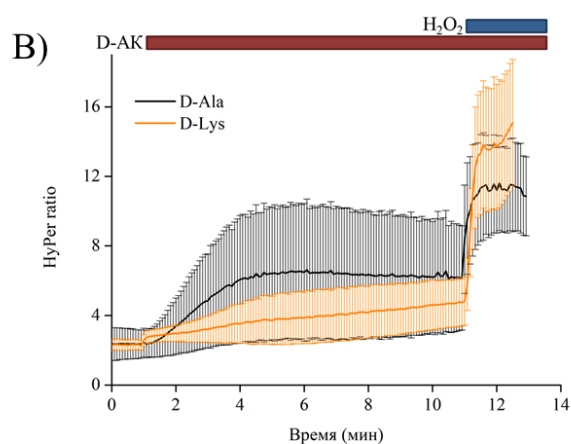
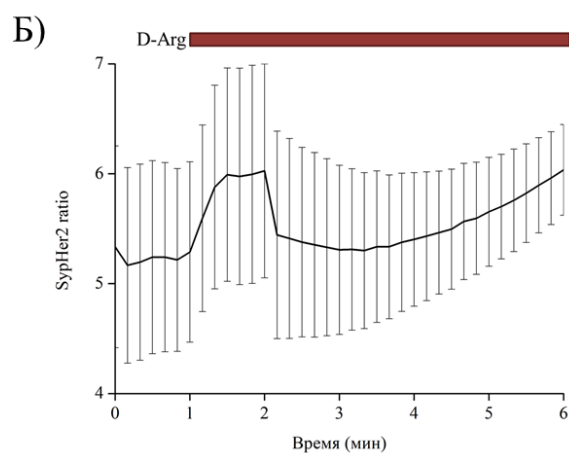
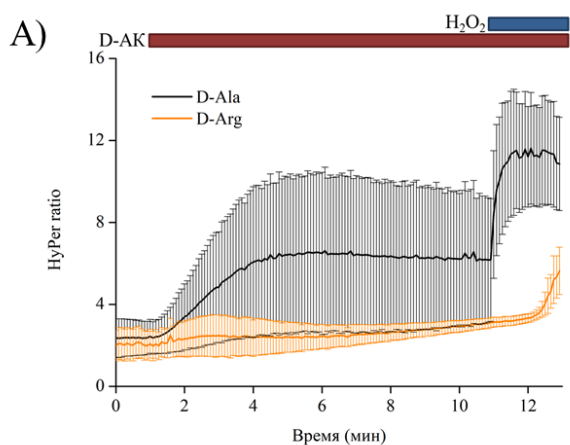


Рисунок 9 – графики изменения радиометрического ответа NuPer-DAAO и SupHer2, проэкспрессированного в цитоплазме HeLa Kyoto, при создании в среде для имаджинга 4 мМ концентраций D-аргинина (А и Б), D-лизина (В и Г) и D-треонина (Д и Е). Также приведен график изменения радиометрического ответа NuPer7 при его ко-экспрессии с DAAO в HeLa Kyoto в ответ на создание в среде 4 мМ концентрации D-норлейцина (Ж). График изменения радиометрического ответа SupHer2 на 4 мМ концентрацию D-аланина (З)

синтеза пероксида водорода в клетках, не экспрессирующих RgDAAO (рисунок 10 Г). Использование D-норвалина позволяет создавать в цитоплазме клеток большой диапазон концентраций  $H_2O_2$  (рисунок 10 Б), поэтому может использоваться для моделирования как физиологических, так и патологических процессов.

При ко-экспрессии DAAO и NuPer с сигналами локализации в митохондриальном матриксе использование 8 мМ D-норвалина позволяет создать в митохондриях значительные концентрации пероксида водорода (порядка десятка нМ), что указывает на способность митохондрий транспортировать D-норвалин через свои мембраны, а также на принципиальную возможность использования DAAO с D-норвалином в качестве субстрата для изучения редокс-процессов митохондрий (рисунок 10 Д).

Микромолярные концентрации D-норвалина, требующиеся для образования физиологически значимых концентраций  $H_2O_2$  в цитоплазме клеток HeLa Kyoto, позволяют в перспективе использовать его в виде фоторазрушающихся конъюгатов, например, с амино-1,4-бензохиноном [12]. В случае успешного тестирования данного типа соединений, их можно будет использовать для локального высвобождения D-аминокислоты в области синаптических компартментов, вызывая образование пероксида водорода в отдельных дендритных шипиках или аксональных бутонах в зависимости от локализации фьюзов DAAO с синаптическими белками.

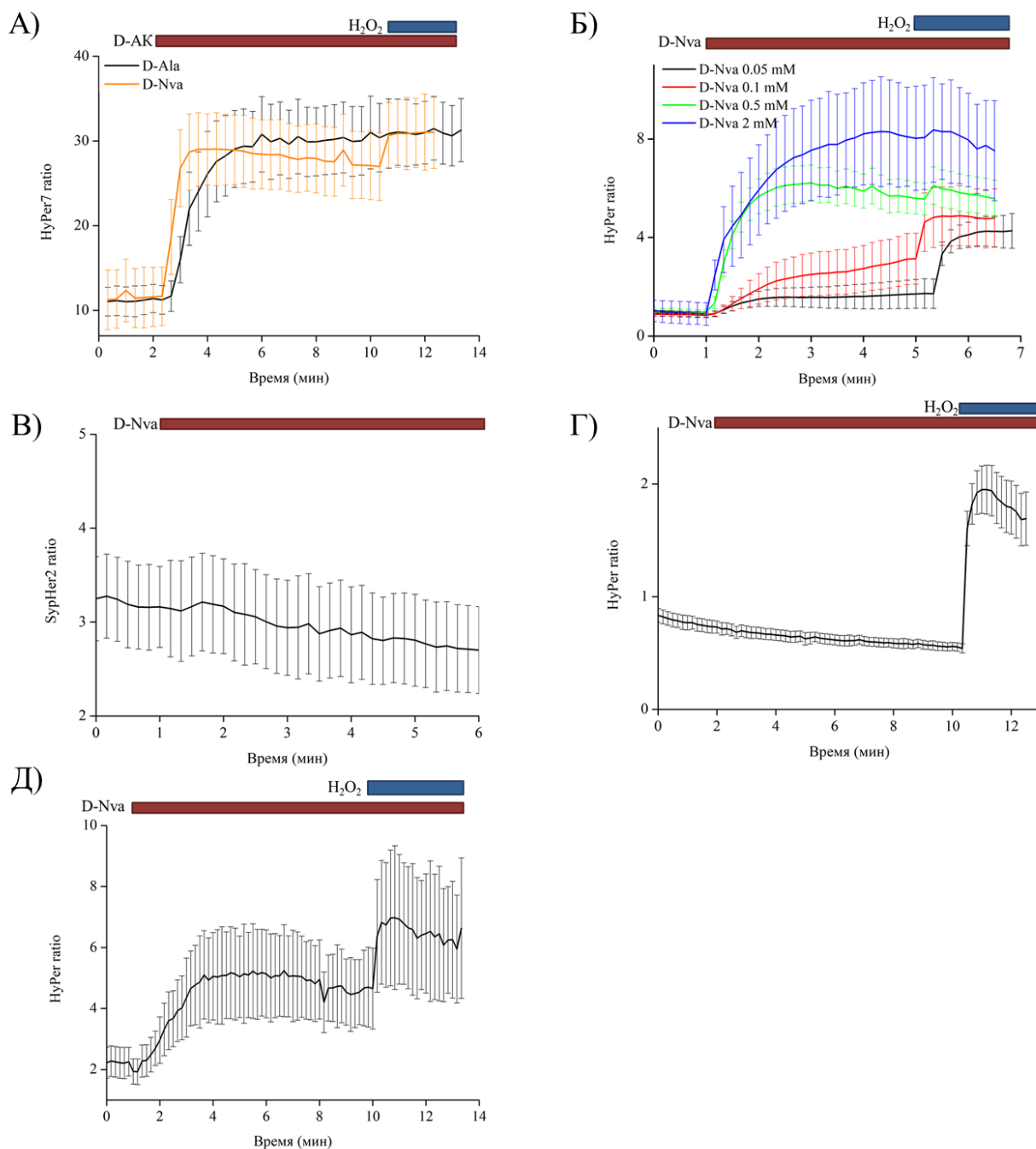


Рисунок 10 – График изменения радиометрического ответа HyPer7 при его ко-экспрессии с ДААО в *HeLa Kyoto* при создании в среде 0,2 мМ концентрации D-норвалина и сравнение его с графиком ответа HyPer7 на 4 мМ D-аланин (А). Графики радиометрического ответа фьюза HyPer-ДААО на различные концентрации D-норвалина в среде (Б). Графики радиометрического ответа SypHer2 и HyPer на 2 мМ концентрацию D-Nva (В и Г). График радиометрического ответа HyPer-mito при его ко-экспрессии с ДААО-mito на 8 мМ D-Nva (Д)

В ходе реакции окислительного дезаминирования, катализируемой DAAO, из аминокислот образуются соответствующие кетокислоты. Одним из преимуществ D-аланина как субстрата DAAO является то, что продуктом реакции выступает пируват – нетоксичное в наномолярных концентрациях соединение. Мы оценили влияние 2-оксвалериановой кислоты, образующейся из D-норвалина, на жизнеспособность клеток линии HeLa Kyoto. При помощи проточной цитометрии было показано, что 2-оксвалериановая кислота не оказывает значительного влияния на жизнеспособность культуры HeLa Kyoto в концентрации 1 мМ при инкубации в течение 24 часов.

### 3.2. Изучение вклада антиоксидантных систем в ограничении диффузии пероксида водорода

Ключевым свойством пероксида водорода является локальность его действия. Она обеспечивается созданием определенного паттерна активированных генераторов  $H_2O_2$  и действием различных антиоксидантных систем. Создаваемые в таких условиях градиенты пероксида водорода играют ключевую роль в процессах подвижности клеток, их дифференцировки и протекании многих сигнальных путей [222; 92; 245]. На данный момент не существует единого мнения о роли различных антиоксидантных систем в поддержании градиента пероксида водорода. Не исключено, что в различных системах эти роли будут меняться в зависимости от особенностей функционирования составляющих ее клеток. Мы поставили перед собой задачу создать универсальную систему для визуализации и исследования свойств ограничения диффузии  $H_2O_2$ , основанную на использовании хемогенетического генератора DAAO.



### 3.2.1. Создание локализованных в ядре и в цитозоле генераторов $H_2O_2$

Для решения поставленной задачи мы создали конструкции DAAO и HyPer, имеющие определенные четко заданные позиции в клетке: цитозоль и ядро. Для этого к последовательности кодирующих DAAO открытых рамок считывания мы добавили сигнальные последовательности импорта белка в ядро (nuclear localization sequence, NLS) или экспорта из ядра в цитозоль (nuclear export signal, NES). Также для параллельного имаджинга динамики пероксида водорода в двух органеллах мы создали конструкт HyPerRed-NLS, локализующийся в ядре, и HyPer2-NES, локализующийся в цитозоле клетки.

Мы ко-трансфецировали плазмиды, несущие последовательность DAAO-NLS или DAAO-NES, с плазмидами, несущими последовательность HyPerRed-NLS и HyPer2-NES, в клетки культуры НЕК 293. Мы показали, что при внесении небольших концентраций D-аланина (0,25 мМ) в среду для имаджинга позволяет создать концентрацию пероксида водорода в ядре, достаточную для детекции при помощи HyPerRed-NLS, но не в цитозоле, для детекции при помощи HyPer2-NES (рисунок 11 А, Б). Таким образом мы показываем, что ограничение диффузии пероксида водорода существует. При этом мы также знаем, что ядерная оболочка проницаема для пероксида водорода, так как добавление больших концентраций D-аланина ведет к окислению HyPer2-NES в цитозоле. Использование DAAO-NES (рисунок 11 В, Г) позволяет продемонстрировать, что проницаемость ядерной мембраны для пероксида водорода работает в обе стороны, т.к. в этих условиях мы также наблюдаем окисление обеих версий сенсора.

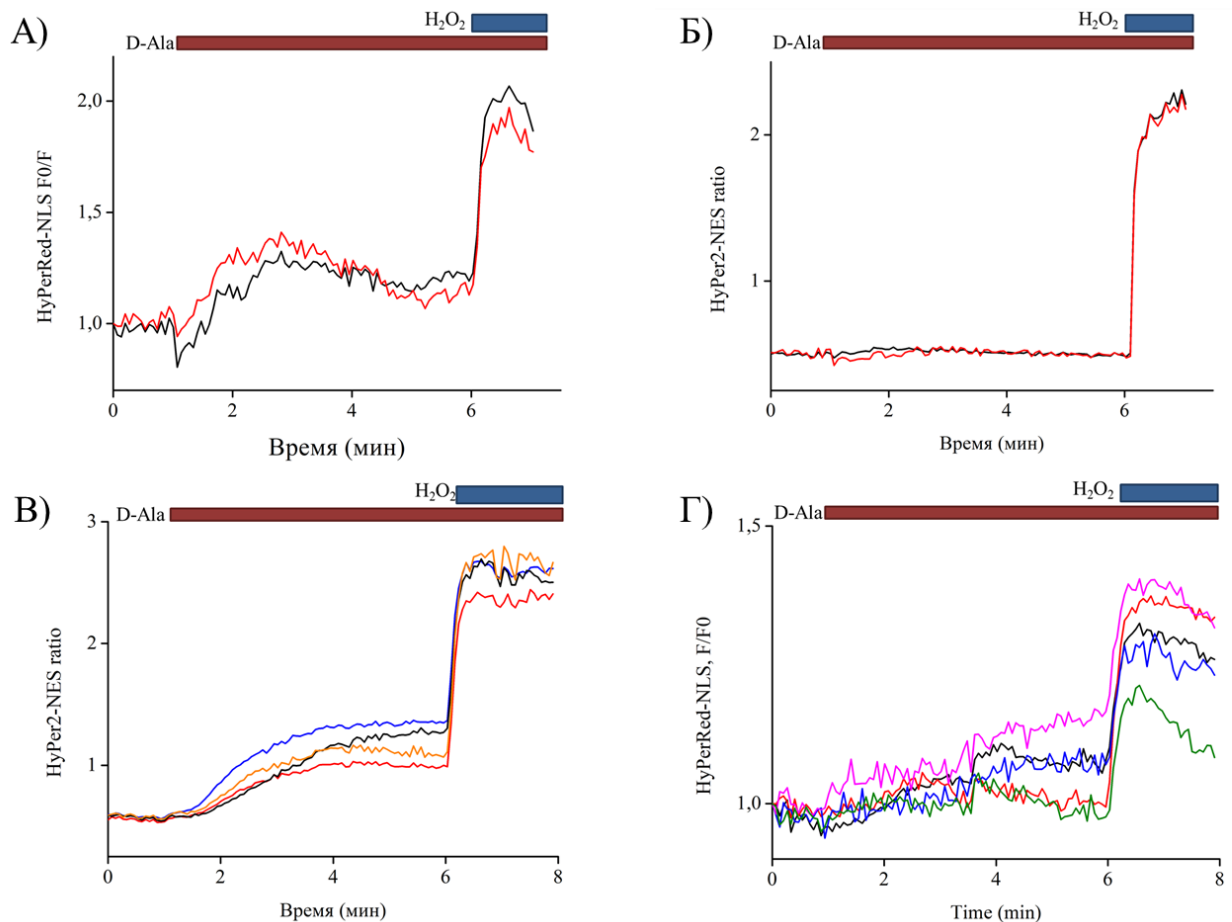


Рисунок 11 – Изменения интенсивности флуоресцентного сигнала HyPerRed-NLS при добавлении к клеткам 0,25 мМ D-аланина. Происходит нарастание сигнала из-за образующегося в ядре пероксида водорода как продукта реакции DAAO-NLS (А) Изменения ратиометрического сигнала HyPer2-NES при добавлении к клеткам 0,25 мМ D-аланина практически не происходит из-за ограничения диффузии пероксида водорода при его генерации в ядре DAAO-NLS (Б). Изменения ратиометрического сигнала HyPer2-NES (В) и интенсивности флуоресценции HyPerRed-NLS (Г) при добавлении к клеткам 0,6 мМ D-аланина в случае локализации DAAO-NES в цитозоле.

Таким образом, мы продемонстрировали, что DAAO с добавлением сигнала импорта в ядро (NLS) остается функциональным ферментом, D-аланин способен попадать в ядро и вызывать активацию фермента, а образующийся в этой системе пероксид водорода может диффундировать из ядра, причем в низких

концентрациях его диффузия ограничена. Однако способность к практически не ограниченной диффузии HyPer2-NES не позволяет детектировать с помощью такого варианта локализации сенсора четкого градиента пероксида водорода.

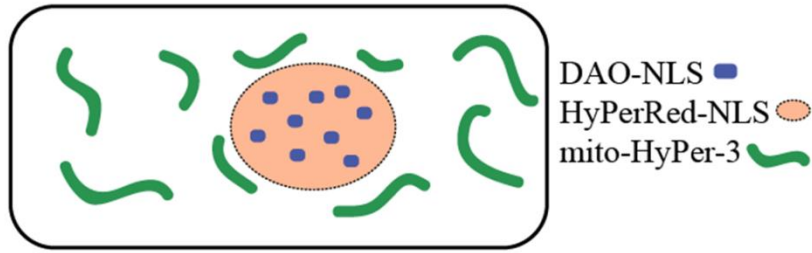
### 3.2.2. Локализованная в ядре DAAO позволяет визуализировать ограничение диффузии H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

Для визуализации предполагаемого ограничения диффузии пероксида водорода в цитоплазме мы использовали HyPer3, локализованный в матриксе митохондрий. Митохондрии располагаются по всему объему внутриклеточного пространства и сохраняют свою позицию на протяжении времени, достаточного для визуализации градиента пероксида водорода.

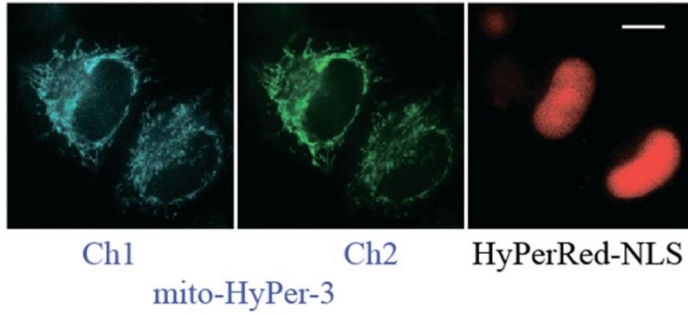
При ко-трансфекции клеток HeLa Kyoto конструктами DAAO-NES и HyPer3-MLS весь HyPer3 окислялся равномерно, степень окисления биосенсора зависела от количества добавленной D-аминокислоты. В данных условиях была показана возможность миграции H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> из цитозоля в матрикс митохондрий. Также было показано, что в условиях, когда DAAO равномерно распределена в цитозоле, HyPer3 во всех митохондриях имеет примерно одинаковую способность окисляться во всех митохондриях по всему внутриклеточному объему.

Далее мы ко-трансфецировали клетки HeLa Kyoto смесью плазмид, кодирующих DAAO-NLS, HyPerRed-NLS (оба конструкта имеют внутриядерную локализацию) и HyPer3-MLS (митохондриальный матрикс) (рисунок 12 А, Б). При добавлении D-аланина мы наблюдали возрастание сигнала HyPerRed в ядре. Окисление HyPerRed при добавлении 4 мМ D-аланина оказывалось неполным (рисунок 12 Г), из чего следует, что, согласно измеренным характеристикам HyPerRed, концентрация продуцировавшегося H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> в ядре была менее 200 нМ.

