



# «Генетически кодируемые флуоресцентные сенсоры редокс-активных соединений»

к.ф.-м.н.

**Ольга Геннадьевна Люблинская**

Институт Цитологии РАН



# Химический состав клетки



**86** элементов таблицы Менделеева из 92, встречающихся на Земле (всего 118)

Элемент	% содержание
<b>Кислород</b>	65—75
Углерод	15—18
Водород	8—10
Азот	2—3

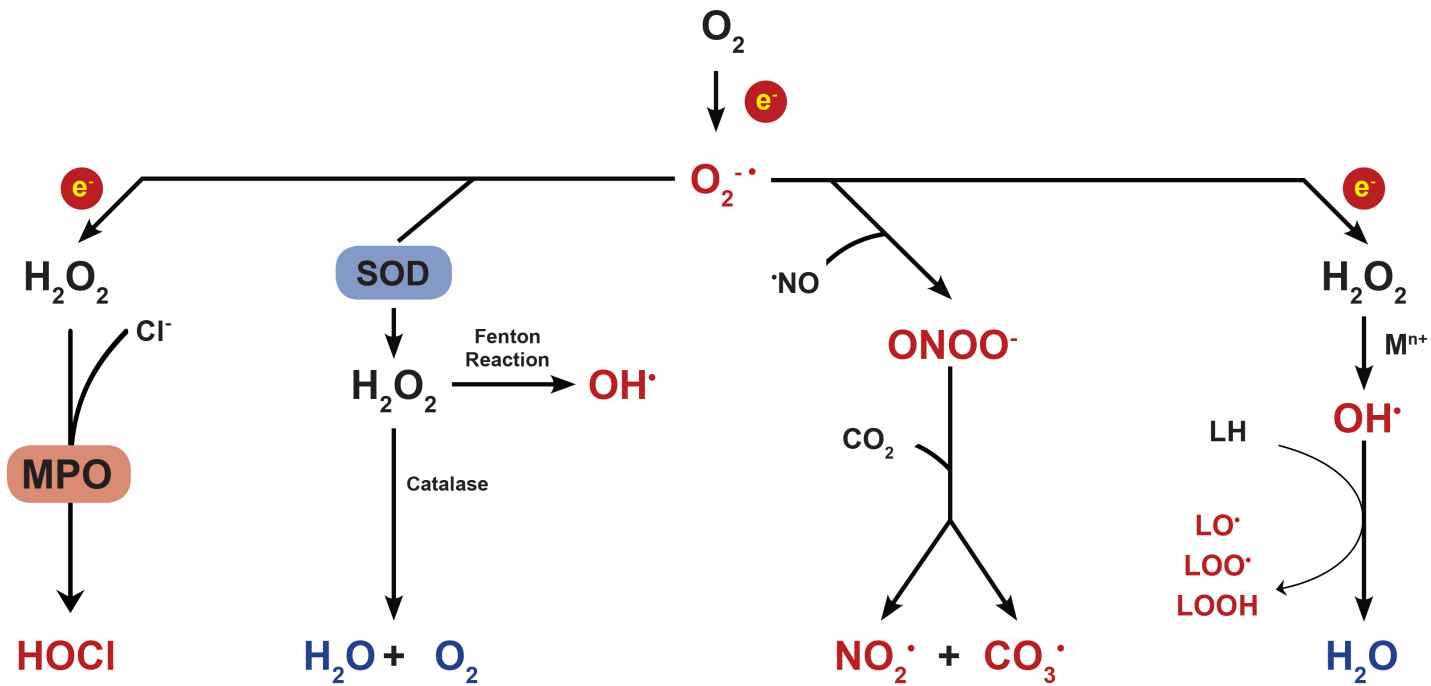
Органические соединения	% содержание
Белки	10—20
Нуклеиновые кислоты	1—2
Углеводы	0,2—2
Липиды	1—5

## Классификация химических реакций

по составу реагентов и продуктов	по агрегатному состоянию	по выделению/поглощению энергии	по изменению степени окисления	по наличию или отсутствию катализатора	по признаку обратимости
синтез	гомогенные	экзотермические	<b>окисление</b>	каталитические	обратимые
разложение	гетерогенные	эндотермические	<b>восстановление</b>	некаталитические	необратимые
замещение/ обмен					



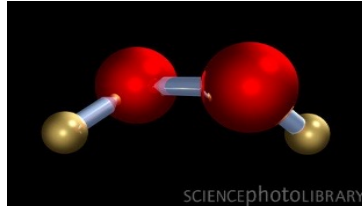
# Активные формы кислорода



- SOD** - Ферменты (белки, катализирующие внутриклеточные реакции)
- M<sup>n+</sup>** - Ионы переходных металлов
- L** - Липиды

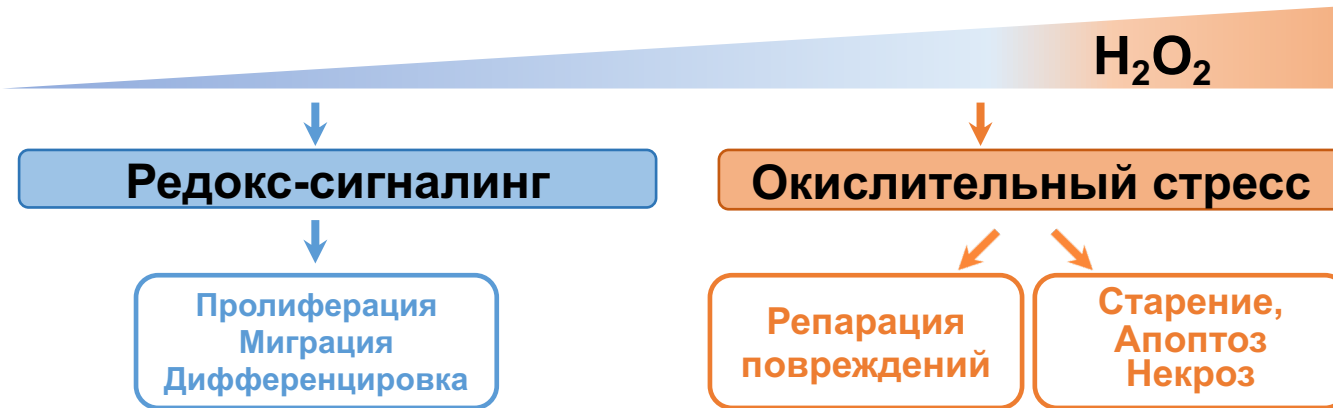


# Перекись водорода – «окисленная вода»



1818 г : Луис Тенар синтезировал  $H_2O_2$

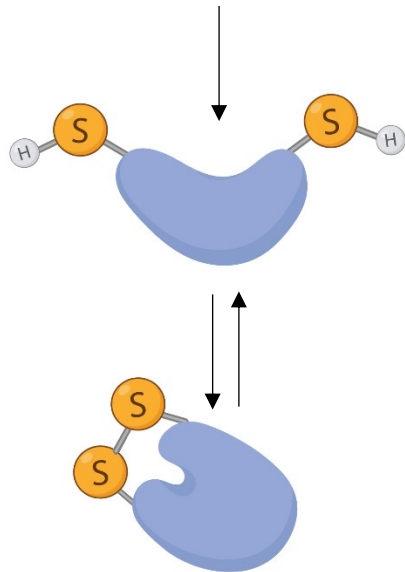
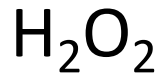
XX век :  $H_2O_2$  – продукт аэробного метаболизма, «двуликий Янус»