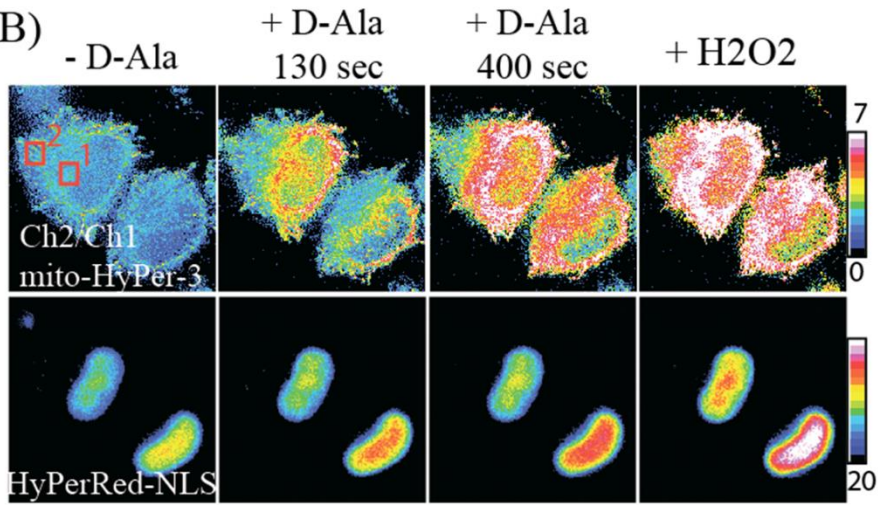
A)



B)



B)



Г)

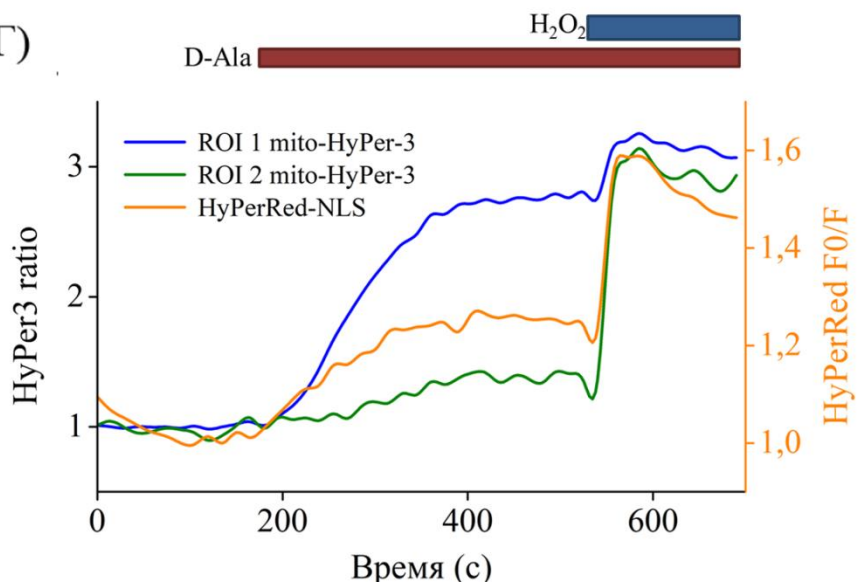


Рисунок 12 – Схема системы, состоящей из хемогенетического генератора пероксида водорода DAAO-NLS, в присутствии D-аланина проводящего реакцию с образованием  $H_2O_2$  в ядре клетки. HyPerRed-NLS также локализуется в ядре и позволяет измерять локальное образование  $H_2O_2$ , mito-HyPer3 локализуется в матриксе митохондрий и детектирует тот  $H_2O_2$ , который диффундировал из ядра в цитоплазму и митохондрии (А). Репрезентативные изображения клеток в трех флуоресцентных каналах: два для HyPer-3 и один для HyPerRed. Шкала соответствует 10 мкм (Б). В верхнем ряду показаны рациометрические изображения клеток из панели (Б) для mito-HyPer3, в нижнем – HyPerRed-NLS. После добавления D-аланина  $H_2O_2$  образуется в ядре, происходит увеличение интенсивности флуоресценции HyPerRed-NLS.  $H_2O_2$ , покидая ядро, образует градиент, видимый при изменении рациометрического сигнала флуоресценции mito-HyPer-3. Для количественной оценки выбираются две области интереса: ROI1 выбирается на периферии ядра, а ROI2 - в области, удаленной от ядра (В) Динамика изменения  $H_2O_2$  в ROI1, ROI2 и в ядре клетки, приведенной выше (Г)

Немедленно после добавления D-аланина образующийся пероксид водорода диффундировал в цитоплазму и матрикс ближайших к ядру митохондрий, вследствие чего мы наблюдали окисление HyPer3 (рисунок 12 В, Г). При этом HyPer3 в матриксе митохондрий на периферии клетки оставался восстановленным. Добавление в среду внешнего  $H_2O_2$  выравнивало степени окисления HyPer3 в матриксе всех митохондрий внутри клетки. Добавление D-аланина к контрольным клеткам, не экспрессировавшим DAAO-NLS не изменяло интенсивностей флуоресценции HyPerRed и HyPer3.

Для доказательства того, что градиент пероксида водорода формируется именно на уровне цитозоля, мы создали фьюз HyPer с кератином, белком промежуточного цитоскелета, который формирует относительно устойчивую сеть внутриклеточных микрофиламентов (рисунок 13 А). Это позволило предотвратить быструю диффузию HyPer внутри цитозоля. Добавление D-аланина к клеткам, экспрессирующим DAAO-NLS и кератин-HyPer, вело к формированию картины распределения интенсивности флуоресценции HyPer, сходной с наблюдаемой при использовании HyPer3, локализованного в матриксе

митохондрий. HyPer, связанный с перинуклеарными филаментами, демонстрировал шарообразную картину окисления вокруг ядра, сенсор на периферии клетки оставался восстановленным (рисунок 13 Б, В).

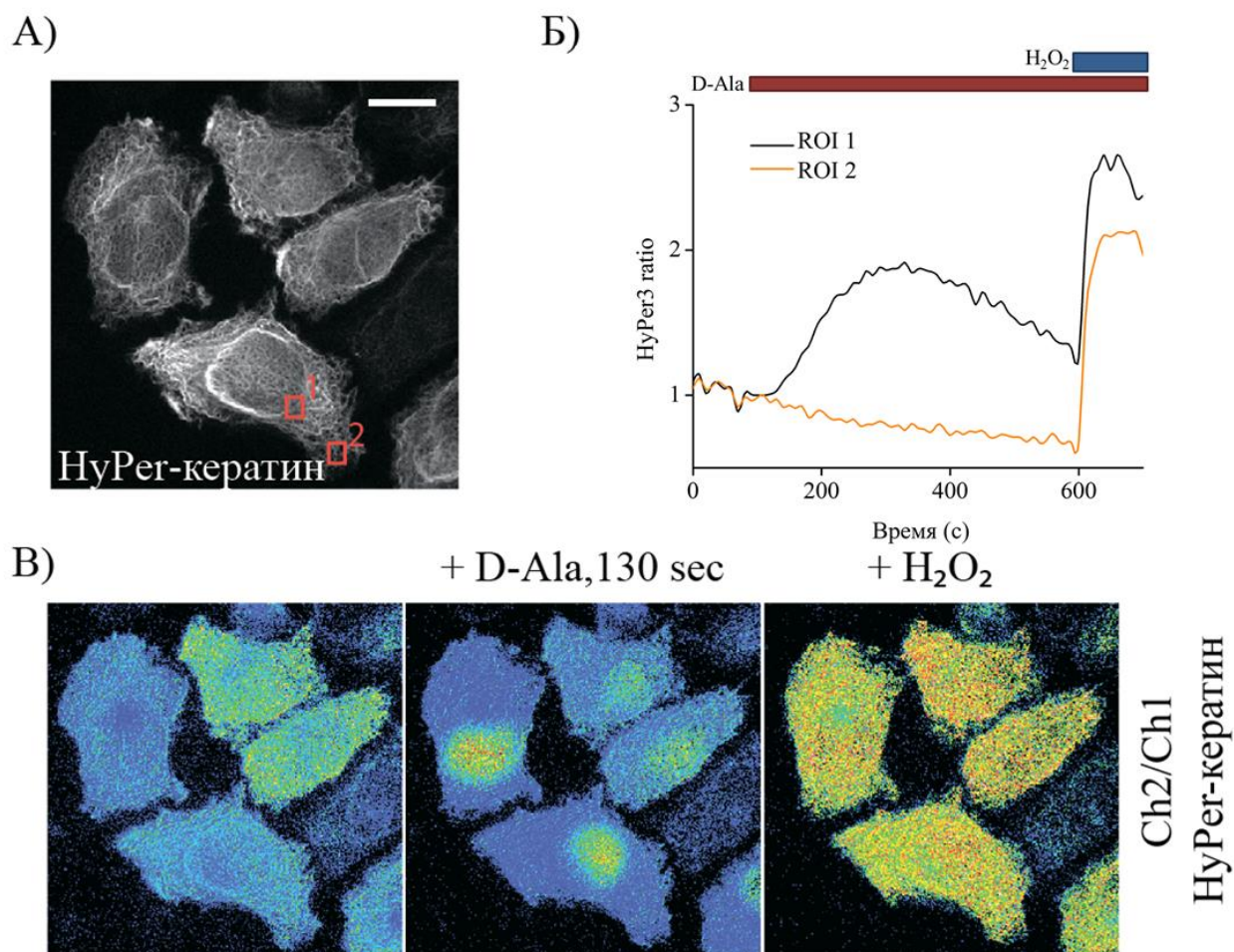


Рисунок 13 – Полученные при Ex 470/40 нм и Em 525/50 нм флуоресцентные изображения клеток HeLa Kyoto, экспрессирующих DAO-NLS и HyPer-кератин. Красными прямоугольниками указаны ROI1 в перинуклеарной области и ROI2 на периферии клетки (А). Динамика изменения H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> в ROI1 и ROI2 при активации DAO-NLS (Б). Рациометрические изображения клеток (А) до и после добавления в среду D-аланина и после полного окисления сенсора добавленным внешне пероксидом водорода (В)

Таким образом мы продемонстрировали, что в данной системе мы создаем градиент пероксида водорода, существующий на уровне матрикса митохондрий и цитоплазмы, с максимальным уровнем окисления в перинуклеарной области.

### 3.2.3. Тиоредоксин играет ключевую роль в ограничении диффузии пероксида водорода

В формировании градиента пероксида могли участвовать: каталаза пероксисом, глутатионовая система и пероксиредоксины, подпитываемые электронами через тиоредоксиновый путь.

Для исследования роли каждой из антиоксидантных систем (каталаза пероксисом, глутатионовая система и пероксиредоксины, подпитываемые электронами через тиоредоксиновый путь) мы использовали ряд ингибиторов, специфичных по своему действию к каждой из систем. Формирование градиента  $H_2O_2$  ведет к более высокому сигналу  $HuPer3$  в митохондриях в перинуклеарной области в сравнении с периферическими зонами. Таким образом градиент пероксида водорода может быть проанализирован при помощи построения профиля сигнала  $HuPer3$  вдоль клетки (рисунок 14 А, В). Изменение этого профиля соответствует формированию или исчезновению градиента  $H_2O_2$  в цитоплазме, что может быть визуализировано при помощи кимографа, где одно измерение соответствует ратиометрическому значению  $HuPer3$  вдоль линии, а второе – времени: каждая новая линия профиля, взятая в  $t+1$ , отображена под предыдущей, изображенной в момент  $t$ . После этого мы берем две области интереса (ROI), ROI1 – область кимографа, отображающая перинуклеарные митохондрии, ROI2 – периферические митохондрии в тот же момент времени. При отсутствии градиента соотношение ROI1/ROI2 будет близко к единице, что отражает равный уровень окисления  $HuPer3$  в этих областях. Чем выше это соотношение, тем круче градиент  $H_2O_2$  в клетке.

При добавлении D-аланина к системе соотношение ROI1/ROI2 значительно превышает единицу (рисунок 14 Б). При инкубации клеток с 3-АТ, ингибитором каталазы, интенсивность градиента не изменяется, что приводит нас к выводу, что каталазы не участвуют активно в предотвращении внутриклеточной диффузии пероксида водорода. Инкубация клеток с ауранофином, ингибитором тиоредоксинредуктазы, привело к полному снятию градиента (рисунок 14 Б). В этом случае добавление D-аланина приводит к быстрому окислению всего митохондриального HuPer3 по всему объему клетки (рисунок 14 А, В). Добавление внешнего пероксида водорода не вело к увеличению сигнала HuPer3, что означает, что в данных условиях весь сенсор оказывается полностью окислен. Таким образом мы показали, что тиоредоксиновая ветка антиоксидантной защиты имеет непосредственное участие в формировании градиента, предположительно за счет действия пероксиредоксинов. До добавления D-аланина весь HuPer3 в таких условиях был практически полностью восстановлен, что означает, что данная картина наблюдается не в результате пред-окисления биосенсора из-за действия ауранофина.

В формировании градиента также может участвовать система глутатиона, в которой глутатионпероксидазы восстанавливают  $H_2O_2$  в воду с одновременным окислением глутатиона. К нашему удивлению, добавление BSO, ингибитора синтеза глутатиона, не только не нарушило формирования градиента, но и в некоторой степени усилило его (рисунок 14 Б). Вероятно, ингибирование синтеза глутатиона вело к компенсаторной активации тиоредоксиновой системы. Другим объяснением этого явления может быть повышенная доступность NADPH, который более не использовался для поддержания высокого соотношения GSH/GSSG, для тиоредоксинредуктазы, что увеличивало количество доступных восстановительных эквивалентов для пероксиредоксинов.

Ауранофин ингибирует тиоредоксинредуктазы в цитоплазме (TrxR1) и в матриксе митохондрий (TrxR2). Для выяснения того, какую роль играет в формировании градиента каждая из форм тиоредоксинредуктазы, мы



использовали специфический ингибитор TrxR1, Tri-1. Ингибирование TrxR1 привело к частичному уменьшению градиента, но не сняла его полностью (рисунок 14 Б). Таким образом, мы можем предположить, что обе формы тиоредоксинредуктазы участвуют в ограничении диффузии  $H_2O_2$  в данной системе.

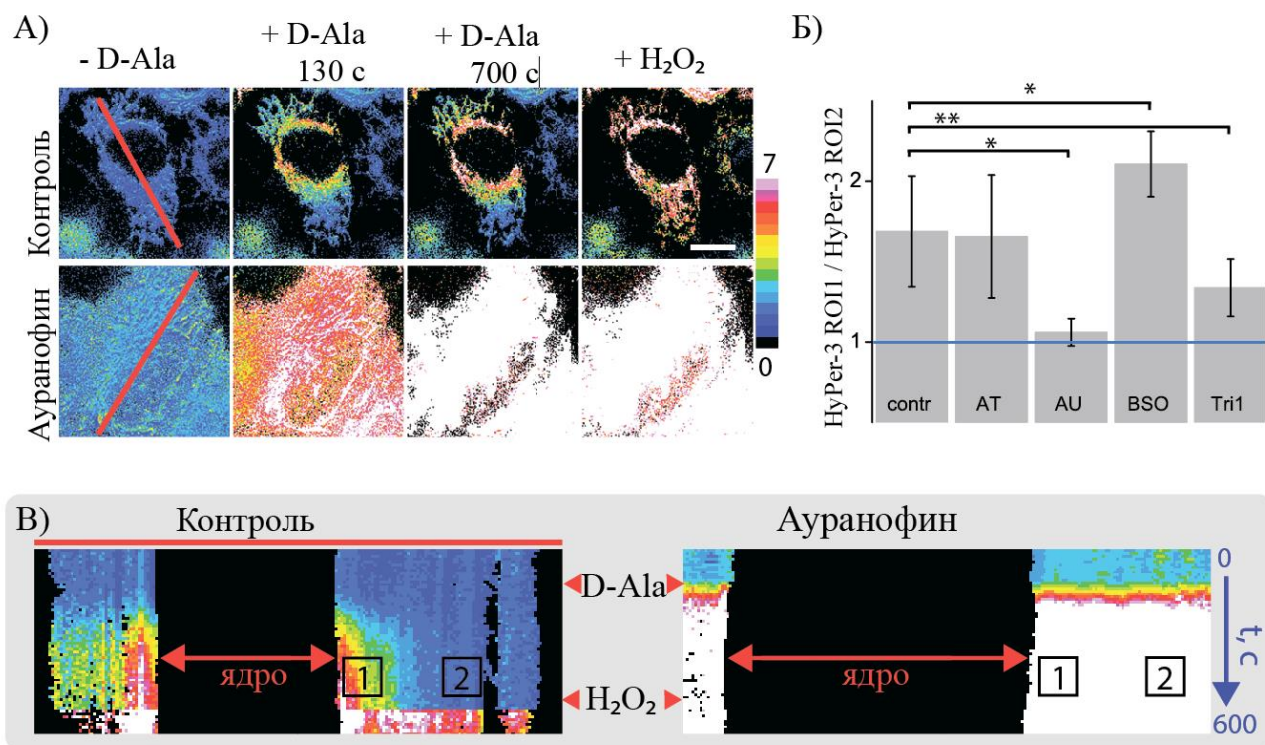


Рисунок 14 – Радиометрические изображения клеток, экспрессирующих mito-HyPer3 и DAAO-NLS. Верхний ряд соответствует изменению радиометрического сигнала mito-HyPer3 при добавлении D-аланина к клеткам в контрольном эксперименте (инкубированным с DMSO), нижний – клеткам, обработанным ауранофином. Ауранофин вызывает исчезновение градиента пероксида водорода (А). Влияние различных ингибиторов антиоксидантных систем на градиент  $H_2O_2$ . Градиент определяли количественно как отношение радиометрического сигнала mito-HyPer-3, измеренного в перинуклеарной области, к соотношению, наблюдаемому в митохондриях, расположенных на периферии клетки. ROI1/ROI2 = 1 (показано синей линией) указывает на отсутствие градиента. Чем выше соотношение, тем круче градиент  $H_2O_2$ . \*  $p < 0,001$ , \*\*  $p < 0,05$  по t-критерию Уэлча (Б). Репрезентативные временные проекции (кимограммы) градиентов  $H_2O_2$  вдоль линий, указанных красным на панели (А) в контрольных клетках и клетках, обработанных ауранофином. Цифры «1» и «2» обозначают ROI1 и ROI2 соответственно

В наших экспериментах была показана решающая роль тиоредоксиновой системы в формировании градиента, но только на клетках линии HeLa Kyoto. Можно предположить, что в клетках других типов распределение участия разных антиоксидантных систем в ограничении внутриклеточной диффузии пероксида водорода может отличаться. Систему можно использовать для выяснения роли различных антиоксидантных систем в различных физиологических состояниях клеток разных типов. Кроме того уже имеющаяся система при достаточном уровне автоматизации может быть использована для скринингов ингибиторов тиоредоксиновой ветви, которые уже используются в качестве препаратов по борьбе с раком, паразитозами (малярия), воспалительными процессами, нейродегенеративными заболеваниями.

В последующих экспериментах нами было продемонстрировано, что при применении описанной выше системы в случае астроцитов только одновременное ингибирование тиоредоксин-зависимой и глутатион-зависимой систем ведет к снятию градиента пероксида водорода.

### 3.3. Применение DAAO для изменения редокс-статуса нейронов

На протяжении нескольких десятилетий классическая нейробиология была сосредоточена на исследованиях электрофизиологических свойств нейронов и механизмов синаптической передачи сигналов. Несколько менее изученными оставались вопросы о сигнальных каскадах, вовлеченных в функционировании нейронов. При этом остался огромный пробел в знаниях о метаболических основах различных состояний нейронов и мозга. Основной отличительной чертой нейронов является сложная морфология, которая является результатом экстремальной поляризации клеток. Нейроны формируют отростки, аксоны и дендриты, исключительно длинные и тонкие по сравнению с таковыми в других типах клеток. Латеральная диффузия субстратов и перенос других молекулярных

компонентов вдоль этих отростков имеют сильные ограничения, связанные с малым соотношением диаметра к длине отростка. В то же время в аксонах и дендритах находятся наиболее активно работающие нейрональные компартменты, синапсы. В пре- и постсинаптических компартментах метаболические показатели исключительно высоки. Загрузка и опустошение везикул, синтез нейромедиаторов и их обратный захват, постоянный биосинтез требуют огромных клеточных ресурсов. Каждый синапс даже снабжен собственными митохондриями для обеспечения синаптической функции достаточным количеством АТФ. Исследование влияния метаболизма на судьбу или активность клетки является чрезвычайно важным, но практически неосуществимо из-за сложности манипулирования метаболическими путями. Крайне сложно изменить некоторые важные метаболические параметры (например, состояние ключевых окислительно-восстановительных пар) локально, не затрагивая вышестоящих путей передачи сигналов и метаболических путей.

Нами были запланированы эксперименты по изменению редокс-статуса пре- и постсинаптических компартментов нейронов первичных гиппокампальных культур с помощью DAAO для изучения его влияния на функционирование клеток.

### 3.3.1. С помощью DAAO можно успешно изменять редокс-статус клеток линии PC-12

Первичные тесты мы провели, используя клетки линии PC-12. Клетки линии PC-12 активно используются в нейробиологических исследованиях. Они являются клетками крысиной феохромоцитомы мозгового вещества надпочечников, но обладают некоторым количеством признаков дофаминэргических нейронов, экспрессируют специфические ионные каналы и рецепторы нейромедиаторов [85; 332]. При культивировании в присутствии NGF

происходит их дифференцировка в нейроны симпатических ганглиев. Удобство и легкость поддержания культуры клеток РС-12 делает их идеальными объектами для тестирования хемогенетических инструментов перед их использованием в первичных нейрональных культурах.

Мы создали не локализованный фьюз HyPer7-DAAO. Цитоплазма нейронов подвержена колебаниям рН в диапазоне чувствительности флуоресцентного ядра HyPer версий 1-3 [191], но не флуоресцентного ядра HyPer7. Кроме того, общепринято считать, что чувствительность нейронов к АФК крайне высока, вследствие чего в данной системе нам необходимо использовать более чувствительный сенсор HyPer7, который позволяет визуализировать пероксид водорода в области его концентраций менее десятка нМ (0,2-5 нМ).

Мы проэкспрессировали фьюз HyPer7-DAAO в клетках РС-12. В данной системе добавление в среду для имаджинга D-норвалина вызывало увеличение радиометрического сигнала HyPer7 (рисунок 15 А). Сенсор можно было восстановить при помощи DTT и полностью окислить добавкой в среду пероксида водорода.