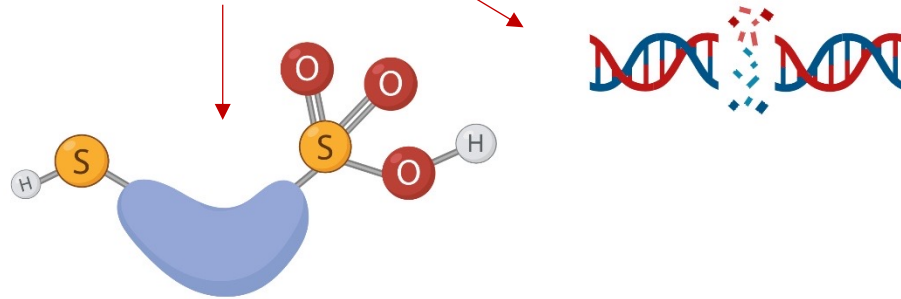


# Внешний $H_2O_2$ -индуцируемый стресс

Норма



Стресс



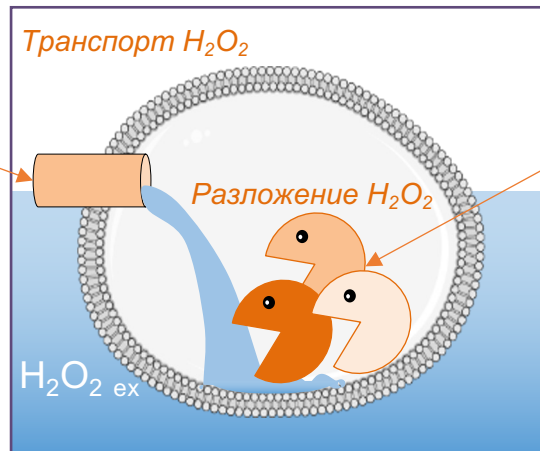
- Внутриклеточная концентрация  $H_2O_2$ :  
< 100 pM (Huang et al., 2016)  
~ 1 – 700 nM (Stone and Yang, 2006)

- Экстраклеточная концентрация  $H_2O_2$ :  
~ 1 – 5  $\mu$ M в плазме крови в норме  
~ 10 – 100  $\mu$ M при патологиях  
(Forman et al., 2016)



# Внешний H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-индуцируемый стресс

$$[H_2O_2]_{in} \neq [H_2O_2]_{ex} !$$



Пероксипорины  
- разновидность аквапоринов

AQP0, AQP1,  
AQP3, AQP5,  
AQP8, AQP9, AQP11

Пероксидазы:

Catalase,  
Gpx,  
Prx, и др.

$$\text{gradient} = [H_2O_2]_{ex} / [H_2O_2]_{in}$$

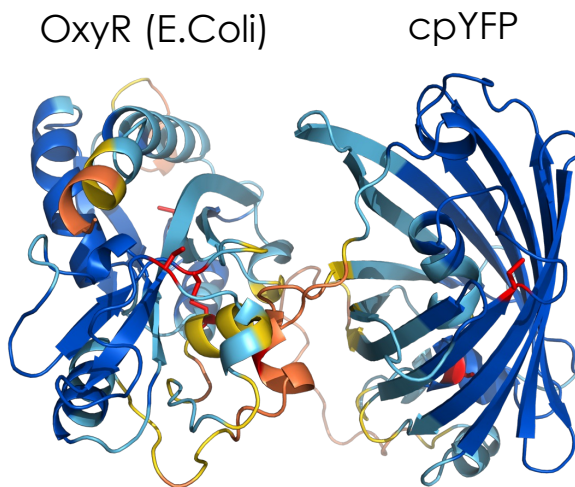
2000 г: теория - F. Antunes, and E. Cadenas FEBS Letters 2000, **gradient** ~ 10

2014 г: теория - B.K. Huang, and H.D. Sikes, Redox Biol. 2014, **gradient** ~ 650



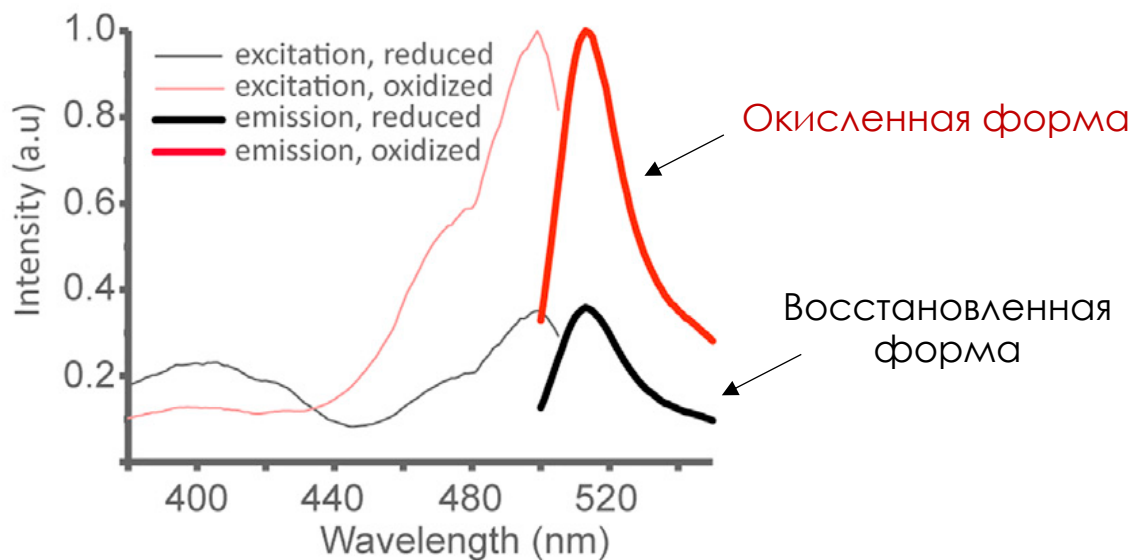
# HyPer: генетически кодируемый биосенсор $H_2O_2$

**OxyR** – бактериальный транскрипционный фактор, природный сенсор  $H_2O_2$



**cpYFP** - пермутированная форма желтого флуоресцентного белка

## Спектры люминесценции и возбуждения люминесценции HyPer

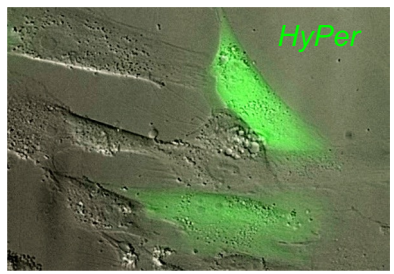




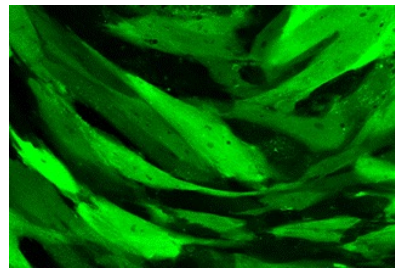


# Экспрессия HyPer в клетках человека

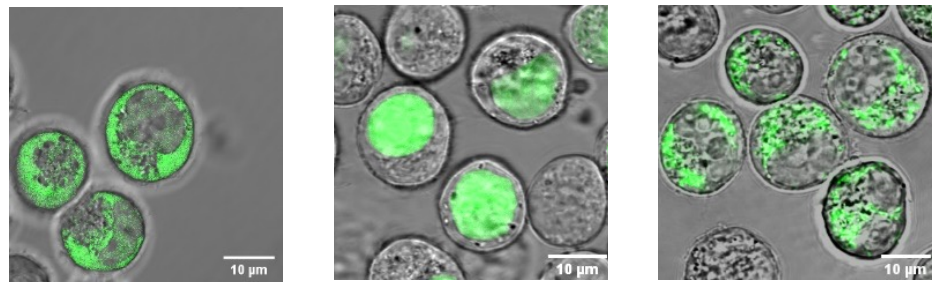
Трансфекция (плазмида)



Трансдукция (лентивирус)



Экспрессия HyPer в цитоплазме, ядре и митохондриях клеток



- Достоинства: хорошая светимость, высокая чувствительность к  $H_2O_2$ , быстрая реакция, возможность экспрессировать сенсор в разных клеточных компартаментах
- Недостаток: pH-зависимость биосенсора