Мы исследовали, возможно ли с помощью DAAO изменить редокс-статус клеток РС-12 на длительное время. Известно, что пероксид водорода активно участвует в сигнальных процессах, связанных с дифференцировкой клеток, в их подвижности и формировании отростков. Для этого экспрессирующие фьюз HyPer7-DAAO клетки инкубировали в течение ночи (14 ч) в среде для дифференцировки с 0,1 мМ D-норвалином, в качестве контроля выступили клетки без добавления D-норвалина. РС-12, инкубировавшиеся с D-норвалином, имели более высокий уровень окисленности цитоплазмы (рисунок 15 Б). Таким образом мы показали возможность изменять редокс-статус нейрон-подобных клеток на длительных промежутках времени и принципиальную возможность использовать локализованную DAAO для модуляции дифференцировки клеток.

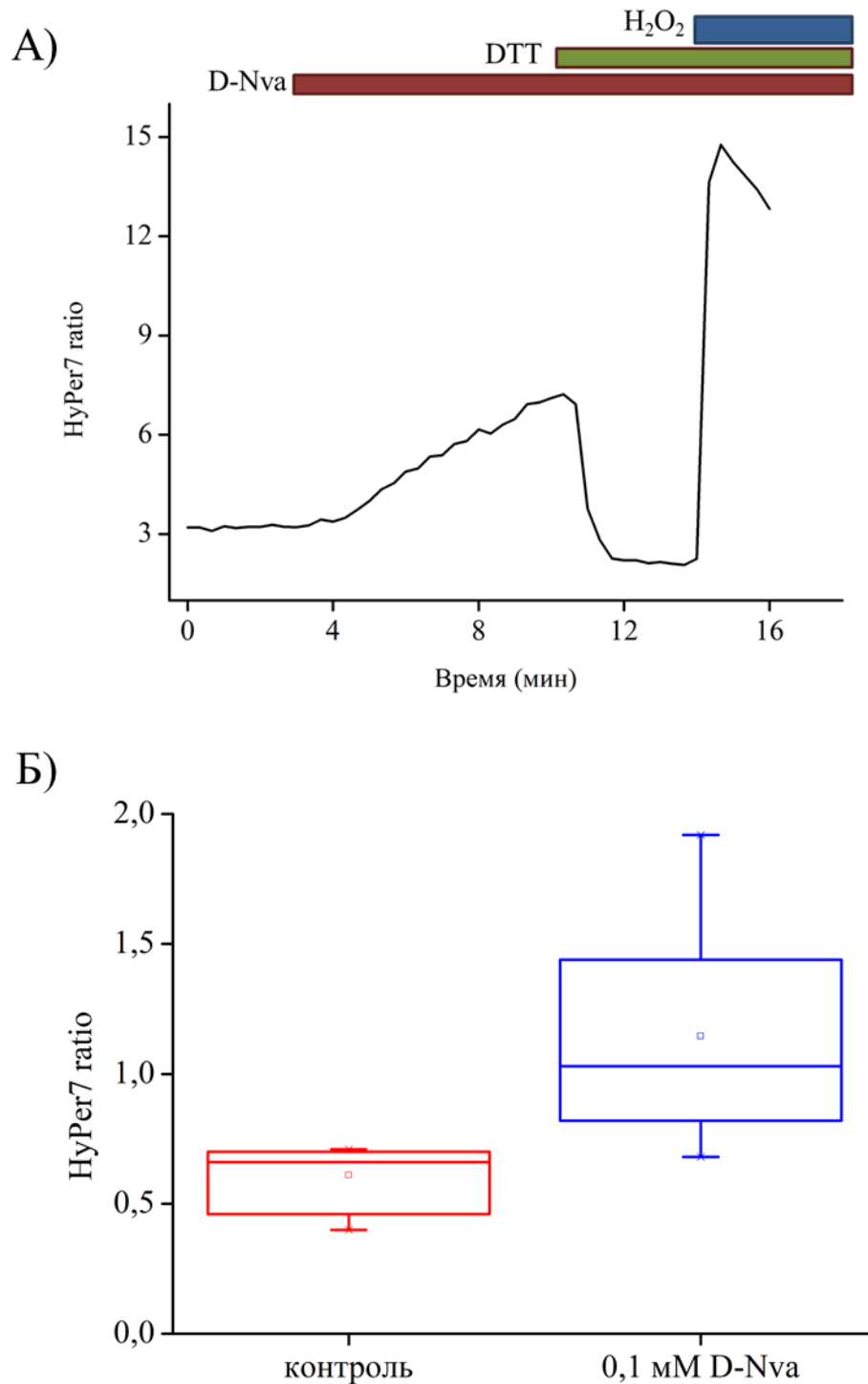


Рисунок 15 – График изменения ратиометрического сигнала сенсора HyPer7 при экспрессии фьюза HyPer7-DAAO в клетках PC-12. При их обработке 0,5 мМ D-норвалина сенсор окисляется из-за активации DAAO, 10 мМ DTT восстанавливает сенсор до минимальных ратиометрических значений, а 200 нМ пероксид водорода, добавленного в среду для имаджинга, полностью его окисляет (А). Изменение ратиометрического сигнала сенсора HyPer7 при экспрессии фьюза

HyPer7-DAAO в PC-12 при инкубировании клеток в течение 14 часов с 0,1 мМ D-норвалином, в качестве контроля использовали клетки без добавки D-аминокислоты (Б)

### 3.3.2. DAAO проявляет активность на внутренних субстратах при экспрессии в клетках нейрональной культуры

После первичных тестов на клетках PC-12 мы перешли на нейроны первичной гиппокампальной культуры мыши. Первичные гиппокампальные нейрональные культуры также широко используются в нейробиологии для изучения протекания клеточных процессов. Нейрональные культуры могут быть приготовлены из любой части мозга, но именно культуры гиппокампальных нейронов завоевали наибольшую популярность вследствие относительно простого клеточного состава гиппокампа. Основными нейронами гиппокампа являются пирамидальные нейроны, которые способны дифференцироваться в культуре в клетки с хорошо развитыми дендритами и аксонами, культура формирует множество синаптических связей, кроме того она хорошо охарактеризована [152].

Мы проэкспрессировали фьюз HyPer7-DAAO в клетках первичной гиппокампальной культуры. В этих условиях сигнал HyPer7 практически не изменялся при добавке D-аминокислот или внешнего пероксида водорода (рисунок 16 А). Чтобы проверить, теряет ли HyPer7 чувствительность к пероксиду водорода во фьюзе при экспрессии в нейронах или же по каким-то причинам оказывается в них окислен, мы добавили в среду для имаджинга DTT до концентрации 10 мМ, что привело к резкому снижению радиометрического сигнала (рисунок 16 Б). После восстановления с помощью DTT HyPer7 во фьюзе с DAAO оказался способен увеличивать сигнал после добавления как внешнего

пероксида водорода, так и D-аминокислот. Таким образом, HyPer7 был полностью

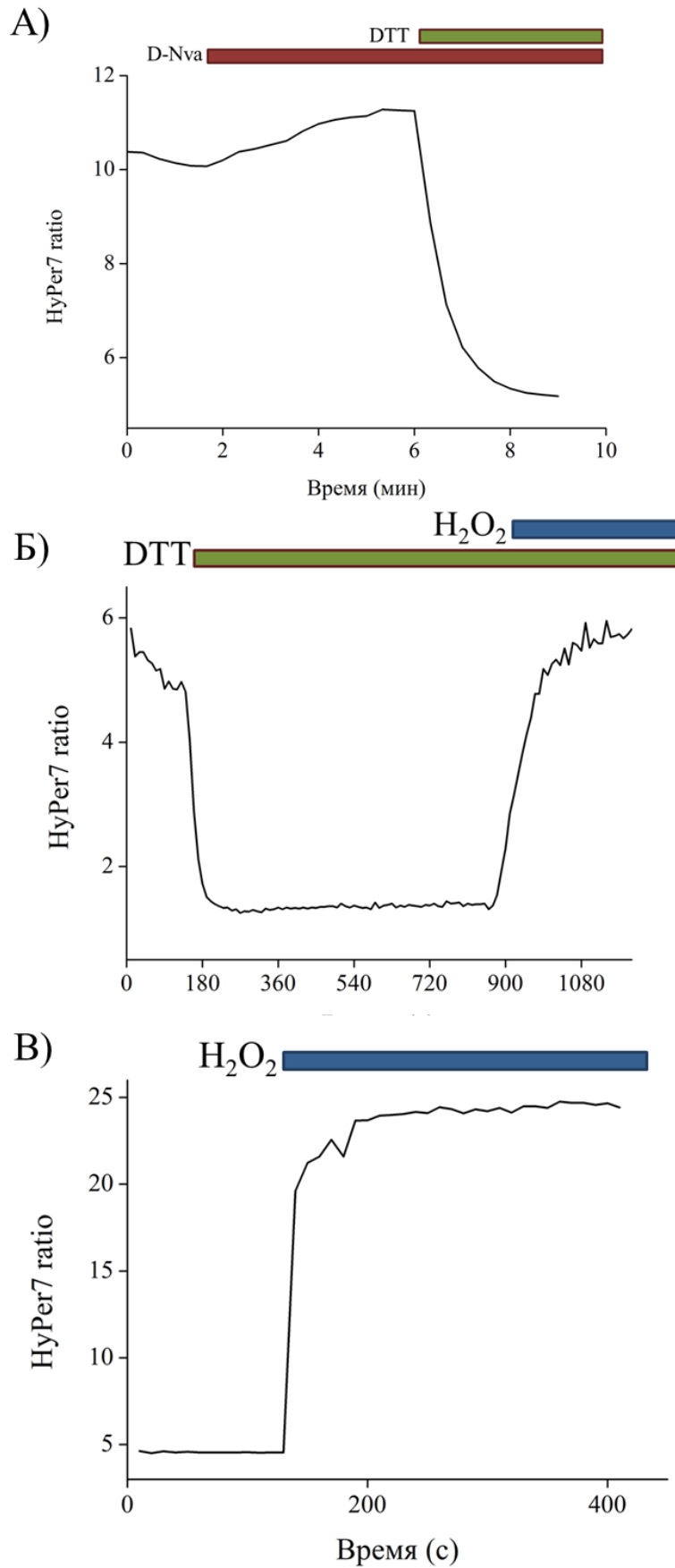


Рисунок 16 – Динамика изменения ратиометрического сигнала HyPer7 при экспрессии фьюза HyPer7-ДААО в клетках первичной нейрональной культуры. Добавление 4 мМ D-Nva вызывает слабое изменение ратиометрического сигнала сенсора, т.к. сенсор изначально окислен, что можно показать добавлением в среду 10 мМ DTT (А). Динамика изменения ратиометрического сигнала HyPer7 при экспрессии фьюза HyPer7-ДААО в клетках первичной нейрональной культуры. Сенсор оказывается изначально значительно окислен, при обработке 10 мМ DTT способен восстанавливаться, а затем окисляться до прежних значений добавкой внешнего пероксида (Б). Динамика изменения ратиометрического сигнала HyPer7 при экспрессии HyPer7 в клетках первичной нейрональной культуры. Сенсор восстановлен и отвечает на пероксид водорода (В).

функционален во фьюзе и мог как восстанавливаться, так и снова окисляться.

HyPer7, проэкспрессированный в нейронах в ко-трансфекции с ДААО также был окислен.

HyPer7, проэкспрессированный в клетках нейрональной культуры без ДААО, был полностью восстановлен и реагировал на внешние добавления пероксида водорода (рисунок 16 В).

Мы предполагаем, что ДААО в нейронах способна работать на внутреннем субстрате и продуцировать количества пероксида водорода, достаточные для полного окисления HyPer7. При этом экспрессирующие конструктор нейроны не имеют значимых морфологических изменений. Вероятно данный эффект вызван наличием в цитоплазме нейронов значительных количеств D-серина, продуцируемого серинрацемазой – ферментом, осуществляющим изомеризацию L-серина в D-серин и наоборот. МЕМ содержит в своем составе значительные количества L-серина, который может быть доступен для фермента.

Известно, что D-серин играет крайне важную роль в модуляции нейрональной передачи [74]. Длительно время D-серин считался глиальным трансмисмиттером, считалось, что локализуется он исключительно в астроцитах, которые способны к его выбросу под воздействием глутамата [262]. Позже было



показано, что D-серин и серинрацемаза локализируются исключительно в нейронах [17; 204]. D-серин действует как ко-трансммиттер, но не выбрасывается при экзоцитозе синаптических везикул, а выходит из нейронов при активации транспортеров аминокислот [261]. Вероятно, в нейронах D-серин находится в форме, в которой он доступен для DAAO. Это ведет к повышенному уровню окисления  $\text{NuPer}^7$  и цитоплазмы нейронов, что значительным образом может влиять на их дифференциацию и функционирование. Кроме того неизвестно, что в этих условиях происходит с концентрацией D-серина в нейронах и может ли ее

возможное изменение повлиять на нейрональную передачу. Известна связь между нарушениями работы DAAO млекопитающих и увеличением риска развития шизофрении [320], что говорит в пользу предположения о том, что RgDAAO, проэкспрессированная в цитоплазме нейронов, может вести к нарушению их функционирования.

### 3.3.3. Внесение точечной мутации в окружение активного центра DAAO не привело к значительному снижению ее активности в отношении D-серина

Для дальнейшей работы в условиях нейрональных культур мы решили попробовать снизить активность DAAO по отношению к D-серину. Мы провели литературный поиск и обнаружили один вариант замены (Y258A) в изоформе DAAO из *Trigonopsis variabilis*, для которого было показано отсутствие функциональной активности фермента для D-серина и ее увеличение для нейтральных аминокислот с разветвленной боковой группой, к которым относится и D-норвалин. Мы воспользовались Protein BLAST для выравнивания белковых последовательностей DAAO из *Trigonopsis variabilis* и *Rhodotorula*

*gracilis*. По итогам выравнивания и исследования кристаллической структуры RgDAAO мы внесли в последовательность белка замену Y236A. Фьюз DAAO(Y236A) с HyPer проэкспрессировали в клетках HeLa Kyoto, где он не показал существенного снижения функциональной активности по отношению к D-серину (рисунок 17), вследствие чего дальнейшей работы с ним не продолжалось.

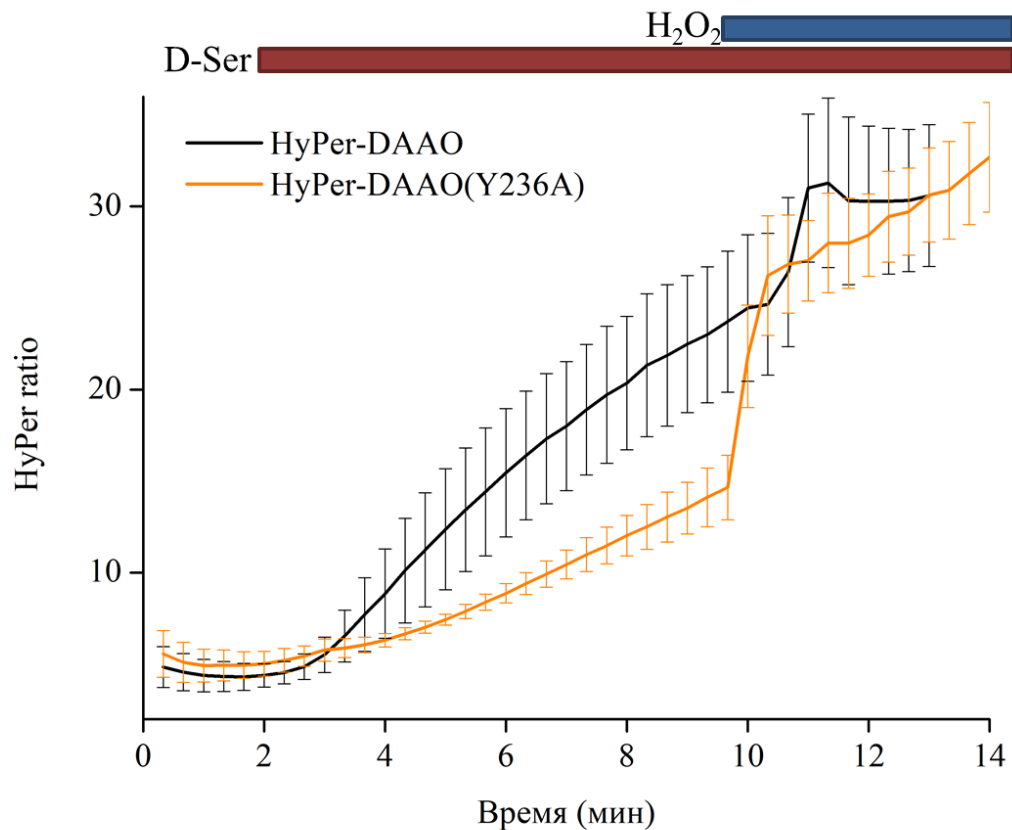


Рисунок 17 – Изменение рациометрического сигнала HyPer в клетках HeLa Kyoto при экспрессии в них фьюза HyPer-DAAO или HyPer-DAAO(Y236A) при добавлении в среду 4 мМ D-серина

Мы считаем, что возможность использования DAAO в нейронах млекопитающих все еще не исключена. Вариант RgDAAO может быть использован с сигналами локализации в различные органеллы для изменения из редокс-статуса. На данный момент доподлинно неизвестен паттерн локализации D-серина в нейронах, не исключена возможность его отсутствия в части органелл. Кроме того, в некоторых частях мозга (мозжечок) не выявлено значимых

концентраций D-серина [262], что предполагает возможность использования там DAAO в качестве редокс-модулятора. Также решение этой проблемы можно искать с помощью направленного и ненаправленного мутагенеза последовательности фермента с целью снижения его активности относительно D-серина.

### 3.4. Разработка кардиомиоцит-специфичной версии фьюза Hyper-DAAO

Сердце нуждается в постоянном снабжении энергией, получаемой при окислительном фосфорилировании, и поэтому является одним из наиболее окислительно активных органов млекопитающих. Рост распространенности заболеваний сердца привел к повышенному интересу мирового научного сообщества к роли эндогенных АФК на их развитие. Большую часть сердечных патологий (гипертрофию, ишемию, сердечную недостаточность) связывают с окислительным стрессом, вызванным дисбалансом в продукции и элиминации АФК [135]. Ранее вычлнить конкретную роль окислительного стресса в инициации заболеваний сердца было невозможно. Использование хомогенетического генератора пероксида водорода DAAO в коллаборации с группой Томаса Митчела позволило контролируемо продуцировать  $H_2O_2$  в кардиомиоцитах в первичной культуре и в сердцах крыс *in vivo*.

C-конец Нурег был фьюзирван с DAAO, к последовательности был добавлен сигнал ядерного экспорта, далее изначальный CMV-промотор плазмиды был заменен на кардиомиоцит-специфичный промотор сердечного тропонина T (сTnT). На основании полученной AAV-плазмиды были собраны вирусные частицы с серотипом 9. Эта система позволила добиться специфичной экспрессии генератора и детектора  $H_2O_2$  в кардиомиоцитах, хотя также была детектирована умеренная экспрессия конструктора в клетках скелетной мускулатуры.

Вирусные частицы инъецировали внутривенно в самцов крыс, через 4-5 недель выделяли кардиомиоциты и проводили флуоресцентный имаджинг. Добавка D-аланина, но не L-аланина, приводила к образованию пероксида водорода, его уровень возрастал в течение 45 минут и выходил на плато (рисунок 18 А, Б). Ответ на D-аланин был дозозависимым. Для доказательства того, что наблюдаемый ответ не был вызван изменением внутриклеточного рН, кардиомиоциты, дифференцированные из человеческих IPS, трансфецировали плазмидами, несущими вставку *SypHer2-DAAO*, и подвергали воздействию

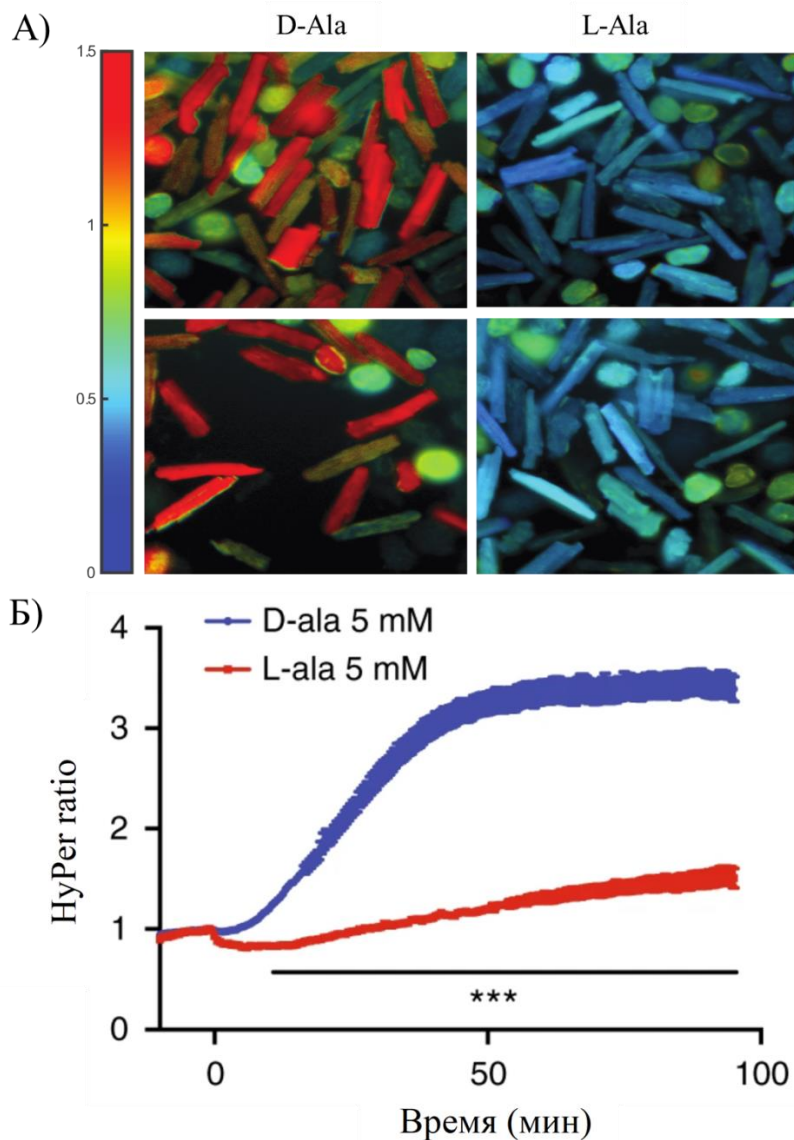


Рисунок 18 – Радиометрический сигнал HyPer кардиомиоцитов, выделенных из крыс, заколотых вирусными частицами AAV9, несущих фьюз HyPer-DAAO, после обработки 10 mM D-аланина и L-аланина, фотография

кардиомиоцитов в псевдоцветах (А) и график изменения радиометрического сигнала HyPer (Б)

D-аланина. При этом не наблюдали значительного изменения сигнала сенсора в сравнении с кардиомиоцитами, трансфецированными Hyper-DAAO. Таким образом система позволяет контролируемо продуцировать пероксид водорода в кардиомиоцитах при стимуляции клеток D-аланином.