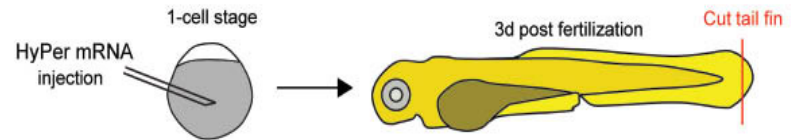




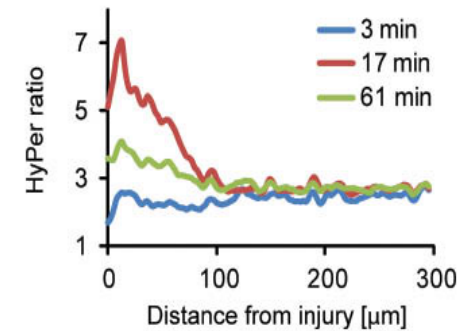
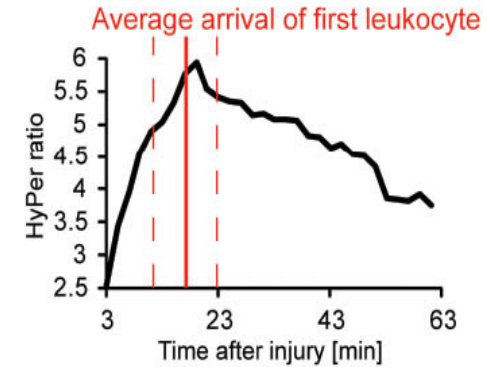
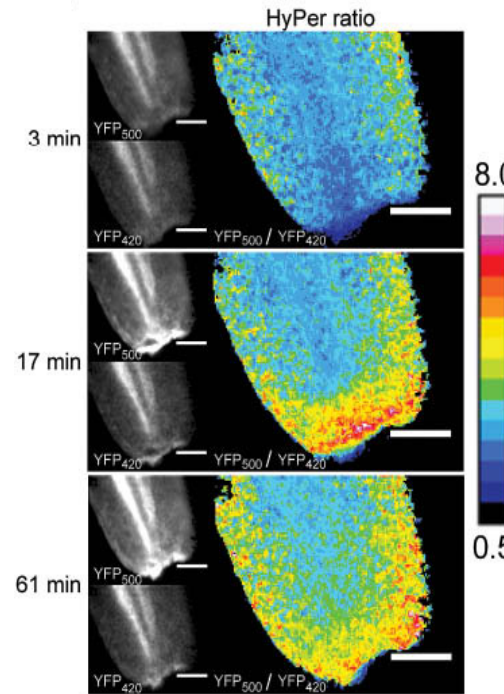
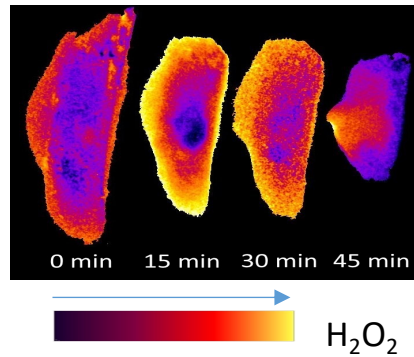
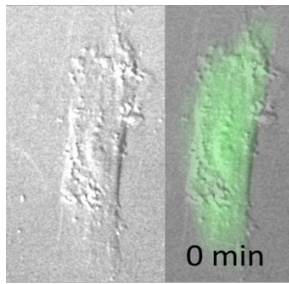
# HyPer: визуализация флуоресцентного сигнала с использованием микроскопии

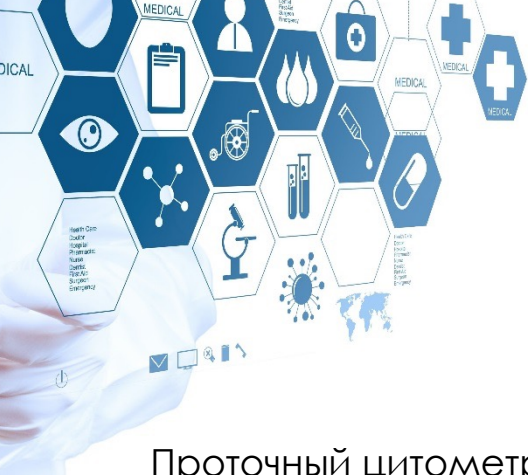
Радиометрический сигнал HyPer – HyPer ratio (FL488ex/FL405ex)

Окислительный стресс:  
воспалительные реакции в организме  
(модель травмы - *Danio rerio*)