Затем мы исследовали эффект активации DAAO на редокс-чувствительные транскрипционные факторы Nrf2 и NF-κB. Для этого к клеткам в культуре добавляли D-аланин или L-аланин, инкубировали в течение двух часов, после чего оценивали уровень транскриптов, зависящих от Nrf2 и NF-κB. Транскрипты Nrf2 *Hmox1*, *Nqo1* и *Sxn1* (кодирующие гем-оксигеназу 1, NADPH-хинон оксидазу 1 и сульфиредоксин 1, соответственно), а также транскрипты NF-κB *Illb*, *Tnfa*, *Icam1* и *Nos2* (кодирующие интерлейкин 1β, фактор некроза опухолей α, ICAM-1 и индуцибельную NO-синтазу) были повышены (рисунок 19). Транскрипты редокс-активных белков *Prdx1*, *Txn1* и *Gpx3* (кодирующие пероксиредоксин 1, тиоредоксин 1 и глутатионпероксидазу 3) Также были значительно повышены. Эта активация воспалительного и адаптивного ответов демонстрирует, что генерация больших количеств внутриклеточного пероксида водорода при помощи DAAO инициирует переход кардиомиоцитов в состояние окислительного стресса.

Затем данная система была применена в крысах *in vivo*. Для этого заколотые вирусными частицами, несущими фьюз HyPer-DAAO, крысы получали D-аланин через питьевую воду. Через 2 недели у крыс формировалась тяжелая форма систолической дисфункции, через 4 недели – дилатационная кардиомиопатия. Наблюдали сниженный уровень фосфоламбана и повышенный уровень маркеров сердечной недостаточности (ANP, BNP, cTnI). Также как и в клетках культуры присутствовал повышенный уровень транскрипционных мишеней Nrf2, но не NF-κB. В кардиомиоцитах также наблюдали пониженную концентрацию

восстановленного глутатиона при повышенной концентрации общего глутатиона. Интересной особенностью было полное отсутствие фиброза сердечной ткани.

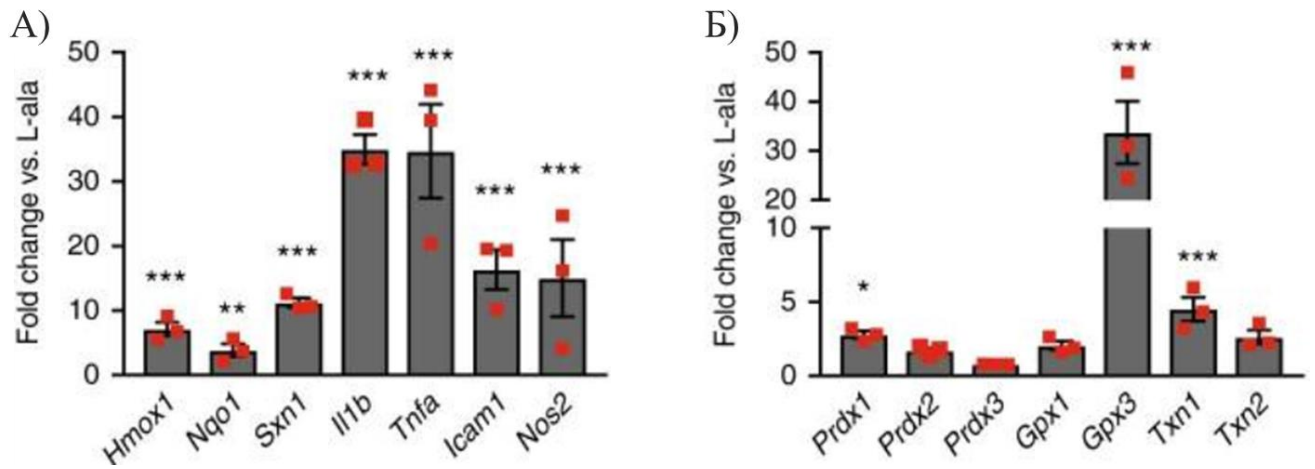


Рисунок 19 – Изменения в экспрессии транскрипционных мишеней фактора Nrf2 *Hmox1*, *Nqo1* и *Sxn1* и мишеней NF-κB *Il1b*, *Tnfa*, *Icam1* и *Nos2* в кардиомиоцитах, выделенных из крыс, экспрессирующих DAAO и обработанных 10 mM D-аланина или L-аланина в течение 120 минут (А). Изменения в экспрессии редокс-активных белков *Prdx1*, *Prdx2*, *Prdx3*, *Gpx1*, *Gpx3*, *Txn1* и *Txn2* в кардиомиоцитах, выделенных из крыс, экспрессирующих DAAO и обработанных 10 mM D-аланина или L-аланина в течение 120 минут (Б)

Данная работа показывает, что уже одного окислительного стресса достаточно для развития дисфункции сердца без фиброзных изменений. Существуют предположения о том, что конкретные клеточные источники пероксида водорода могут иметь различное влияние на развитие и протекание патологических процессов сердца [314]. Использование DAAO позволяет пролить свет на эту проблему в будущих исследованиях, в которых хемогенетический генератор пероксида водорода может быть направлен в различные клеточные компартменты: ядро, плазматическую мембрану, митохондрии. В нашем исследовании мы уже показали возможность использовать DAAO в части этих органелл и подобрали подходящие для этих условий субстраты: D-аланин и D-норвалин. Другим важным результатом этой работы является демонстрация принципиальной возможности использовать DAAO *in vivo*. Использование разных

концентраций D-аминокислот в питьевой воде может позволить генерировать не только концентрации пероксида водорода, ведущие к окислительному стрессу, но и нормальные физиологические количества пероксида, с помощью которых может быть возможно регулировать протекание сигнальных путей, причем не только в клетках сердца, но и других органов.

#### 4. Заключение

Полученные результаты демонстрируют широчайшую область возможного применения хемогенетического генератора пероксида водорода DAAO в изучении редокс-зависимых процессов в клетках и целых организмах, в условиях их нормального функционирования или при развитии патологических состояний.

В данной работе была обнаружена возможность использования D-норвалина в качестве субстрата DAAO, действующего в живых системах в микромолярных концентрациях, в отличие от миллимолярных концентраций ранее использовавшихся субстратов. Теоретическая возможность использования D-норвалина в виде фоторазрушающихся конъюгатов, в сочетании с локализованной в том или ином клеточном компартменте DAAO, позволит изучать сигнальные функции пероксида водорода в клетке максимально приближенно к реальности, в которой  $H_2O_2$  генерируется и действует строго локально вследствие ограниченности его диффузии, регулируемой антиоксидантными системами клетки. Пероксид водорода играет огромную роль в регуляции подвижности клеток, их дифференцировке и процессах регенерации. Во всех этих процессах критически важны создаваемые в клетке «редокс-ландшафты» - области высокой и низкой концентрации  $H_2O_2$ , на картину распределения которых можно будет повлиять с ювелирной точностью.

Эксперименты с использованием DAAO позволили впервые напрямую продемонстрировать ограниченность диффузии пероксида водорода в цитозоле клеток Hela Kyoto, обусловленную активностью тиоредоксиновой антиоксидантной системы. Простота и наглядность, с которой два локализованных белка – mito-HyPer3 и DAAO-NLS - позволяют визуализировать функциональность тиоредоксиновой антиоксидантной системы в Hela Kyoto в качестве системы, размечающей градиенты  $H_2O_2$  в клетке, могут быть использованы для автоматизированного поиска новых ингибиторов



тиоредоксинредуктаз. Создаваемые на основе ингибиторов тиоредоксинредуктаз препараты востребованы в медицине и уже активно используются в терапии рака. Не исключена возможность того, что в клетках других типов ограниченность диффузии пероксида зависит не только или не столько от тиоредоксина, но и от других антиоксидантных путей. Созданная на основе DAAO система позволит исследовать и эту возможность.

Была исследована возможность использования DAAO в клетках первичных культур. Была детектирована активность DAAO без внесения внешней D-аминокислоты в нейронах первичной гиппокампальной культуры, что ставит под вопрос возможность использования данной изоформы фермента для модуляции редокс-статуса нейронов данного отдела мозга. Но в то же время, экспрессия DAAO и НуPer7 в нейронах является перспективным инструментом картирования сайтов продукции и локализации D-аминокислот в нейронах. В случае кардиомиоцитов первичной культуры экспрессия в них DAAO позволила контролируемо менять редокс-статус клеток, что в свою очередь приводило к изменению активности транскрипционных факторов.

Огромным шагом стала демонстрация использования фермента *in vivo* для создания хемогенетической модели патологий сердца. Известно, что окислительный стресс сопровождает огромное количество самых разных по своей природе патологий всех систем организма. Использование комбинации из тканеспецифичных промоторов и сигналов локализации фермента позволит создать новые модели патологий и изучить причинно-следственные связи между окислительным стрессом и развитием заболеваний печени (стеатоз, гепатоцеллюлярная карцинома), легких (астма, фиброз, хроническая обструктивная болезнь легких), почек (хроническая болезнь почек), иммунной системы (системная волчанка), различных желез (диабет) и так далее. Эти модели позволят не только моделировать и изучать патогенез заболеваний перечисленных органов, но и скринировать препараты, направленные на терапию этих заболеваний.

По результатам проведенной работы были сформулированы следующие выводы:

1. D-норвалин может быть использован в качестве альтернативного субстрата для генерации пероксида водорода при помощи DAAO в живых системах. Использование от 50 мкМ до 4 мМ D-норвалина позволяет создать в цитозоле клеток Hela Kyoto концентрации пероксида водорода в концентрации от единиц до сотен нМ, что позволяет моделировать как сигнальные, так и патологические процессы в клетках. Использование D-норвалина в миллимолярных концентрациях также позволяет генерировать  $H_2O_2$  с помощью DAAO в матриксе митохондрий.
2. Диффузия пероксида водорода, генерируемого с помощью DAAO при добавлении D-аминокислот, ограничена. Тиоредоксиновая ветвь антиоксидантной защиты играет ключевую роль в ограничении диффузии  $H_2O_2$  в цитозоле клеток. В этом ограничении диффузии пероксида водорода участвуют как тиоредоксиновая система цитозоля, так и матрикса митохондрий.
3. С помощью DAAO возможно изменение редокс-статуса клеток PC-12 на короткие и длительные промежутки времени.
4. Экспрессия DAAO в нейронах первичной гиппокампальной культуры приводит к формированию пероксида водорода без добавления внешних D-аминокислот.
5. Экспрессия DAAO в кардиомиоцитах первичной культуры позволяет контролируемо изменять их редокс-статус добавлением D-аминокислот, это изменение сопровождается возрастанием уровня транскриптов, зависящих от Nrf2 (*Hmox1*, *Nqo1* и *Sxn1*) и NF-κB (*Il1b*, *Tnfa*, *Icam1* и *Nos2*). Хомогенетический генератор DAAO позволяет моделировать патологические процессы в сердцах крыс *in vivo*.

## Список литературы

1. Abe T. K., Honda T., Takei K., Mikoshiba K., Hoffman-Kim D., Jay D. G., Kuwano R. Dynactin is essential for growth cone advance // *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2008. 372. № 3. С. 418–422.
2. Ainley A. D., Challenger F. CCLXXX.—Studies of the boron–carbon linkage. Part I. The oxidation and nitration of phenylboric acid // *J. Chem. Soc.* 1930. 0. № 0. С. 2171–2180.
3. Alberdi P., Cabezas-Cruz A., Prados P. E., Rayo M. V., Artigas-Jerónimo S., La Fuente J. de. The redox metabolic pathways function to limit *Anaplasma phagocytophilum* infection and multiplication while preserving fitness in tick vector cells // *Scientific reports*. 2019. 9. № 1. С. 13236.
4. Albers A. E., Okreglak V. S., Chang C. J. A FRET-based approach to ratiometric fluorescence detection of hydrogen peroxide // *Journal of the American Chemical Society*. 2006. 128. № 30. С. 9640–9641.
5. Albrecht S. C., Barata A. G., Grosshans J., Teleman A. A., Dick T. P. In vivo mapping of hydrogen peroxide and oxidized glutathione reveals chemical and regional specificity of redox homeostasis // *Cell metabolism*. 2011. 14. № 6. С. 819–829.
6. Amblard I., Thauvin M., Rampon C., Queguiner I., Pak V. V., Belousov V., Prochiantz A., Volovitch M., Joliot A., Vríz S. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and Engrailed 2 paracrine activity synergize to shape the zebrafish optic tectum // *Communications biology*. 2020. 3. № 1. С. 536.
7. Ambruso D. R., Cusack N., Thurman G. NADPH oxidase activity of neutrophil specific granules: requirements for cytosolic components and evidence of assembly during cell activation // *Molecular genetics and metabolism*. 2004. 81. № 4. С. 313–321.

8. Ameziane-El-Hassani R., Morand S., Boucher J.-L., Frapart Y.-M., Apostolou D., Agnandji D., Gnidehou S., Ohayon R., Noël-Hudson M.-S., Francon J., Lalaoui K., Virion A., Dupuy C. Dual oxidase-2 has an intrinsic Ca<sup>2+</sup>-dependent H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-generating activity // *Journal of Biological Chemistry*. 2005. 280. № 34. C. 30046–30054.
9. An B. C., Choi Y.-D., Oh I.-J., Kim J. H., Park J.-I., Lee S.-W. GPx3-mediated redox signaling arrests the cell cycle and acts as a tumor suppressor in lung cancer cell lines // *PloS one*. 2018. 13. № 9. e0204170.
10. Anda F. C. de, Meletis K., Ge X., Rei D., Tsai L.-H. Centrosome motility is essential for initial axon formation in the neocortex // *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2010. 30. № 31. C. 10391–10406.
11. Antunes F., Cadenas E. Estimation of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> gradients across biomembranes // *FEBS letters*. 2000. 475. № 2. C. 121–126.
12. Arnér E. S. J. Focus on mammalian thioredoxin reductases--important selenoproteins with versatile functions // *Biochimica et biophysica acta*. 2009. 1790. № 6. C. 495–526.
13. Babelova A., Avaniadi D., Jung O., Fork C., Beckmann J., Kosowski J., Weissmann N., Anilkumar N., Shah A. M., Schaefer L., Schröder K., Brandes R. P. Role of Nox4 in murine models of kidney disease // *Free radical biology & medicine*. 2012. 53. № 4. C. 842–853.
14. Babior B. M., Kipnes R. S., Curnutte J. T. Biological defense mechanisms. The production by leukocytes of superoxide, a potential bactericidal agent // *The Journal of clinical investigation*. 1973. 52. № 3. C. 741–744.
15. Baier J., Maisch T., Maier M., Engel E., Landthaler M., Bäuml W. Singlet oxygen generation by UVA light exposure of endogenous photosensitizers // *Biophysical journal*. 2006. 91. № 4. C. 1452–1459.

16. Bak D. W., Bechtel T. J., Falco J. A., Weerapana E. Cysteine reactivity across the subcellular universe // *Current opinion in chemical biology*. 2019. 48. C. 96–105.
17. Balu D. T., Takagi S., Puhl M. D., Benneyworth M. A., Coyle J. T. D-serine and serine racemase are localized to neurons in the adult mouse and human forebrain // *Cellular and molecular neurobiology*. 2014. 34. № 3. C. 419–435.
18. Bánfi B., Malgrange B., Knisz J., Steger K., Dubois-Dauphin M., Krause K.-H. NOX3, a superoxide-generating NADPH oxidase of the inner ear // *Journal of Biological Chemistry*. 2004. 279. № 44. C. 46065–46072.
19. Bánfi B., Maturana A., Jaconi S., Arnaudeau S., Laforge T., Sinha B., Ligeti E., Demaurex N., Krause K. H. A mammalian H<sup>+</sup> channel generated through alternative splicing of the NADPH oxidase homolog NOH-1 // *Science (New York, N.Y.)*. 2000. 287. № 5450. C. 138–142.
20. Bánfi B., Molnár G., Maturana A., Steger K., Hegedûs B., Demaurex N., Krause K. H. A Ca(2+)-activated NADPH oxidase in testis, spleen, and lymph nodes // *Journal of Biological Chemistry*. 2001. 276. № 40. C. 37594–37601.
21. Bartesaghi S., Radi R. Fundamentals on the biochemistry of peroxynitrite and protein tyrosine nitration // *Redox biology*. 2018. 14. C. 618–625.
22. Baumgart F., Rossi A., Verkman A. S. Light inactivation of water transport and protein-protein interactions of aquaporin-Killer Red chimeras // *The Journal of general physiology*. 2012. 139. № 1. C. 83–91.
23. Beck S., Sakurai T., Eustace B. K., Beste G., Schier R., Rudert F., Jay D. G. Fluorophore-assisted light inactivation: A high-throughput tool for direct target validation of proteins // *PROTEOMICS*. 2002. 2. № 3. C. 247.
24. Becker K., Gromer S., Schirmer R. H., Müller S. Thioredoxin reductase as a pathophysiological factor and drug target // *European journal of biochemistry*. 2000. 267. № 20. C. 6118–6125.

25. Beckman J. S., Koppenol W. H. Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly // *The American journal of physiology*. 1996. 271. 5 Pt 1. C1424-37.
26. Bedard K., Jaquet V., Krause K.-H. NOX5: from basic biology to signaling and disease // *Free radical biology & medicine*. 2012. 52. № 4. C. 725–734.
27. Behring J. B., van der Post S., Mooradian A. D., Egan M. J., Zimmerman M. I., Clements J. L., Bowman G. R., Held J. M. Spatial and temporal alterations in protein structure by EGF regulate cryptic cysteine oxidation // *Science signaling*. 2020. 13. № 615.
28. Belousov V. V., Fradkov A. F., Lukyanov K. A., Staroverov D. B., Shakhbazov K. S., Terskikh A. V., Lukyanov S. Genetically encoded fluorescent indicator for intracellular hydrogen peroxide // *Nature methods*. 2006. 3. № 4. C. 281–286.
29. Bender T., Martinou J.-C. Where killers meet--permeabilization of the outer mitochondrial membrane during apoptosis // *Cold Spring Harbor perspectives in biology*. 2013. 5. № 1. a011106.
30. Bestetti S., Galli M., Sorrentino I., Pinton P., Rimessi A., Sitia R., Medraño-Fernandez I. Human aquaporin-11 guarantees efficient transport of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> across the endoplasmic reticulum membrane // *Redox biology*. 2020. 28. C. 101326.
31. Bienert G. P., Chaumont F. Aquaporin-facilitated transmembrane diffusion of hydrogen peroxide // *Biochimica et biophysica acta*. 2014. 1840. № 5. C. 1596–1604.
32. Bienert G. P., Møller A. L. B., Kristiansen K. A., Schulz A., Møller I. M., Schjoerring J. K., Jahn T. P. Specific aquaporins facilitate the diffusion of hydrogen peroxide across membranes // *Journal of Biological Chemistry*. 2007. 282. № 2. C. 1183–1192.

33. Bilan D. S., Belousov V. V. HyPer Family Probes: State of the Art // *Antioxidants & redox signaling*. 2016. 24. № 13. C. 731–751.
34. Bilan D. S., Pase L., Joosen L., Gorokhovatsky A. Y., Ermakova Y. G., Gadella T. W. J., Grabher C., Schultz C., Lukyanov S., Belousov V. V. HyPer-3: a genetically encoded H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> probe with improved performance for ratiometric and fluorescence lifetime imaging // *ACS chemical biology*. 2013. 8. № 3. C. 535–542.
35. Biteau B., Labarre J., Toledano M. B. ATP-dependent reduction of cysteine-sulphinic acid by *S. cerevisiae* sulphiredoxin // *Nature*. 2003. 425. № 6961. C. 980–984.
36. Björnstedt M., Xue J., Huang W., Akesson B., Holmgren A. The thioredoxin and glutaredoxin systems are efficient electron donors to human plasma glutathione peroxidase // *Journal of Biological Chemistry*. 1994. 269. № 47. C. 29382–29384.
37. Bogeski I., Niemeyer B. A. Redox regulation of ion channels // *Antioxidants & redox signaling*. 2014. 21. № 6. C. 859–862.
38. Bonini M. G., Rota C., Tomasi A., Mason R. P. The oxidation of 2',7'-dichlorofluorescein to reactive oxygen species: a self-fulfilling prophesy? // *Free radical biology & medicine*. 2006. 40. № 6. C. 968–975.
39. Booth D. M., Enyedi B., Geiszt M., Várnai P., Hajnóczky G. Redox Nanodomains Are Induced by and Control Calcium Signaling at the ER-Mitochondrial Interface // *Molecular cell*. 2016. 63. № 2. C. 240–248.
40. Borregaard N., Heiple J. M., Simons E. R., Clark R. A. Subcellular localization of the b-cytochrome component of the human neutrophil microbicidal oxidase: translocation during activation // *The Journal of cell biology*. 1983. 97. № 1. C. 52–61.
41. Bosello-Travain V., Conrad M., Cozza G., Negro A., Quartesan S., Rossetto M., Roveri A., Toppo S., Ursini F., Zaccarin M., Maiorino M. Protein disulfide

- isomerase and glutathione are alternative substrates in the one Cys catalytic cycle of glutathione peroxidase 7 // *Biochimica et biophysica acta*. 2013. 1830. № 6. C. 3846–3857.
42. Boumis G., Giardina G., Angelucci F., Bellelli A., Brunori M., Dimastrogiovanni D., Saccoccia F., Miele A. E. Crystal structure of *Plasmodium falciparum* thioredoxin reductase, a validated drug target // *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2012. 425. № 4. C. 806–811.
43. Boveris A., Chance B. The mitochondrial generation of hydrogen peroxide. General properties and effect of hyperbaric oxygen // *The Biochemical journal*. 1973. 134. № 3. C. 707–716.
44. Boveris A., Martino E., Stoppani A.O.M. Evaluation of the horseradish peroxidase-scopoletin method for the measurement of hydrogen peroxide formation in biological systems // *Analytical Biochemistry*. 1977. 80. № 1. C. 145–158.
45. Brejc K., Sixma T. K., Kitts P. A., Kain S. R., Tsien R. Y., Ormö M., Remington S. J. Structural basis for dual excitation and photoisomerization of the *Aequorea victoria* green fluorescent protein // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1997. 94. № 6. C. 2306–2311.
46. Brigelius-Flohé R., Kipp A. P. Physiological functions of GPx2 and its role in inflammation-triggered carcinogenesis // *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2012. 1259. C. 19–25.
47. Brown G. C., Borutaite V. Nitric oxide and mitochondrial respiration in the heart // *Cardiovascular research*. 2007. 75. № 2. C. 283–290.
48. Brumbarova T., Le C., Bauer P. Hydrogen Peroxide Measurement in Arabidopsis Root Tissue Using Amplex Red // *BIO-PROTOCOL*. 2016. 6. № 21.
49. Bulina M. E., Chudakov D. M., Britanova O. V., Yanushevich Y. G., Staroverov D. B., Chepurnykh T. V., Merzlyak E. M., Shkrob M. A., Lukyanov S., Lukyanov K.



- A. A genetically encoded photosensitizer // *Nature biotechnology*. 2006. 24. № 1. C. 95–99.
50. Bunik V. I., Sievers C. Inactivation of the 2-oxo acid dehydrogenase complexes upon generation of intrinsic radical species // *European journal of biochemistry*. 2002. 269. № 20. C. 5004–5015.
51. Burgers P. P., Ma Y., Margarucci L., Mackey M., van der Heyden M. A. G., Ellisman M., Scholten A., Taylor S. S., Heck A. J. R. A small novel A-kinase anchoring protein (AKAP) that localizes specifically protein kinase A-regulatory subunit I (PKA-RI) to the plasma membrane // *The Journal of biological chemistry*. 2012. 287. № 52. C. 43789–43797.
52. Byrne L. C., Khalid F., Lee T., Zin E. A., Greenberg K. P., Visel M., Schaffer D. V., Flannery J. G. AAV-mediated, optogenetic ablation of Müller Glia leads to structural and functional changes in the mouse retina // *PloS one*. 2013. 8. № 9. e76075.
53. Cai H., McNally J. S., Weber M., Harrison D. G. Oscillatory shear stress upregulation of endothelial nitric oxide synthase requires intracellular hydrogen peroxide and CaMKII // *Journal of molecular and cellular cardiology*. 2004. 37. № 1. C. 121–125.
54. Cao C., Leng Y., Kufe D. Catalase activity is regulated by c-Abl and Arg in the oxidative stress response // *Journal of Biological Chemistry*. 2003. 278. № 32. C. 29667–29675.
55. Cao C., Leng Y., Liu X., Yi Y., Li P., Kufe D. Catalase is regulated by ubiquitination and proteosomal degradation. Role of the c-Abl and Arg tyrosine kinases // *Biochemistry*. 2003. 42. № 35. C. 10348–10353.
56. Carmona M., Cubas L. de, Bautista E., Moral-Blanch M., Medraño-Fernández I., Sitia R., Boronat S., Ayté J., Hidalgo E. Monitoring cytosolic H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> fluctuations

- arising from altered plasma membrane gradients or from mitochondrial activity // Nature communications. 2019. 10. № 1. C. 4526.
57. Carvalho D. P., Dupuy C. Thyroid hormone biosynthesis and release // Molecular and cellular endocrinology. 2017. 458. C. 6–15.
58. Castro L., Tórtora V., Mansilla S., Radi R. Aconitases: Non-redox Iron-Sulfur Proteins Sensitive to Reactive Species // Accounts of chemical research. 2019. 52. № 9. C. 2609–2619.
59. Cathcart R., Schwieters E., Ames B. N. Detection of picomole levels of hydroperoxides using a fluorescent dichlorofluorescein assay // Analytical Biochemistry. 1983. 134. № 1. C. 111–116.
60. Chakraborty S., Hill A. L., Shirsekar G., Afzal A. J., Wang G.-L., Mackey D., Bonello P. Quantification of hydrogen peroxide in plant tissues using Amplex Red // Methods (San Diego, Calif.). 2016. 109. C. 105–113.
61. Chance B., Sies H., Boveris A. Hydroperoxide metabolism in mammalian organs // Physiological reviews. 1979. 59. № 3. C. 527–605.
62. Chang T.-S., Jeong W., Woo H. A., Lee S. M., Park S., Rhee S. G. Characterization of mammalian sulfiredoxin and its reactivation of hyperoxidized peroxiredoxin through reduction of cysteine sulfinic acid in the active site to cysteine // Journal of Biological Chemistry. 2004. 279. № 49. C. 50994–51001.
63. Chen Y., Azad M. B., Gibson S. B. Superoxide is the major reactive oxygen species regulating autophagy // Cell death and differentiation. 2009. 16. № 7. C. 1040–1052.
64. Cheng G., Cao Z., Xu X., Meir E. G.V., Lambeth J.D. Homologs of gp91 phox : cloning and tissue expression of Nox3, Nox4, and Nox5 // Gene. 2001. 269. 1-2. C. 131–140.

65. Choi H. J., Kang S. W., Yang C. H., Rhee S. G., Ryu S. E. Crystal structure of a novel human peroxidase enzyme at 2.0 Å resolution // *Nature structural biology*. 1998. 5. № 5. C. 400–406.
66. Choi H.-J., Kim S.-J., Mukhopadhyay P., Cho S., Woo J.-R., Storz G., Ryu S.-E. Structural Basis of the Redox Switch in the OxyR Transcription Factor // *Cell*. 2001. 105. № 1. C. 103–113.
67. Chu F. F., Doroshov J. H., Esworthy R. S. Expression, characterization, and tissue distribution of a new cellular selenium-dependent glutathione peroxidase, GSHPx-GI // *Journal of Biological Chemistry*. 1993. 268. № 4. C. 2571–2576.
68. Chu F.-F., Esworthy R. S., Chu P. G., Longmate J. A., Huycke M. M., Wilczynski S., Doroshov J. H. Bacteria-induced intestinal cancer in mice with disrupted Gpx1 and Gpx2 genes // *Cancer research*. 2004. 64. № 3. C. 962–968.
69. Cifuentes-Pagano E., Saha J., Csányi G., Ghoulé I. A., Sahoo S., Rodríguez A., Wipf P., Pagano P. J., Skoda E. M. Bridged tetrahydroisoquinolines as selective NADPH oxidase 2 (Nox2) inhibitors // *MedChemComm*. 2013. 4. № 7. C. 1085–1092.
70. Cimini A., Gentile R., Angelucci F., Benedetti E., Pitari G., Giordano A., Ippoliti R. Neuroprotective effects of PrxI over-expression in an in vitro human Alzheimer's disease model // *Journal of cellular biochemistry*. 2013. 114. № 3. C. 708–715.
71. Cochemé H. M., Quin C., McQuaker S. J., Cabreiro F., Logan A., Prime T. A., Abakumova I., Patel J. V., Fearnley I. M., James A. M., Porteous C. M., Smith R. A. J., Saeed S., Carré J. E., Singer M., Gems D., Hartley R. C., Partridge L., Murphy M. P. Measurement of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> within living *Drosophila* during aging using a ratiometric mass spectrometry probe targeted to the mitochondrial matrix // *Cell metabolism*. 2011. 13. № 3. C. 340–350.

72. COHEN G., HOCHSTEIN P. GLUTATHIONE PEROXIDASE: THE PRIMARY AGENT FOR THE ELIMINATION OF HYDROGEN PEROXIDE IN ERYTHROCYTES // *Biochemistry*. 1963. 2. C. 1420–1428.
73. Cox A. G., Peskin A. V., Paton L. N., Winterbourn C. C., Hampton M. B. Redox potential and peroxide reactivity of human peroxiredoxin 3 // *Biochemistry*. 2009. 48. № 27. C. 6495–6501.
74. Coyle J. T., Balu D., Wolosker H. D-Serine, the Shape-Shifting NMDA Receptor Co-agonist // *Neurochemical research*. 2020. 45. № 6. C. 1344–1353.
75. Crow J. P. Dichlorodihydrofluorescein and dihydrorhodamine 123 are sensitive indicators of peroxynitrite in vitro: implications for intracellular measurement of reactive nitrogen and oxygen species // *Nitric oxide : biology and chemistry*. 1997. 1. № 2. C. 145–157.
76. Cui X.-L., Brockman D., Campos B., Myatt L. Expression of NADPH oxidase isoform 1 (Nox1) in human placenta: involvement in preeclampsia // *Placenta*. 2006. 27. 4-5. C. 422–431.
77. Culotta V. C., Joh H. D., Lin S. J., Slekar K. H., Strain J. A physiological role for *Saccharomyces cerevisiae* copper/zinc superoxide dismutase in copper buffering // *Journal of Biological Chemistry*. 1995. 270. № 50. C. 29991–29997.
78. Dębski D., Smulik R., Zielonka J., Michałowski B., Jakubowska M., Dębowska K., Adamus J., Marcinek A., Kalyanaraman B., Sikora A. Mechanism of oxidative conversion of Amplex® Red to resorufin: Pulse radiolysis and enzymatic studies // *Free radical biology & medicine*. 2016. 95. C. 323–332.
79. Del Bene F., Wyart C., Robles E., Tran A., Looger L., Scott E. K., Isacoff E. Y., Baier H. Filtering of visual information in the tectum by an identified neural circuit // *Science (New York, N.Y.)*. 2010. 330. № 6004. C. 669–673.

80. Denu J. M., Tanner K. G. Specific and reversible inactivation of protein tyrosine phosphatases by hydrogen peroxide: evidence for a sulfenic acid intermediate and implications for redox regulation // *Biochemistry*. 1998. 37. № 16. C. 5633–5642.
81. Destaing O., Planus E., Bouvard D., Oddou C., Badowski C., Bossy V., Raducanu A., Fourcade B., Albiges-Rizo C., Block M. R.  $\beta$ 1A integrin is a master regulator of invadosome organization and function // *Molecular biology of the cell*. 2010. 21. № 23. C. 4108–4119.
82. Dickinson B. C., Lin V. S., Chang C. J. Preparation and use of MitoPY1 for imaging hydrogen peroxide in mitochondria of live cells // *Nature protocols*. 2013. 8. № 6. C. 1249–1259.
83. Dingjan I., Verboogen D. R., Paardekooper L. M., Revelo N. H., Sittig S. P., Visser L. J., Mollard G. F. v., Henriët S. S., Figdor C. G., Ter Beest M., van den Bogaart G. Lipid peroxidation causes endosomal antigen release for cross-presentation // *Scientific reports*. 2016. 6. C. 22064.
84. D'Orazio M., Cervoni L., Giartosio A., Rotilio G., Battistoni A. Thermal stability and redox properties of *M. tuberculosis* CuSOD // *Archives of biochemistry and biophysics*. 2009. 486. № 2. C. 119–124.
85. Duan X.-H. n., Wang W.-L., Dai R., Yan H.-W., Han C.-N., Liu L.-S. Current Situation of PC12 Cell Use in Neuronal Injury Study // *International Journal of Biotechnology for Wellness Industries*. 2015. 4. № 2. C. 61–66.
86. Dupuy C., Virion A., Ohayon R., Kaniewski J., Dème D., Pommier J. Mechanism of hydrogen peroxide formation catalyzed by NADPH oxidase in thyroid plasma membrane // *Journal of Biological Chemistry*. 1991. 266. № 6. C. 3739–3743.
87. Duve C. de, Baudhuin P. Peroxisomes (microbodies and related particles) // *Physiological reviews*. 1966. 46. № 2. C. 323–357.

88. Dynowski M., Schaaf G., Loque D., Moran O., Ludewig U. Plant plasma membrane water channels conduct the signalling molecule H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> // *The Biochemical journal*. 2008. 414. № 1. C. 53–61.
89. Enyedi B., Zana M., Donkó Á., Geiszt M. Spatial and temporal analysis of NADPH oxidase-generated hydrogen peroxide signals by novel fluorescent reporter proteins // *Antioxidants & redox signaling*. 2013. 19. № 6. C. 523–534.
90. Ermakova Y. G., Bilan D. S., Matlashov M. E., Mishina N. M., Markvicheva K. N., Subach O. M., Subach F. V., Bogeski I., Hoth M., Enikolopov G., Belousov V. V. Red fluorescent genetically encoded indicator for intracellular hydrogen peroxide // *Nature communications*. 2014. 5. C. 5222.
91. Ermakova Y. G., Pak V. V., Bogdanova Y. A., Kotlobay A. A., Yampolsky I. V., Shokhina A. G., Panova A. S., Marygin R. A., Staroverov D. B., Bilan D. S., Sies H., Belousov V. V. SypHer3s: a genetically encoded fluorescent ratiometric probe with enhanced brightness and an improved dynamic range // *Chemical communications (Cambridge, England)*. 2018. 54. № 23. C. 2898–2901.
92. Ertürk A., Wang Y., Sheng M. Local pruning of dendrites and spines by caspase-3-dependent and proteasome-limited mechanisms // *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2014. 34. № 5. C. 1672–1688.
93. Esworthy R. S., Aranda R., Martín M. G., Doroshov J. H., Binder S. W., Chu F. F. Mice with combined disruption of Gpx1 and Gpx2 genes have colitis // *American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology*. 2001. 281. № 3. G848-55.
94. Esworthy R. S., Ho Y. S., Chu F. F. The Gpx1 gene encodes mitochondrial glutathione peroxidase in the mouse liver // *Archives of biochemistry and biophysics*. 1997. 340. № 1. C. 59–63.

95. Ferrer-Sueta G., Manta B., Botti H., Radi R., Trujillo M., Denicola A. Factors affecting protein thiol reactivity and specificity in peroxide reduction // *Chemical research in toxicology*. 2011. 24. № 4. C. 434–450.
96. Fessenden J. M., Racker E. Partial Resolution of the Enzymes Catalyzing Oxidative Phosphorylation // *Journal of Biological Chemistry*. 1966. 241. № 10. C. 2483–2489.
97. Fisher A. B. Redox signaling across cell membranes // *Antioxidants & redox signaling*. 2009. 11. № 6. C. 1349–1356.
98. Fisher A. B. Peroxiredoxin 6: a bifunctional enzyme with glutathione peroxidase and phospholipase A<sub>2</sub> activities // *Antioxidants & redox signaling*. 2011. 15. № 3. C. 831–844.
99. *Glutathione* / Cochr. L. Flohé. Boca Raton: Taylor & Francis, 2018. | Series: *Oxidative stress and*: CRC Press, 2018.
100. Florian S., Krehl S., Loewinger M., Kipp A., Banning A., Esworthy S., Chu F.-F., Brigelius-Flohé R. Loss of GPx2 increases apoptosis, mitosis, and GPx1 expression in the intestine of mice // *Free radical biology & medicine*. 2010. 49. № 11. C. 1694–1702.
101. Florkowski A., Gruszczynski W., Wawrzyniak Z. Selected Biochemical Parameters of Blood Serum in Soldiers Committing Self-Mutilation // *Military Medicine*. 2001. 166. № 5. C. 375–377.
102. Forman H. J., Kennedy J. A. Role of superoxide radical in mitochondrial dehydrogenase reactions // *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 1974. 60. № 3. C. 1044–1050.
103. Forman H. J., Maiorino M., Ursini F. Signaling functions of reactive oxygen species // *Biochemistry*. 2010. 49. № 5. C. 835–842.

104. Fridovich I. Superoxide dismutases // *Annual review of biochemistry*. 1975. 44. C. 147–159.
105. Fritz R., Bol J., Hebling U., Angermüller S., Völkl A., Fahimi H. D., Mueller S. Compartment-dependent management of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> by peroxisomes // *Free Radical Biology and Medicine*. 2007. 42. № 7. C. 1119–1129.
106. Fry A. L., Laboy J. T., Norman K. R. VAV-1 acts in a single interneuron to inhibit motor circuit activity in *Caenorhabditis elegans* // *Nature communications*. 2014. 5. C. 5579.
107. Galaris D., Barbouti A., Pantopoulos K. Iron homeostasis and oxidative stress: An intimate relationship // *Biochimica et biophysica acta. Molecular cell research*. 2019. 1866. № 12. C. 118535.
108. Galluzzi L., Kepp O., Vander Heiden M. G., Kroemer G. Metabolic targets for cancer therapy // *Nature reviews. Drug discovery*. 2013. 12. № 11. C. 829–846.
109. Gao S., Guan S. A., Fouad A. D., Meng J., Kawano T., Huang Y.-C., Li Y., Alcaire S., Hung W., Lu Y., Qi Y. B., Jin Y., Alkema M., Fang-Yen C., Zhen M. Excitatory motor neurons are local oscillators for backward locomotion // *eLife*. 2018. 7.
110. Geiszt M., Kopp J. B., Várnai P., Leto T. L. Identification of renox, an NAD(P)H oxidase in kidney // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2000. 97. № 14. C. 8010–8014.
111. Gena P., Pellegrini-Calace M., Biasco A., Svelto M., Calamita G. Aquaporin Membrane Channels: Biophysics, Classification, Functions, and Possible Biotechnological Applications // *Food Biophysics*. 2011. 6. № 2. C. 241–249.
112. Gibhardt C. S., Cappello S., Bhardwaj R., Schober R., Kirsch S. A., Bonilla Del Rio Z., Gahbauer S., Bochicchio A., Sumanska M., Ickes C., Stejerean-Todoran I., Mitkovski M., Alansary D., Zhang X., Revazian A., Fahrner M., Lunz V., Frischauf



- I., Luo T., Ezerina D., Messens J., Belousov V. V., Hoth M., Böckmann R. A., Hediger M. A., Schindl R., Bogeski I. Oxidative Stress-Induced STIM2 Cysteine Modifications Suppress Store-Operated Calcium Entry // *Cell reports*. 2020. 33. № 3. C. 108292.
113. Go Y.-M., Jones D. P. The redox proteome // *The Journal of biological chemistry*. 2013. 288. № 37. C. 26512–26520.
114. Góth L., Nagy T. Inherited catalase deficiency: is it benign or a factor in various age related disorders? // *Mutation research*. 2013. 753. № 2. C. 147–154.
115. Grasberger H., El-Zaatari M., Dang D. T., Merchant J. L. Dual oxidases control release of hydrogen peroxide by the gastric epithelium to prevent *Helicobacter felis* infection and inflammation in mice // *Gastroenterology*. 2013. 145. № 5. C. 1045–1054.
116. Griffin B. A., Adams S. R., Tsien R. Y. Specific covalent labeling of recombinant protein molecules inside live cells // *Science (New York, N.Y.)*. 1998. 281. № 5374. C. 269–272.
117. Gutscher M., Sobotta M. C., Wabnitz G. H., Ballikaya S., Meyer A. J., Samstag Y., Dick T. P. Proximity-based protein thiol oxidation by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-scavenging peroxidases // *The Journal of biological chemistry*. 2009. 284. № 46. C. 31532–31540.
118. Hansford R. G., Hogue B. A., Mildaziene V. Dependence of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> formation by rat heart mitochondria on substrate availability and donor age // *Journal of bioenergetics and biomembranes*. 1997. 29. № 1. C. 89–95.
119. Hanson G. T., Aggeler R., Oglesbee D., Cannon M., Capaldi R. A., Tsien R. Y., Remington S. J. Investigating mitochondrial redox potential with redox-sensitive green fluorescent protein indicators // *Journal of Biological Chemistry*. 2004. 279. № 13. C. 13044–13053.