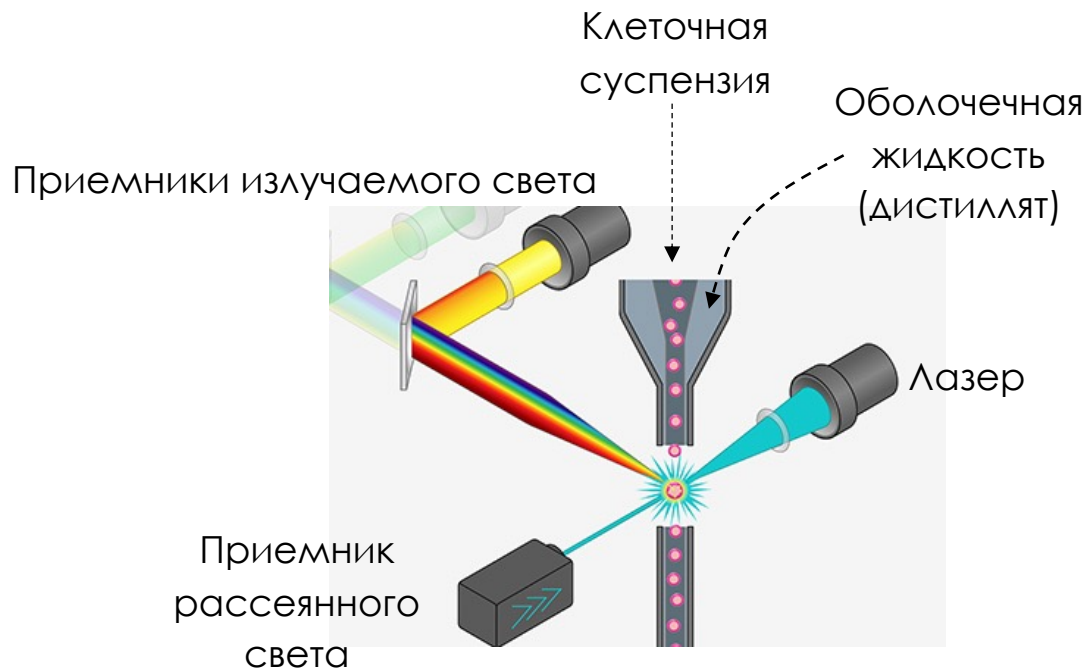
Окислительный стресс:  
добавление к клеткам  $H_2O_2$  (500 мкМ)





# HyPer: проточно-цитометрический анализ

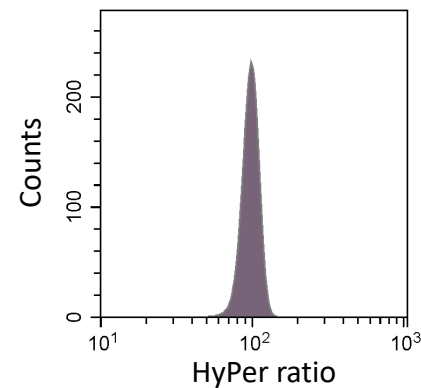
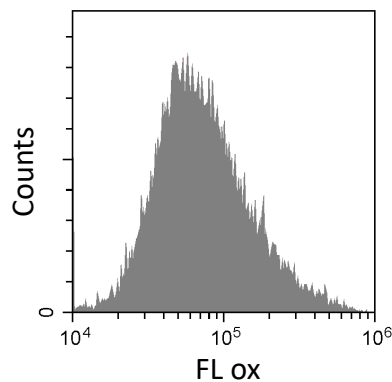
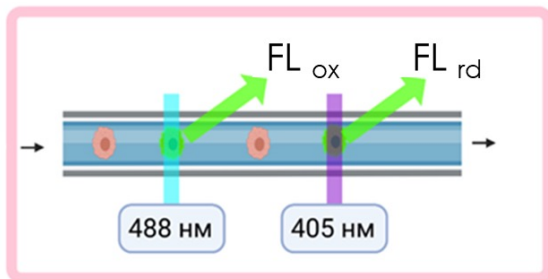
Проточный цитометр  
(CytoFLEX, Beckman  
Coulter)