120. Hara-Chikuma M., Watanabe S., Satooka H. Involvement of aquaporin-3 in epidermal growth factor receptor signaling via hydrogen peroxide transport in cancer cells // *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2016. 471. № 4. C. 603–609.
121. Harris I. S., Treloar A. E., Inoue S., Sasaki M., Gorrini C., Lee K. C., Yung K. Y., Brenner D., Knobbe-Thomsen C. B., Cox M. A., Elia A., Berger T., Cescon D. W., Adeoye A., Brüstle A., Molyneux S. D., Mason J. M., Li W. Y., Yamamoto K., Wakeham A., Berman H. K., Khokha R., Done S. J., Kavanagh T. J., Lam C.-W., Mak T. W. Glutathione and thioredoxin antioxidant pathways synergize to drive cancer initiation and progression // *Cancer cell*. 2015. 27. № 2. C. 211–222.
122. Haskew-Layton R. E., Payappilly J. B., Smirnova N. A., Ma T. C., Chan K. K., Murphy T. H., Guo H., Langley B., Sultana R., Butterfield D. A., Santagata S., Alldred M. J., Gazaryan I. G., Bell G. W., Ginsberg S. D., Ratan R. R. Controlled enzymatic production of astrocytic hydrogen peroxide protects neurons from oxidative stress via an Nrf2-independent pathway // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2010. 107. № 40. C. 17385–17390.
123. Hatori Y., Inouye S., Akagi R., Seyama T. Local redox environment beneath biological membranes probed by palmitoylated-roGFP // *Redox biology*. 2018. 14. C. 679–685.
124. Hearps A. C., Pryor M. J., Kuusisto H. V., Rawlinson S. M., Piller S. C., Jans D. A. The biarsenical dye Lumio exhibits a reduced ability to specifically detect tetracysteine-containing proteins within live cells // *Journal of fluorescence*. 2007. 17. № 6. C. 593–597.
125. Hempel N., Carrico P. M., Melendez J. A. Manganese superoxide dismutase (Sod2) and redox-control of signaling events that drive metastasis // *Anti-cancer agents in medicinal chemistry*. 2011. 11. № 2. C. 191–201.

126. Henau S. de, Pagès-Gallego M., Pannekoek W.-J., Dansen T. B. Mitochondria-Derived H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Promotes Symmetry Breaking of the *C. elegans* Zygote // *Developmental cell*. 2020. 53. № 3. 263-271.e6.
127. Henríquez-Olguin C., Knudsen J. R., Raun S. H., Li Z., Dalbram E., Treebak J. T., Sylow L., Holmdahl R., Richter E. A., Jaimovich E., Jensen T. E. Cytosolic ROS production by NADPH oxidase 2 regulates muscle glucose uptake during exercise // *Nature communications*. 2019. 10. № 1. C. 4623.
128. Heymes C., Bendall J. K., Ratajczak P., Cave A. C., Samuel J.-L., Hasenfuss G., Shah A. M. Increased myocardial NADPH oxidase activity in human heart failure // *Journal of the American College of Cardiology*. 2003. 41. № 12. C. 2164–2171.
129. Heyworth P. G., Bohl B. P., Bokoch G. M., Curnutte J. T. Rac translocates independently of the neutrophil NADPH oxidase components p47phox and p67phox. Evidence for its interaction with flavocytochrome b558 // *Journal of Biological Chemistry*. 1994. 269. № 49. C. 30749–30752.
130. Hinchey E. C., Gruszczuk A. V., Willows R., Navaratnam N., Hall A. R., Bates G., Bright T. P., Krieg T., Carling D., Murphy M. P. Mitochondria-derived ROS activate AMP-activated protein kinase (AMPK) indirectly // *The Journal of biological chemistry*. 2018. 293. № 44. C. 17208–17217.
131. Hirotsu S., Abe Y., Okada K., Nagahara N., Hori H., Nishino T., Hakoshima T. Crystal structure of a multifunctional 2-Cys peroxiredoxin heme-binding protein 23 kDa/proliferation-associated gene product // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1999. 96. № 22. C. 12333–12338.
132. Ho Y.-S., Xiong Y., Ma W., Spector A., Ho D. S. Mice lacking catalase develop normally but show differential sensitivity to oxidant tissue injury // *Journal of Biological Chemistry*. 2004. 279. № 31. C. 32804–32812.
133. Hoffmann S., Orlando M., Andrzejak E., Bruns C., Trimbuch T., Rosenmund C., Garner C. C., Ackermann F. Light-Activated ROS Production Induces Synaptic

- Autophagy // *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2019. 39. № 12. C. 2163–2183.
134. Holley A. K., Dhar S. K., Xu Y., St Clair D. K. Manganese superoxide dismutase: beyond life and death // *Amino acids*. 2012. 42. № 1. C. 139–158.
135. Houser S. R., Margulies K. B., Murphy A. M., Spinale F. G., Francis G. S., Prabhu S. D., Rockman H. A., Kass D. A., Molkentin J. D., Sussman M. A., Koch W. J., Koch W. Animal models of heart failure: a scientific statement from the American Heart Association // *Circulation research*. 2012. 111. № 1. C. 131–150.
136. Huang B. K., Langford T. F., Sikes H. D. Using Sensors and Generators of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> to Elucidate the Toxicity Mechanism of Piperlongumine and Phenethyl Isothiocyanate // *Antioxidants & redox signaling*. 2016. 24. № 16. C. 924–938.
137. Hyslop P. A., Sklar L. A. A quantitative fluorimetric assay for the determination of oxidant production by polymorphonuclear leukocytes: Its use in the simultaneous fluorimetric assay of cellular activation processes // *Analytical Biochemistry*. 1984. 141. № 1. C. 280–286.
138. Iketani M., Iizuka A., Sengoku K., Kurihara Y., Nakamura F., Sasaki Y., Sato Y., Yamane M., Matsushita M., Nairn A. C., Takamatsu K., Goshima Y., Takei K. Regulation of neurite outgrowth mediated by localized phosphorylation of protein translational factor eEF2 in growth cones // *Developmental neurobiology*. 2013. 73. № 3. C. 230–246.
139. Imai H., Hirao F., Sakamoto T., Sekine K., Mizukura Y., Saito M., Kitamoto T., Hayasaka M., Hanaoka K., Nakagawa Y. Early embryonic lethality caused by targeted disruption of the mouse PHGPx gene // *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2003. 305. № 2. C. 278–286.
140. Imai H., Saito M., Kirai N., Hasegawa J., Konishi K., Hattori H., Nishimura M., Naito S., Nakagawa Y. Identification of the positive regulatory and distinct core regions of promoters, and transcriptional regulation in three types of mouse

- phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase // *Journal of biochemistry*. 2006. 140. № 4. C. 573–590.
141. Ishimoto T., Mori H. A new bioluminescence-based tool for modulating target proteins in live cells // *Scientific reports*. 2019. 9. № 1. C. 18239.
142. Isogai T., van der Kammen R., Leyton-Puig D., Kedziora K. M., Jalink K., Innocenti M. Initiation of lamellipodia and ruffles involves cooperation between mDia1 and the Arp2/3 complex // *Journal of cell science*. 2015. 128. № 20. C. 3796–3810.
143. Ito T., Hayashida M., Kobayashi S., Muto N., Hayashi A., Yoshimura T., Mori H. Serine racemase is involved in d-aspartate biosynthesis // *Journal of biochemistry*. 2016. 160. № 6. C. 345–353.
144. Ivashchenko O., van Veldhoven P. P., Brees C., Ho Y.-S., Terlecky S. R., Fransen M. Intraperoxisomal redox balance in mammalian cells: oxidative stress and interorganellar cross-talk // *Molecular biology of the cell*. 2011. 22. № 9. C. 1440–1451.
145. Izuo N., Nojiri H., Uchiyama S., Noda Y., Kawakami S., Kojima S., Sasaki T., Shirasawa T., Shimizu T. Brain-Specific Superoxide Dismutase 2 Deficiency Causes Perinatal Death with Spongiform Encephalopathy in Mice // *Oxidative medicine and cellular longevity*. 2015. 2015. C. 238914.
146. Jafari N., Kim H., Park R., Li L., Jang M., Morris A. J., Park J., Huang C. CRISPR-Cas9 Mediated NOX4 Knockout Inhibits Cell Proliferation and Invasion in HeLa Cells // *PloS one*. 2017. 12. № 1. e0170327.
147. Javeshghani D., Javeshghani D., Magder S. A., Barreiro E., Quinn M. T., Hussain S. N. A. Molecular characterization of a superoxide-generating NAD(P)H oxidase in the ventilatory muscles // *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2002. 165. № 3. C. 412–418.

148. Jay D. G. Selective destruction of protein function by chromophore-assisted laser inactivation // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1988. 85. № 15. C. 5454–5458.
149. Jensen P. K. Antimycin-insensitive oxidation of succinate and reduced nicotinamide-adenine dinucleotide in electron-transport particles I. pH dependency and hydrogen peroxide formation // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Enzymology and Biological Oxidation*. 1966. 122. № 2. C. 157–166.
150. Jones D. P. Radical-free biology of oxidative stress // *American journal of physiology. Cell physiology*. 2008. 295. № 4. C849-68.
151. Jones D. P. Redox sensing: orthogonal control in cell cycle and apoptosis signalling // *Journal of internal medicine*. 2010. 268. № 5. C. 432–448.
152. Kaech S., Banker G. Culturing hippocampal neurons // *Nature protocols*. 2006. 1. № 5. C. 2406–2415.
153. Kalinina E. V., Ivanova-Radkevich V. I., Chernov N. N. Role of MicroRNAs in the Regulation of Redox-Dependent Processes // *Biochemistry. Biokhimiia*. 2019. 84. № 11. C. 1233–1246.
154. Kawada Y., Khan M., Sharma A. K., Ratnayake D. B., Dobashi K., Asayama K., Moser H. W., Contreras M. A., Singh I. Inhibition of peroxisomal functions due to oxidative imbalance induced by mistargeting of catalase to cytoplasm is restored by vitamin E treatment in skin fibroblasts from Zellweger syndrome-like patients // *Molecular genetics and metabolism*. 2004. 83. № 4. C. 297–305.
155. Keppler A., Ellenberg J. Chromophore-assisted laser inactivation of alpha- and gamma-tubulin SNAP-tag fusion proteins inside living cells // *ACS chemical biology*. 2009. 4. № 2. C. 127–138.

156. Keppler A., Gendreizig S., Gronemeyer T., Pick H., Vogel H., Johnsson K. A general method for the covalent labeling of fusion proteins with small molecules in vivo // *Nature biotechnology*. 2003. 21. № 1. C. 86–89.
157. Kim K., Lakhanpal G., Lu H. E., Khan M., Suzuki A., Hayashi M. K., Narayanan R., Luyben T. T., Matsuda T., Nagai T., Blanpied T. A., Hayashi Y., Okamoto K. A Temporary Gating of Actin Remodeling during Synaptic Plasticity Consists of the Interplay between the Kinase and Structural Functions of CaMKII // *Neuron*. 2015. 87. № 4. C. 813–826.
158. Kirkman H. N., Gaetani G. F. Mammalian catalase: a venerable enzyme with new mysteries // *Trends in biochemical sciences*. 2007. 32. № 1. C. 44–50.
159. Kobayashi J., Shidara H., Morisawa Y., Kawakami M., Tanahashi Y., Hotta K., Oka K. A method for selective ablation of neurons in *C. elegans* using the phototoxic fluorescent protein, KillerRed // *Neuroscience letters*. 2013. 548. C. 261–264.
160. Kobayashi S., Nojima Y., Shibuya M., Maru Y. Nox1 regulates apoptosis and potentially stimulates branching morphogenesis in sinusoidal endothelial cells // *Experimental cell research*. 2004. 300. № 2. C. 455–462.
161. Krebs H. A. Metabolism of amino-acids: Deamination of amino-acids // *The Biochemical journal*. 1935. 29. № 7. C. 1620–1644.
162. Krüger C., Waldeck-Weiermair M., Kaynert J., Pokrant T., Komaragiri Y., Otto O., Michel T., Elsner M. AQP8 is a crucial H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> transporter in insulin-producing RINm5F cells // *Redox biology*. 2021. 43. C. 101962.
163. La Favor J. D., Burnett A. L. A microdialysis method to measure in vivo hydrogen peroxide and superoxide in various rodent tissues // *Methods (San Diego, Calif.)*. 2016. 109. C. 131–140.

164. Lan L., Nakajima S., Wei L., Sun L., Hsieh C.-L., Sobol R. W., Bruchez M., van Houten B., Yasui A., Levine A. S. Novel method for site-specific induction of oxidative DNA damage reveals differences in recruitment of repair proteins to heterochromatin and euchromatin // *Nucleic acids research*. 2014. 42. № 4. C. 2330–2345.
165. Larsen L. N., Dahl E., Bremer J. Peroxidative oxidation of leuco-dichlorofluorescein by prostaglandin H synthase in prostaglandin biosynthesis from polyunsaturated fatty acids // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Lipids and Lipid Metabolism*. 1996. 1299. № 1. C. 47–53.
166. LeBel C. P., Ischiropoulos H., Bondy S. C. Evaluation of the probe 2',7'-dichlorofluorescein as an indicator of reactive oxygen species formation and oxidative stress // *Chemical research in toxicology*. 1992. 5. № 2. C. 227–231.
167. Lebovitz R. M., Zhang H., Vogel H., Cartwright J., Dionne L., Lu N., Huang S., Matzuk M. M. Neurodegeneration, myocardial injury, and perinatal death in mitochondrial superoxide dismutase-deficient mice // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1996. 93. № 18. C. 9782–9787.
168. Lee A., Mathuru A. S., Teh C., Kibat C., Korzh V., Penney T. B., Jesuthasan S. The habenula prevents helpless behavior in larval zebrafish // *Current biology : CB*. 2010. 20. № 24. C. 2211–2216.
169. Lee D., Khaja S., Velasquez-Castano J. C., Dasari M., Sun C., Petros J., Taylor W. R., Murthy N. In vivo imaging of hydrogen peroxide with chemiluminescent nanoparticles // *Nature materials*. 2007. 6. № 10. C. 765–769.
170. Legakis J. E., Koepke J. I., Jedeszko C., Barlaskar F., Terlecky L. J., Edwards H. J., Walton P. A., Terlecky S. R. Peroxisome senescence in human fibroblasts // *Molecular biology of the cell*. 2002. 13. № 12. C. 4243–4255.



171. Leisegang M. S., Schröder K., Brandes R. P. Redox Regulation and Noncoding RNAs // *Antioxidants & redox signaling*. 2018. 29. № 9. C. 793–812.
172. Leseney A.-M., Dème D., Legué O., Ohayon R., Chanson P., Sales J.-P., Pires de Carvalho D., Dupuy C., Virion A. Biochemical characterization of a Ca<sup>2+</sup>/NAD(P)H-dependent H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> generator in human thyroid tissue // *Biochimie*. 1999. 81. № 4. C. 373–380.
173. Liao J. C., Roider J., Jay D. G. Chromophore-assisted laser inactivation of proteins is mediated by the photogeneration of free radicals // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1994. 91. № 7. C. 2659–2663.
174. Lin J. Y., Sann S. B., Zhou K., Nabavi S., Proulx C. D., Malinow R., Jin Y., Tsien R. Y. Optogenetic inhibition of synaptic release with chromophore-assisted light inactivation (CALI) // *Neuron*. 2013. 79. № 2. C. 241–253.
175. Lippert A. R., Keshari K. R., Kurhanewicz J., Chang C. J. A hydrogen peroxide-responsive hyperpolarized <sup>13</sup>C MRI contrast agent // *Journal of the American Chemical Society*. 2011. 133. № 11. C. 3776–3779.
176. Lippert A. R., van de Bittner G. C., Chang C. J. Boronate oxidation as a bioorthogonal reaction approach for studying the chemistry of hydrogen peroxide in living systems // *Accounts of chemical research*. 2011. 44. № 9. C. 793–804.
177. Loew O. A NEW ENZYME OF GENERAL OCCURRENCE IN ORGANISMIS // *Science (New York, N.Y.)*. 1900. 11. № 279. C. 701–702.
178. Loschen G., Flohé L. Respiratory chain linked H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production in pigeon heart mitochondria // *FEBS letters*. 1971. 18. № 2. C. 261–264.
179. Ludwig A., Howard G., Mendoza-Topaz C., Deerinck T., Mackey M., Sandin S., Ellisman M. H., Nichols B. J. Molecular composition and ultrastructure of the caveolar coat complex // *PLoS biology*. 2013. 11. № 8. e1001640.

180. Maggiorani D., Manzella N., Edmondson D. E., Mattevi A., Parini A., Binda C., Mialet-Perez J. Monoamine Oxidases, Oxidative Stress, and Altered Mitochondrial Dynamics in Cardiac Ageing // *Oxidative medicine and cellular longevity*. 2017. C. 3017947.
181. Manda G., Isvoranu G., Comanescu M. V., Manea A., Debelec Butuner B., Korkmaz K. S. The redox biology network in cancer pathophysiology and therapeutics // *Redox biology*. 2015. 5. C. 347–357.
182. Manevich Y., Feinstein S. I., Fisher A. B. Activation of the antioxidant enzyme 1-CYS peroxiredoxin requires glutathionylation mediated by heterodimerization with pi GST // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2004. 101. № 11. C. 3780–3785.
183. Manta B., Hugo M., Ortiz C., Ferrer-Sueta G., Trujillo M., Denicola A. The peroxidase and peroxynitrite reductase activity of human erythrocyte peroxiredoxin 2 // *Archives of biochemistry and biophysics*. 2009. 484. № 2. C. 146–154.
184. Marchissio M. J., Francés D. E. A., Carnovale C. E., Marinelli R. A. Mitochondrial aquaporin-8 knockdown in human hepatoma HepG2 cells causes ROS-induced mitochondrial depolarization and loss of viability // *Toxicology and applied pharmacology*. 2012. 264. № 2. C. 246–254.
185. Marek K. W., Davis G. W. Transgenically Encoded Protein Photoinactivation (FlAsH-FALI) // *Neuron*. 2002. 36. № 5. C. 805–813.
186. Marí M., Morales A., Colell A., García-Ruiz C., Kaplowitz N., Fernández-Checa J. C. Mitochondrial glutathione: features, regulation and role in disease // *Biochimica et biophysica acta*. 2013. 1830. № 5. C. 3317–3328.
187. Markvicheva K. N., Bilan D. S., Mishina N. M., Gorokhovatsky A. Y., Vinokurov L. M., Lukyanov S., Belousov V. V. A genetically encoded sensor for H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> with expanded dynamic range // *Bioorganic & medicinal chemistry*. 2011. 19. № 3. C. 1079–1084.

188. Martínez-Navarro F. J., Martínez-Morcillo F. J., Oliveira S. de, Candel S., Cabas I., García-Ayala A., Martínez-Menchón T., Corbalán-Vélez R., Mesa-Del-Castillo P., Cayuela M. L., Pérez-Oliva A. B., García-Moreno D., Mulero V. Hydrogen peroxide in neutrophil inflammation: Lesson from the zebrafish // *Developmental and comparative immunology*. 2020. 105. C. 103583.
189. Maryanovich M., Gross A. A ROS rheostat for cell fate regulation // *Trends in cell biology*. 2013. 23. № 3. C. 129–134.
190. Matlashov M. E., Belousov V. V., Enikolopov G. How much H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> is produced by recombinant D-amino acid oxidase in mammalian cells? // *Antioxidants & redox signaling*. 2014. 20. № 7. C. 1039–1044.
191. Matlashov M. E., Bogdanova Y. A., Ermakova G. V., Mishina N. M., Ermakova Y. G., Nikitin E. S., Balaban P. M., Okabe S., Lukyanov S., Enikolopov G., Zaisky A. G., Belousov V. V. Fluorescent ratiometric pH indicator SypHer2: Applications in neuroscience and regenerative biology // *Biochimica et biophysica acta*. 2015. 1850. № 11. C. 2318–2328.
192. McCord J. M., Fridovich I. Superoxide Dismutase // *Journal of Biological Chemistry*. 1969. 244. № 22. C. 6049–6055.
193. McLean M. A., Rajfur Z., Chen Z., Humphrey D., Yang B., Sligar S. G., Jacobson K. Mechanism of chromophore assisted laser inactivation employing fluorescent proteins // *Analytical chemistry*. 2009. 81. № 5. C. 1755–1761.
194. Meda F., Rampon C., Dupont E., Gauron C., Mourton A., Queguiner I., Thauvin M., Volovitch M., Joliot A., Vríz S. Nerves, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and Shh: Three players in the game of regeneration // *Seminars in cell & developmental biology*. 2018. 80. C. 65–73.
195. Medraño-Fernandez I., Bestetti S., Bertolotti M., Bienert G. P., Bottino C., Laforenza U., Rubartelli A., Sitia R. Stress Regulates Aquaporin-8 Permeability to

- Impact Cell Growth and Survival // Antioxidants & redox signaling. 2016. 24. № 18. C. 1031–1044.
196. Mehmeti I., Lortz S., Lenzen S. The H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-sensitive HyPer protein targeted to the endoplasmic reticulum as a mirror of the oxidizing thiol-disulfide milieu // Free radical biology & medicine. 2012. 53. № 7. C. 1451–1458.
197. Miller E. W., Albers A. E., Pralle A., Isacoff E. Y., Chang C. J. Boronate-based fluorescent probes for imaging cellular hydrogen peroxide // Journal of the American Chemical Society. 2005. 127. № 47. C. 16652–16659.
198. Miller E. W., Dickinson B. C., Chang C. J. Aquaporin-3 mediates hydrogen peroxide uptake to regulate downstream intracellular signaling // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2010. 107. № 36. C. 15681–15686.
199. Miller E. W., Tulyathan O., Tulyanthan O., Isacoff E. Y., Chang C. J. Molecular imaging of hydrogen peroxide produced for cell signaling // Nature chemical biology. 2007. 3. № 5. C. 263–267.
200. Mironova K. E., Proshkina G. M., Ryabova A. V., Stremovskiy O. A., Lukyanov S. A., Petrov R. V., Deyev S. M. Genetically encoded immunophotosensitizer 4D5scFv-miniSOG is a highly selective agent for targeted photokilling of tumor cells in vitro // Theranostics. 2013. 3. № 11. C. 831–840.
201. Miseta A., Csutora P. Relationship between the occurrence of cysteine in proteins and the complexity of organisms // Molecular biology and evolution. 2000. 17. № 8. C. 1232–1239.
202. Mittal M., Roth M., König P., Hofmann S., Dony E., Goyal P., Selbitz A.-C., Schermuly R. T., Ghofrani H. A., Kwapiszewska G., Kummer W., Klepetko W., Hoda M. A. R., Fink L., Hänze J., Seeger W., Grimminger F., Schmidt H. H. H. W., Weissmann N. Hypoxia-dependent regulation of nonphagocytic NADPH oxidase

- subunit NOX4 in the pulmonary vasculature // *Circulation research*. 2007. 101. № 3. C. 258–267.
203. Miwa T., Adachi T., Ito Y., Hirano K., Sugiura M. Purification and properties of glutathione peroxidase from human liver // *Chemical & pharmaceutical bulletin*. 1983. 31. № 1. C. 179–185.
204. Miya K., Inoue R., Takata Y., Abe M., Natsume R., Sakimura K., Hongou K., Miyawaki T., Mori H. Serine racemase is predominantly localized in neurons in mouse brain // *The Journal of comparative neurology*. 2008. 510. № 6. C. 641–654.
205. Montllor-Albalade C., Colin A. E., Chandrasekharan B., Bolaji N., Andersen J. L., Wayne Outten F., Reddi A. R. Extra-mitochondrial Cu/Zn superoxide dismutase (Sod1) is dispensable for protection against oxidative stress but mediates peroxide signaling in *Saccharomyces cerevisiae* // *Redox biology*. 2019. 21. C. 101064.
206. Morgan B., van Laer K., Owusu T. N. E., Ezeriņa D., Pastor-Flores D., Amponsah P. S., Tursch A., Dick T. P. Real-time monitoring of basal H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> levels with peroxiredoxin-based probes // *Nature chemical biology*. 2016. 12. № 6. C. 437–443.
207. Murphy M. P. How mitochondria produce reactive oxygen species // *The Biochemical journal*. 2009. 417. № 1. C. 1–13.
208. Nathan C., Cunningham-Bussell A. Beyond oxidative stress: an immunologist's guide to reactive oxygen species // *Nature reviews. Immunology*. 2013. 13. № 5. C. 349–361.
209. Nejabati H. R., Schmeisser K., Shahnazi V., Samimifar D., Faridvand Y., Bahrami-Asl Z., Fathi-Maroufi N., Nikanfar S., Nouri M. N1-Methylnicotinamide: An Anti-Ovarian Aging Hormetin? // *Ageing research reviews*. 2020. 62. C. 101131.

210. Nisimoto Y., Diebold B. A., Cosentino-Gomes D., Constantino-Gomes D., Lambeth J. D. Nox4: a hydrogen peroxide-generating oxygen sensor // *Biochemistry*. 2014. 53. № 31. C. 5111–5120.
211. Nojiri H., Shimizu T., Funakoshi M., Yamaguchi O., Zhou H., Kawakami S., Ohta Y., Sami M., Tachibana T., Ishikawa H., Kurosawa H., Kahn R. C., Otsu K., Shirasawa T. Oxidative stress causes heart failure with impaired mitochondrial respiration // *Journal of Biological Chemistry*. 2006. 281. № 44. C. 33789–33801.
212. Noma K., Jin Y. Optogenetic mutagenesis in *Caenorhabditis elegans* // *Nature communications*. 2015. 6. C. 8868.
213. Oldford C., Kuksal N., Gill R., Young A., Mailloux R. J. Estimation of the hydrogen peroxide producing capacities of liver and cardiac mitochondria isolated from C57BL/6N and C57BL/6J mice // *Free radical biology & medicine*. 2019. 135. C. 15–27.
214. Oliveira-Marques V., Marinho H. S., Cyrne L., Antunes F. Role of hydrogen peroxide in NF-kappaB activation: from inducer to modulator // *Antioxidants & redox signaling*. 2009. 11. № 9. C. 2223–2243.
215. Olson E. S., Orozco J., Wu Z., Malone C. D., Yi B., Gao W., Eghtedari M., Wang J., Mattrey R. F. Toward in vivo detection of hydrogen peroxide with ultrasound molecular imaging // *Biomaterials*. 2013. 34. № 35. C. 8918–8924.
216. Olson G. E., Whitin J. C., Hill K. E., Winfrey V. P., Motley A. K., Austin L. M., Deal J., Cohen H. J., Burk R. F. Extracellular glutathione peroxidase (Gpx3) binds specifically to basement membranes of mouse renal cortex tubule cells // *American journal of physiology. Renal physiology*. 2010. 298. № 5. F1244-53.
217. O'Neill J. S., Reddy A. B. Circadian clocks in human red blood cells // *Nature*. 2011. 469. № 7331. C. 498–503.

218. Orr A. L., Quinlan C. L., Perevoshchikova I. V., Brand M. D. A refined analysis of superoxide production by mitochondrial sn-glycerol 3-phosphate dehydrogenase // *The Journal of biological chemistry*. 2012. 287. № 51. C. 42921–42935.
219. Oyama Y., Hayashi A., Ueha T., Maekawa K. Characterization of 2',7'-dichlorofluorescein fluorescence in dissociated mammalian brain neurons: estimation on intracellular content of hydrogen peroxide // *Brain Research*. 1994. 635. 1-2. C. 113–117.
220. Paardekooper L. M., van Vroonhoven E., Ter Beest M., van den Bogaart G. Radical Stress Is More Cytotoxic in the Nucleus than in Other Organelles // *International journal of molecular sciences*. 2019. 20. № 17.
221. Paffenholz R., Bergstrom R. A., Pasutto F., Wabnitz P., Munroe R. J., Jagla W., Heinzmann U., Marquardt A., Bareiss A., Laufs J., Russ A., Stumm G., Schimenti J. C., Bergstrom D. E. Vestibular defects in head-tilt mice result from mutations in *Nox3*, encoding an NADPH oxidase // *Genes & development*. 2004. 18. № 5. C. 486–491.
222. Pak V. V., Ezeriņa D., Lyublinskaya O. G., Pedre B., Tyurin-Kuzmin P. A., Mishina N. M., Thauvin M., Young D., Wahni K., Martínez Gache S. A., Demidovich A. D., Ermakova Y. G., Maslova Y. D., Shokhina A. G., Eroglu E., Bilan D. S., Bogeski I., Michel T., Vriz S., Messens J., Belousov V. V. Ultrasensitive Genetically Encoded Indicator for Hydrogen Peroxide Identifies Roles for the Oxidant in Cell Migration and Mitochondrial Function // *Cell metabolism*. 2020. 31. № 3. 642-653.e6.
223. Panieri E., Millia C., Santoro M. M. Real-time quantification of subcellular H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and glutathione redox potential in living cardiovascular tissues // *Free radical biology & medicine*. 2017. 109. C. 189–200.
224. Parvez S., Long M. J. C., Poganik J. R., Aye Y. Redox Signaling by Reactive Electrophiles and Oxidants // *Chemical reviews*. 2018. 118. № 18. C. 8798–8888.

225. Paul A., Belton A., Nag S., Martin I., Grotewiel M. S., Duttaroy A. Reduced mitochondrial SOD displays mortality characteristics reminiscent of natural aging // *Mechanisms of ageing and development*. 2007. 128. 11-12. C. 706–716.
226. Pendyala S., Moitra J., Kalari S., Kleeberger S. R., Zhao Y., Reddy S. P., Garcia J. G. N., Natarajan V. Nrf2 regulates hyperoxia-induced Nox4 expression in human lung endothelium: identification of functional antioxidant response elements on the Nox4 promoter // *Free radical biology & medicine*. 2011. 50. № 12. C. 1749–1759.
227. Perevoshchikova I. V., Quinlan C. L., Orr A. L., Gerencser A. A., Brand M. D. Sites of superoxide and hydrogen peroxide production during fatty acid oxidation in rat skeletal muscle mitochondria // *Free radical biology & medicine*. 2013. 61. C. 298–309.
228. Perkins A., Nelson K. J., Parsonage D., Poole L. B., Karplus P. A. Peroxiredoxins: guardians against oxidative stress and modulators of peroxide signaling // *Trends in biochemical sciences*. 2015. 40. № 8. C. 435–445.
229. Pimenta F. M., Jensen R. L., Breitenbach T., Etzerodt M., Ogilby P. R. Oxygen-dependent photochemistry and photophysics of "miniSOG," a protein-encased flavin // *Photochemistry and photobiology*. 2013. 89. № 5. C. 1116–1126.
230. Pistorius E. K., Voss H. A D-amino acid oxidase from *Chlorella vulgaris* // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Enzymology*. 1977. 481. № 2. C. 395–406.
231. Pletnev S., Gurskaya N. G., Pletneva N. V., Lukyanov K. A., Chudakov D. M., Martynov V. I., Popov V. O., Kovalchuk M. V., Wlodawer A., Dauter Z., Pletnev V. Structural basis for phototoxicity of the genetically encoded photosensitizer KillerRed // *The Journal of biological chemistry*. 2009. 284. № 46. C. 32028–32039.
232. Poburko D., Santo-Domingo J., Demarex N. Dynamic regulation of the mitochondrial proton gradient during cytosolic calcium elevations // *The Journal of biological chemistry*. 2011. 286. № 13. C. 11672–11684.



233. Pollegioni L., Diederichs K., Molla G., Umhau S., Welte W., Ghisla S., Pilone M. S. Yeast d -Amino Acid Oxidase: Structural Basis of its Catalytic Properties // Journal of Molecular Biology. 2002. 324. № 3. C. 535–546.
234. Pollegioni L., Falbo A., Pilone M. S. Specificity and kinetics of Rhodotorula gracillisd-amino acid oxidase // Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology. 1992. 1120. № 1. C. 11–16.
235. Poole L. B. The basics of thiols and cysteines in redox biology and chemistry // Free radical biology & medicine. 2015. 80. C. 148–157.
236. Poole L. B., Hall A., Nelson K. J. Overview of peroxiredoxins in oxidant defense and redox regulation // Current protocols in toxicology. 2011. Chapter 7. Unit7.9.
237. Powis G., Montfort W. R. Properties and biological activities of thioredoxins // Annual review of biophysics and biomolecular structure. 2001. 30. C. 421–455.
238. Prior K.-K., Wittig I., Leisegang M. S., Groenendyk J., Weissmann N., Michalak M., Jansen-Dürr P., Shah A. M., Brandes R. P. The Endoplasmic Reticulum Chaperone Calnexin Is a NADPH Oxidase NOX4 Interacting Protein // The Journal of biological chemistry. 2016. 291. № 13. C. 7045–7059.
239. Purdue P. E., Lazarow P. B. Targeting of human catalase to peroxisomes is dependent upon a novel COOH-terminal peroxisomal targeting sequence // The Journal of cell biology. 1996. 134. № 4. C. 849–862.
240. Quinlan C. L., Gerencser A. A., Treberg J. R., Brand M. D. The mechanism of superoxide production by the antimycin-inhibited mitochondrial Q-cycle // The Journal of biological chemistry. 2011. 286. № 36. C. 31361–31372.
241. Quinlan C. L., Orr A. L., Perevoshchikova I. V., Treberg J. R., Ackrell B. A., Brand M. D. Mitochondrial complex II can generate reactive oxygen species at high rates in both the forward and reverse reactions // The Journal of biological chemistry. 2012. 287. № 32. C. 27255–27264.

242. Rajfur Z., Roy P., Otey C., Romer L., Jacobson K. Dissecting the link between stress fibres and focal adhesions by CALI with EGFP fusion proteins // *Nature cell biology*. 2002. 4. № 4. C. 286–293.
243. Ralat L. A., Manevich Y., Fisher A. B., Colman R. F. Direct evidence for the formation of a complex between 1-cysteine peroxiredoxin and glutathione S-transferase pi with activity changes in both enzymes // *Biochemistry*. 2006. 45. № 2. C. 360–372.
244. Rambani K., Vukasinovic J., Glezer A., Potter S. M. Culturing thick brain slices: an interstitial 3D microperfusion system for enhanced viability // *Journal of Neuroscience Methods*. 2009. 180. № 2. C. 243–254.
245. Rampon C., Volovitch M., Joliot A., Vriza S. Hydrogen Peroxide and Redox Regulation of Developments // *Antioxidants (Basel, Switzerland)*. 2018. 7. № 11.
246. Rao G. N. Hydrogen peroxide induces complex formation of SHC-Grb2-SOS with receptor tyrosine kinase and activates Ras and extracellular signal-regulated protein kinases group of mitogen-activated protein kinases // *Oncogene*. 1996. 13. № 4. C. 713–719.
247. Reinehr R., Becker S., Eberle A., Grether-Beck S., Häussinger D. Involvement of NADPH oxidase isoforms and Src family kinases in CD95-dependent hepatocyte apoptosis // *Journal of Biological Chemistry*. 2005. 280. № 29. C. 27179–27194.
248. Rhee S. G., Kang S. W., Chang T. S., Jeong W., Kim K. Peroxiredoxin, a novel family of peroxidases // *IUBMB life*. 2001. 52. 1-2. C. 35–41.
249. Rigutto S., Hoste C., Grasberger H., Milenkovic M., Communi D., Dumont J. E., Corvilain B., Miot F., Deken X. de. Activation of dual oxidases Duox1 and Duox2: differential regulation mediated by camp-dependent protein kinase and protein kinase C-dependent phosphorylation // *Journal of Biological Chemistry*. 2009. 284. № 11. C. 6725–6734.

250. Roca F. J., Ramakrishnan L. TNF dually mediates resistance and susceptibility to mycobacteria via mitochondrial reactive oxygen species // *Cell*. 2013. 153. № 3. C. 521–534.
251. Rodrigues C., Pimpão C., Mósca A. F., Coxixo A. S., Lopes D., da Silva I. V., Pedersen P. A., Antunes F., Soveral G. Human Aquaporin-5 Facilitates Hydrogen Peroxide Permeation Affecting Adaption to Oxidative Stress and Cancer Cell Migration // *Cancers*. 2019. 11. № 7.
252. Rothe G., Valet G. Flow Cytometric Analysis of Respiratory Burst Activity in Phagocytes With Hydroethidine and 2',7'-Dichlorofluorescein // *Journal of Leukocyte Biology*. 1990. 47. № 5. C. 440–448.
253. Roy A., Carpentier P., Bourgeois D., Field M. Diffusion pathways of oxygen species in the phototoxic fluorescent protein KillerRed // *Photochemical & photobiological sciences : Official journal of the European Photochemistry Association and the European Society for Photobiology*. 2010. 9. № 10. C. 1342–1350.
254. Ruch W., Cooper P. H., Baggiolini M. Assay of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production by macrophages and neutrophils with homovanillic acid and horse-radish peroxidase // *Journal of Immunological Methods*. 1983. 63. № 3. C. 347–357.
255. Ruiz-González R., Cortajarena A. L., Mejias S. H., Agut M., Nonell S., Flors C. Singlet oxygen generation by the genetically encoded tag miniSOG // *Journal of the American Chemical Society*. 2013. 135. № 26. C. 9564–9567.
256. Ryumina A. P., Serebrovskaya E. O., Shirmanova M. V., Snopova L. B., Kuznetsova M. M., Turchin I. V., Ignatova N. I., Klementieva N. V., Fradkov A. F., Shakhov B. E., Zagaynova E. V., Lukyanov K. A., Lukyanov S. A. Flavoprotein miniSOG as a genetically encoded photosensitizer for cancer cells // *Biochimica et biophysica acta*. 2013. 1830. № 11. C. 5059–5067.

257. Saberi S., Stauffer J. E., Schulte D. J., Ravits J. Neuropathology of Amyotrophic Lateral Sclerosis and Its Variants // *Neurologic clinics*. 2015. 33. № 4. C. 855–876.
258. Saeedi Saravi S. S., Eroglu E., Waldeck-Weiermair M., Sorrentino A., Steinhorn B., Belousov V., Michel T. Differential endothelial signaling responses elicited by chemogenetic H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> synthesis // *Redox biology*. 2020. 36. C. 101605.
259. Santin Y., Resta J., Parini A., Mialet-Perez J. Monoamine oxidases in age-associated diseases: New perspectives for old enzymes // *Ageing research reviews*. 2021. 66. C. 101256.
260. Sarkisyan K. S., Zlobovskaya O. A., Gorbachev D. A., Bozhanova N. G., Sharonov G. V., Staroverov D. B., Egorov E. S., Ryabova A. V., Solntsev K. M., Mishin A. S., Lukyanov K. A. KillerOrange, a Genetically Encoded Photosensitizer Activated by Blue and Green Light // *PloS one*. 2015. 10. № 12. e0145287.
261. Sason H., Billard J. M., Smith G. P., Safory H., Neame S., Kaplan E., Rosenberg D., Zubedat S., Foltyn V. N., Christoffersen C. T., Bundgaard C., Thomsen C., Avital A., Christensen K. V., Wolosker H. Asc-1 Transporter Regulation of Synaptic Activity via the Tonic Release of d-Serine in the Forebrain // *Cerebral cortex* (New York, N.Y. : 1991). 2017. 27. № 2. C. 1573–1587.
262. Schell M. J., Molliver M. E., Snyder S. H. D-serine, an endogenous synaptic modulator: localization to astrocytes and glutamate-stimulated release // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1995. 92. № 9. C. 3948–3952.
263. Schwarzer C., Machen T. E., Illek B., Fischer H. NADPH Oxidase-dependent Acid Production in Airway Epithelial Cells // *Journal of Biological Chemistry*. 2004. 279. № 35. C. 36454–36461.
264. Selenius M., Rundlöf A.-K., Olm E., Fernandes A. P., Björnstedt M. Selenium and the selenoprotein thioredoxin reductase in the prevention, treatment and diagnostics of cancer // *Antioxidants & redox signaling*. 2010. 12. № 7. C. 867–880.

265. Seo M. S., Kang S. W., Kim K., Baines I. C., Lee T. H., Rhee S. G. Identification of a new type of mammalian peroxiredoxin that forms an intramolecular disulfide as a reaction intermediate // *Journal of Biological Chemistry*. 2000. 275. № 27. C. 20346–20354.
266. Serebrovskaya E. O., Edelweiss E. F., Stremovskiy O. A., Lukyanov K. A., Chudakov D. M., Deyev S. M. Targeting cancer cells by using an antireceptor antibody-photosensitizer fusion protein // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2009. 106. № 23. C. 9221–9225.
267. Serebrovskaya E. O., Gorodnicheva T. V., Ermakova G. V., Solovieva E. A., Sharonov G. V., Zagaynova E. V., Chudakov D. M., Lukyanov S., Zarausky A. G., Lukyanov K. A. Light-induced blockage of cell division with a chromatin-targeted phototoxic fluorescent protein // *The Biochemical journal*. 2011. 435. № 1. C. 65–71.
268. Serebrovskaya E. O., Ryumina A. P., Boulina M. E., Shirmanova M. V., Zagaynova E. V., Bogdanova E. A., Lukyanov S. A., Lukyanov K. A. Phototoxic effects of lysosome-associated genetically encoded photosensitizer KillerRed // *Journal of biomedical optics*. 2014. 19. № 7. C. 71403.
269. Serrano F., Kolluri N. S., Wientjes F. B., Card J.P., Klann E. NADPH oxidase immunoreactivity in the mouse brain // *Brain Research*. 2003. 988. 1-2. C. 193–198.
270. Shibuya T., Tsujimoto Y. Deleterious effects of mitochondrial ROS generated by KillerRed photodynamic action in human cell lines and *C. elegans* // *Journal of photochemistry and photobiology. B, Biology*. 2012. 117. C. 1–12.
271. Shimada T., Watanabe W., Matsunaga S., Higashi T., Ishii H., Fukui K., Isobe K., Itoh K. Intracellular disruption of mitochondria in a living HeLa cell with a 76-MHz femtosecond laser oscillator // *Optics express*. 2005. 13. № 24. C. 9869–9880.