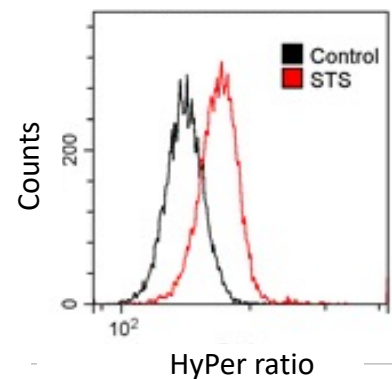
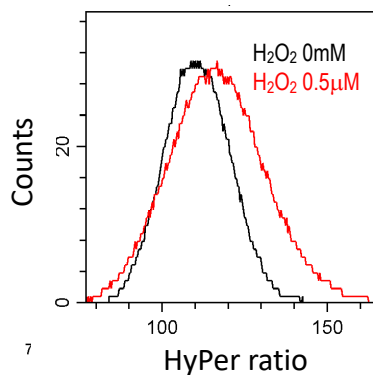
# HyPer: качественный анализ

$$\text{HyPer ratio} = \text{FL}_{\text{ox}} / \text{FL}_{\text{rd}}$$



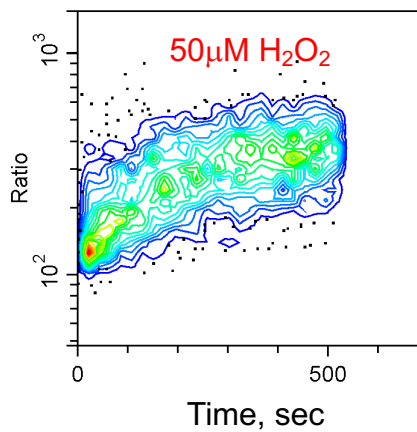
## Высокая чувствительность к H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