272. Shiose A., Kuroda J., Tsuruya K., Hirai M., Hirakata H., Naito S., Hattori M., Sakaki Y., Sumimoto H. A novel superoxide-producing NAD(P)H oxidase in kidney // *Journal of Biological Chemistry*. 2001. 276. № 2. C. 1417–1423.
273. Shirmanova M. V., Serebrovskaya E. O., Lukyanov K. A., Snopova L. B., Sirotkina M. A., Prodanetz N. N., Bugrova M. L., Minakova E. A., Turchin I. V., Kamensky V. A., Lukyanov S. A., Zagaynova E. V. Phototoxic effects of fluorescent protein KillerRed on tumor cells in mice // *Journal of biophotonics*. 2013. 6. № 3. C. 283–290.
274. Shokhina A. G., Kostyuk A. I., Ermakova Y. G., Panova A. S., Staroverov D. B., Egorov E. S., Baranov M. S., van Belle G. J., Katschinski D. M., Belousov V. V., Bilan D. S. Red fluorescent redox-sensitive biosensor Grx1-roCherry // *Redox biology*. 2019. 21. C. 101071.
275. Shu X., Lev-Ram V., Deerinck T. J., Qi Y., Ramko E. B., Davidson M. W., Jin Y., Ellisman M. H., Tsien R. Y. A genetically encoded tag for correlated light and electron microscopy of intact cells, tissues, and organisms // *PLoS biology*. 2011. 9. № 4. e1001041.
276. Sikora A., Zielonka J., Lopez M., Joseph J., Kalyanaraman B. Direct oxidation of boronates by peroxyxynitrite: mechanism and implications in fluorescence imaging of peroxyxynitrite // *Free radical biology & medicine*. 2009. 47. № 10. C. 1401–1407.
277. Singh A. K., Dhaunsi G. S., Gupta M. P., Orak J. K., Asayama K., Singh I. Demonstration of glutathione peroxidase in rat liver peroxisomes and its intraorganellar distribution // *Archives of biochemistry and biophysics*. 1994. 315. № 2. C. 331–338.
278. Singh I. Biochemistry of peroxisomes in health and disease // *Molecular and cellular biochemistry*. 1997. 167. 1-2. C. 1–29.

279. Smith M. W., Doolittle R. F. A comparison of evolutionary rates of the two major kinds of superoxide dismutase // *Journal of molecular evolution*. 1992. 34. № 2. C. 175–184.
280. Sobotta M. C., Liou W., Stöcker S., Talwar D., Oehler M., Ruppert T., Scharf A. N. D., Dick T. P. Peroxiredoxin-2 and STAT3 form a redox relay for H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> signaling // *Nature chemical biology*. 2015. 11. № 1. C. 64–70.
281. Staniek K., Nohl H. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> detection from intact mitochondria as a measure for one-electron reduction of dioxygen requires a non-invasive assay system // Dedicated to Prof. E. Elstner, on the occasion of his 60th anniversary // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*. 1999. 1413. № 2. C. 70–80.
282. Starkov A. A., Fiskum G., Chinopoulos C., Lorenzo B. J., Browne S. E., Patel M. S., Beal M. F. Mitochondrial alpha-ketoglutarate dehydrogenase complex generates reactive oxygen species // *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2004. 24. № 36. C. 7779–7788.
283. Stein K. T., Moon S. J., Sikes H. D. Mitochondrial H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Generation Using a Tunable Chemogenetic Tool To Perturb Redox Homeostasis in Human Cells and Induce Cell Death // *ACS synthetic biology*. 2018. 7. № 9. C. 2037–2044.
284. Stroffekova K., Proenza C., Beam K. G. The protein-labeling reagent FLASH-EDT2 binds not only to CCXXCC motifs but also non-specifically to endogenous cysteine-rich proteins // *Pflugers Archiv : European journal of physiology*. 2001. 442. № 6. C. 859–866.
285. Sturrock A., Cahill B., Norman K., Huecksteadt T. P., Hill K., Sanders K., Karwande S. V., Stringham J. C., Bull D. A., Gleich M., Kennedy T. P., Hoidal J. R. Transforming growth factor-beta1 induces Nox4 NAD(P)H oxidase and reactive oxygen species-dependent proliferation in human pulmonary artery smooth muscle cells // *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology*. 2006. 290. № 4. L661-L673.

286. Subach O. M., Kunitsyna T. A., Mineyeva O. A., Lazutkin A. A., Bezryadnov D. V., Barykina N. V., Piatkevich K. D., Ermakova Y. G., Bilan D. S., Belousov V. V., Anokhin K. V., Enikolopov G. N., Subach F. V. Slowly Reducible Genetically Encoded Green Fluorescent Indicator for In Vivo and Ex Vivo Visualization of Hydrogen Peroxide // *International journal of molecular sciences*. 2019. 20. № 13.
287. Suh Y. A., Arnold R. S., Lassegue B., Shi J., Xu X., Sorescu D., Chung A. B., Griendling K. K., Lambeth J. D. Cell transformation by the superoxide-generating oxidase Mox1 // *Nature*. 1999. 401. № 6748. C. 79–82.
288. Sun X., Wu F., Datta R., Kharbanda S., Kufe D. Interaction between protein kinase C delta and the c-Abl tyrosine kinase in the cellular response to oxidative stress // *Journal of Biological Chemistry*. 2000. 275. № 11. C. 7470–7473.
289. Sundaresan M., Yu Z. X., Ferrans V. J., Irani K., Finkel T. Requirement for generation of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for platelet-derived growth factor signal transduction // *Science (New York, N.Y.)*. 1995. 270. № 5234. C. 296–299.
290. Surrey T., Elowitz M. B., Wolf P. E., Yang F., Nédélec F., Shokat K., Leibler S. Chromophore-assisted light inactivation and self-organization of microtubules and motors // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1998. 95. № 8. C. 4293–4298.
291. Szanto I., Rubbia-Brandt L., Kiss P., Steger K., Banfi B., Kovari E., Herrmann F., Hadengue A., Krause K.-H. Expression of NOX1, a superoxide-generating NADPH oxidase, in colon cancer and inflammatory bowel disease // *The Journal of pathology*. 2005. 207. № 2. C. 164–176.
292. Szasz T., Thompson J. M., Watts S. W. A comparison of reactive oxygen species metabolism in the rat aorta and vena cava: focus on xanthine oxidase // *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology*. 2008. 295. № 3. H1341-H1350.



293. Tahara E. B., Navarete F. D. T., Kowaltowski A. J. Tissue-, substrate-, and site-specific characteristics of mitochondrial reactive oxygen species generation // *Free radical biology & medicine*. 2009. 46. № 9. C. 1283–1297.
294. Takac I., Schröder K., Zhang L., Lardy B., Anilkumar N., Lambeth J. D., Shah A. M., Morel F., Brandes R. P. The E-loop is involved in hydrogen peroxide formation by the NADPH oxidase Nox4 // *The Journal of biological chemistry*. 2011. 286. № 15. C. 13304–13313.
295. Takemoto K., Matsuda T., McDougall M., Klaubert D. H., Hasegawa A., Los G. V., Wood K. V., Miyawaki A., Nagai T. Chromophore-assisted light inactivation of HaloTag fusion proteins labeled with eosin in living cells // *ACS chemical biology*. 2011. 6. № 5. C. 401–406.
296. Takemoto K., Matsuda T., Sakai N., Fu D., Noda M., Uchiyama S., Kotera I., Arai Y., Horiuchi M., Fukui K., Ayabe T., Inagaki F., Suzuki H., Nagai T. SuperNova, a monomeric photosensitizing fluorescent protein for chromophore-assisted light inactivation // *Scientific reports*. 2013. 3. C. 2629.
297. Tampo Y., Kotamraju S., Chitambar C. R., Kalivendi S. V., Keszler A., Joseph J., Kalyanaraman B. Oxidative stress-induced iron signaling is responsible for peroxide-dependent oxidation of dichlorodihydrofluorescein in endothelial cells: role of transferrin receptor-dependent iron uptake in apoptosis // *Circulation research*. 2003. 92. № 1. C. 56–63.
298. Tanabe T., Oyamada M., Fujita K., Dai P., Tanaka H., Takamatsu T. Multiphoton excitation-evoked chromophore-assisted laser inactivation using green fluorescent protein // *Nature methods*. 2005. 2. № 7. C. 503–505.
299. Taylor A., Robson A., Houghton B. C., Jepson C. A., Ford W. C. L., Frayne J. Epididymal specific, selenium-independent GPX5 protects cells from oxidative stress-induced lipid peroxidation and DNA mutation // *Human reproduction* (Oxford, England). 2013. 28. № 9. C. 2332–2342.

300. Thiagarajah J. R., Chang J., Goettel J. A., Verkman A. S., Lencer W. I. Aquaporin-3 mediates hydrogen peroxide-dependent responses to environmental stress in colonic epithelia // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2017. 114. № 3. C. 568–573.
301. Thieme R., Pai E. F., Schirmer R. H., Schulz G. E. Three-dimensional structure of glutathione reductase at 2 Å resolution // *Journal of Molecular Biology*. 1981. 152. № 4. C. 763–782.
302. Timme-Laragy A. R., Hahn M. E., Hansen J. M., Rastogi A., Roy M. A. Redox stress and signaling during vertebrate embryonic development: Regulation and responses // *Seminars in cell & developmental biology*. 2018. 80. C. 17–28.
303. Tirone F., Cox J. A. NADPH oxidase 5 (NOX5) interacts with and is regulated by calmodulin // *FEBS letters*. 2007. 581. № 6. C. 1202–1208.
304. Toledano M. B., Delaunay A., Monceau L., Tacnet F. Microbial H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sensors as archetypical redox signaling modules // *Trends in biochemical sciences*. 2004. 29. № 7. C. 351–357.
305. Tonissen K. F., Di Trapani G. Thioredoxin system inhibitors as mediators of apoptosis for cancer therapy // *Molecular nutrition & food research*. 2009. 53. № 1. C. 87–103.
306. Torii K., Iizuka T., Ogura Y. Magnetic susceptibility and EPR measurements of catalase and its derivatives. A thermal equilibrium between the high- and low-spin states in the catalase-azide compound // *Journal of biochemistry*. 1970. 68. № 6. C. 837–841.
307. Tosatto S. C. E., Bosello V., Fogolari F., Mauri P., Roveri A., Toppo S., Flohé L., Ursini F., Maiorino M. The catalytic site of glutathione peroxidases // *Antioxidants & redox signaling*. 2008. 10. № 9. C. 1515–1526.

308. Tour O., Meijer R. M., Zacharias D. A., Adams S. R., Tsien R. Y. Genetically targeted chromophore-assisted light inactivation // *Nature biotechnology*. 2003. 21. № 12. C. 1505–1508.
309. Treberg J. R., Quinlan C. L., Brand M. D. Evidence for two sites of superoxide production by mitochondrial NADH-ubiquinone oxidoreductase (complex I) // *The Journal of biological chemistry*. 2011. 286. № 31. C. 27103–27110.
310. Tsang C. K., Liu Y., Thomas J., Zhang Y., Zheng X. F. S. Superoxide dismutase 1 acts as a nuclear transcription factor to regulate oxidative stress resistance // *Nature communications*. 2014. 5. C. 3446.
311. Uechi H., Kuranaga E. The Tricellular Junction Protein Sidekick Regulates Vertex Dynamics to Promote Bicellular Junction Extension // *Developmental cell*. 2019. 50. № 3. 327-338.e5.
312. Ueno N., Takeya R., Miyano K., Kikuchi H., Sumimoto H. The NADPH oxidase Nox3 constitutively produces superoxide in a p22phox-dependent manner: its regulation by oxidase organizers and activators // *Journal of Biological Chemistry*. 2005. 280. № 24. C. 23328–23339.
313. Ursini F., Heim S., Kiess M., Maiorino M., Roveri A., Wissing J., Flohé L. Dual function of the selenoprotein PHGPx during sperm maturation // *Science (New York, N.Y.)*. 1999. 285. № 5432. C. 1393–1396.
314. Ushio-Fukai M. Compartmentalization of redox signaling through NADPH oxidase-derived ROS // *Antioxidants & redox signaling*. 2009. 11. № 6. C. 1289–1299.
315. Vallet P., Charnay Y., Steger K., Ogier-Denis E., Kovari E., Herrmann F., Michel J.-P., Szanto I. Neuronal expression of the NADPH oxidase NOX4, and its regulation in mouse experimental brain ischemia // *Neuroscience*. 2005. 132. № 2. C. 233–238.

316. van Buul J. D., Fernandez-Borja M., Anthony E. C., Hordijk P. L. Expression and localization of NOX2 and NOX4 in primary human endothelial cells // *Antioxidants & redox signaling*. 2005. 7. 3-4. C. 308–317.
317. van de Bittner G. C., Dubikovskaya E. A., Bertozzi C. R., Chang C. J. In vivo imaging of hydrogen peroxide production in a murine tumor model with a chemoselective bioluminescent reporter // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2010. 107. № 50. C. 21316–21321.
318. van Nguyen D., Saaranen M. J., Karala A.-R., Lappi A.-K., Wang L., Raykhel I. B., Alanen H. I., Salo K. E. H., Wang C.-C., Ruddock L. W. Two endoplasmic reticulum PDI peroxidases increase the efficiency of the use of peroxide during disulfide bond formation // *Journal of Molecular Biology*. 2011. 406. № 3. C. 503–515.
319. Vegh R. B., Solntsev K. M., Kuimova M. K., Cho S., Liang Y., Loo B. L. W., Tolbert L. M., Bommarius A. S. Reactive oxygen species in photochemistry of the red fluorescent protein "Killer Red" // *Chemical communications (Cambridge, England)*. 2011. 47. № 17. C. 4887–4889.
320. Verrall L., Burnet P. W. J., Betts J. F., Harrison P. J. The neurobiology of D-amino acid oxidase and its involvement in schizophrenia // *Molecular psychiatry*. 2010. 15. № 2. C. 122–137.
321. Vitriol E. A., Uetrecht A. C., Shen F., Jacobson K., Bear J. E. Enhanced EGFP-chromophore-assisted laser inactivation using deficient cells rescued with functional EGFP-fusion proteins // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2007. 104. № 16. C. 6702–6707.
322. Wang D., Deken X. de, Milenkovic M., Song Y., Pirson I., Dumont J. E., Miot F. Identification of a Novel Partner of Duox // *Journal of Biological Chemistry*. 2005. 280. № 4. C. 3096–3103.

323. Watanabe S., Moniaga C. S., Nielsen S., Hara-Chikuma M. Aquaporin-9 facilitates membrane transport of hydrogen peroxide in mammalian cells // Biochemical and Biophysical Research Communications. 2016. 471. № 1. C. 191–197.
324. Watson J. D. Type 2 diabetes as a redox disease // The Lancet. 2014. 383. № 9919. C. 841–843.
325. Waypa G. B., Smith K. A., Schumacker P. T. O<sub>2</sub> sensing, mitochondria and ROS signaling: The fog is lifting // Molecular aspects of medicine. 2016. 47-48. C. 76–89.
326. Wei J. P., Srinivasan C., Han H., Valentine J. S., Gralla E. B. Evidence for a novel role of copper-zinc superoxide dismutase in zinc metabolism // Journal of Biological Chemistry. 2001. 276. № 48. C. 44798–44803.
327. Weisiger R. A., Fridovich I. Superoxide Dismutase // Journal of Biological Chemistry. 1973. 248. № 10. C. 3582–3592.
328. Wessjohann L. A., Schneider A., Abbas M., Brandt W. Selenium in chemistry and biochemistry in comparison to sulfur // Biological chemistry. 2007. 388. № 10. C. 997–1006.
329. West A. P., Shadel G. S., Ghosh S. Mitochondria in innate immune responses // Nature reviews. Immunology. 2011. 11. № 6. C. 389–402.
330. Westberg M., Bregnhøj M., Etzerodt M., Ogilby P. R. No Photon Wasted: An Efficient and Selective Singlet Oxygen Photosensitizing Protein // The journal of physical chemistry. B. 2017. 121. № 40. C. 9366–9371.
331. Westberg M., Holmegaard L., Pimenta F. M., Etzerodt M., Ogilby P. R. Rational design of an efficient, genetically encodable, protein-encased singlet oxygen photosensitizer // Journal of the American Chemical Society. 2015. 137. № 4. C. 1632–1642.

332. Westerink R. H. S., Ewing A. G. The PC12 cell as model for neurosecretion // *Acta physiologica* (Oxford, England). 2008. 192. № 2. C. 273–285.
333. Williams D. C., Bejjani R. E., Ramirez P. M., Coakley S., Kim S. A., Lee H., Wen Q., Samuel A., Lu H., Hilliard M. A., Hammarlund M. Rapid and permanent neuronal inactivation in vivo via subcellular generation of reactive oxygen with the use of KillerRed // *Cell reports*. 2013. 5. № 2. C. 553–563.
334. Wingler K., Böcher M., Flohé L., Kollmus H., Brigelius-Flohé R. mRNA stability and selenocysteine insertion sequence efficiency rank gastrointestinal glutathione peroxidase high in the hierarchy of selenoproteins // *European journal of biochemistry*. 1999. 259. 1-2. C. 149–157.
335. Winterbourn C. C. The biological chemistry of hydrogen peroxide // *Methods in enzymology*. 2013. 528. C. 3–25.
336. Wolosker H., Mori H. Serine racemase: an unconventional enzyme for an unconventional transmitter // *Amino acids*. 2012. 43. № 5. C. 1895–1904.
337. Woo H. A., Chae H. Z., Hwang S. C., Yang K.-S., Kang S. W., Kim K., Rhee S. G. Reversing the inactivation of peroxiredoxins caused by cysteine sulfinic acid formation // *Science* (New York, N.Y.). 2003. 300. № 5619. C. 653–656.
338. Wood Z. A., Schröder E., Robin Harris J., Poole L. B. Structure, mechanism and regulation of peroxiredoxins // *Trends in biochemical sciences*. 2003. 28. № 1. C. 32–40.
339. Wright R. M., McManaman J. L., Repine J. E. Alcohol-induced breast cancer: a proposed mechanism // *Free Radical Biology and Medicine*. 1999. 26. 3-4. C. 348–354.
340. Yamamoto K., Völkl A., Fahimi H. D. Investigation of peroxisomal lipid beta-oxidation enzymes in guinea pig liver peroxisomes by immunoblotting and

- immunocytochemistry // The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society. 1992. 40. № 12. C. 1909–1918.
341. Yan L., Liu J., Wu S., Zhang S., Ji G., Gu A. Seminal superoxide dismutase activity and its relationship with semen quality and SOD gene polymorphism // Journal of assisted reproduction and genetics. 2014. 31. № 5. C. 549–554.
342. Yang K.-S., Kang S. W., Woo H. A., Hwang S. C., Chae H. Z., Kim K., Rhee S. G. Inactivation of human peroxiredoxin I during catalysis as the result of the oxidation of the catalytic site cysteine to cysteine-sulfinic acid // Journal of Biological Chemistry. 2002. 277. № 41. C. 38029–38036.
343. Yang S., Madyastha P., Bingel S., Ries W., Key L. A new superoxide-generating oxidase in murine osteoclasts // Journal of Biological Chemistry. 2001. 276. № 8. C. 5452–5458.
344. Zhang X., Huang Y., Gu A., Wang G., Fang B., Wu H. Hydrogen Peroxide Sensor Based on Carbon Nanotubes/ $\beta$ -Ni(OH)<sub>2</sub> Nanocomposites // Chinese Journal of Chemistry. 2012. 30. № 3. C. 501–506.
345. Zhou M., Diwu Z., Panchuk-Voloshina N., Haugland R. P. A stable nonfluorescent derivative of resorufin for the fluorometric determination of trace hydrogen peroxide: applications in detecting the activity of phagocyte NADPH oxidase and other oxidases // Analytical Biochemistry. 1997. 253. № 2. C. 162–168.
346. Zielonka J., Sikora A., Joseph J., Kalyanaraman B. Peroxynitrite is the major species formed from different flux ratios of co-generated nitric oxide and superoxide: direct reaction with boronate-based fluorescent probe // The Journal of biological chemistry. 2010. 285. № 19. C. 14210–14216.