Клетки K-562: окислительный стресс



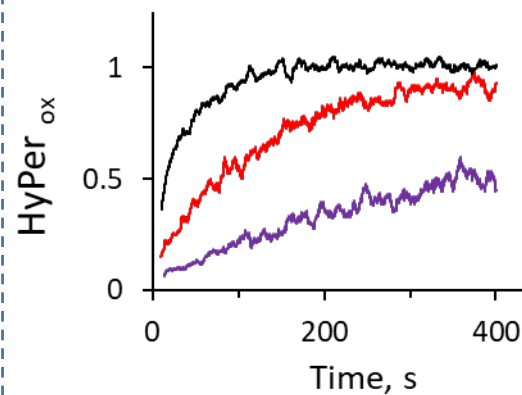
# HyPer: количественный анализ

## 1. Измерения



$$\text{Ratio} = \frac{FL_{ox}}{FL_{rd}}$$

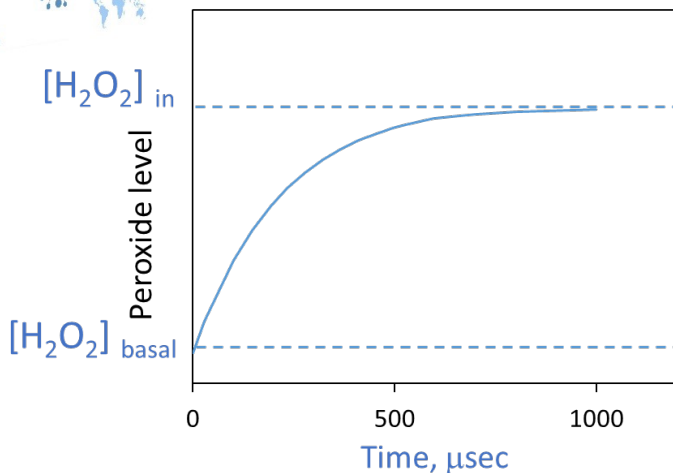
## 2. Обработка данных



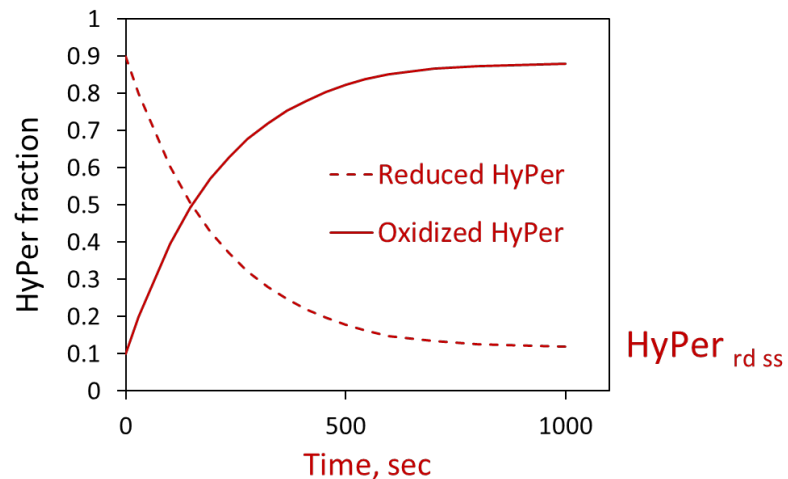
$$\text{HyPer}_{ox} = \frac{FL_{ox}}{FL_{ox} + FL_{rd}}$$

# Кинетика окисления HyPer

Проникновение  
в клетку  $H_2O_2$  :  
миллисекунды



Окисление HyPer :  
минуты



$$\frac{dHyPer_{rd}}{dt} = k_{ox} \times HyPer_{rd} + k_{rd} \times (1 - HyPer_{rd})$$

$k_{ox}$  и  $k_{rd}$  константы реакций окисления и восстановления HyPer

$$HyPer_{rd} | t = HyPer_{rd ss} + e^{-(k_{ox} + k_{rd}) \times t} \times (HyPer_{rd} |_0 - HyPer_{rd ss})$$

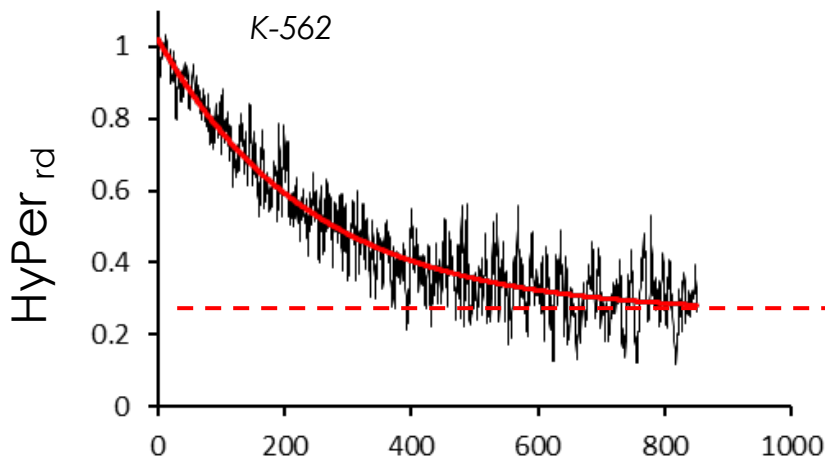
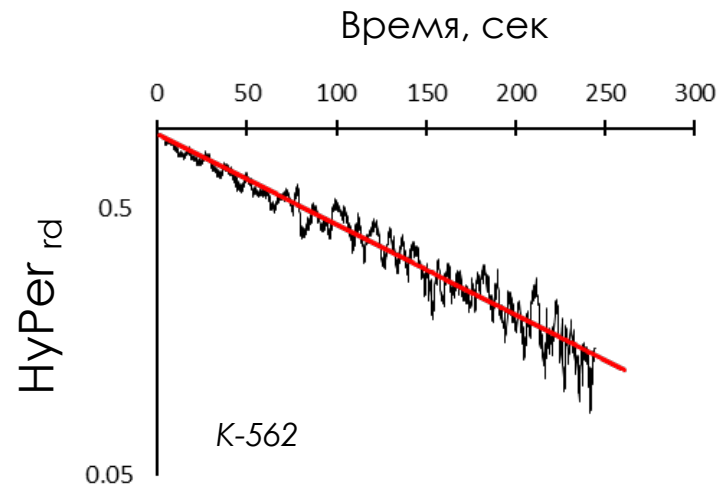
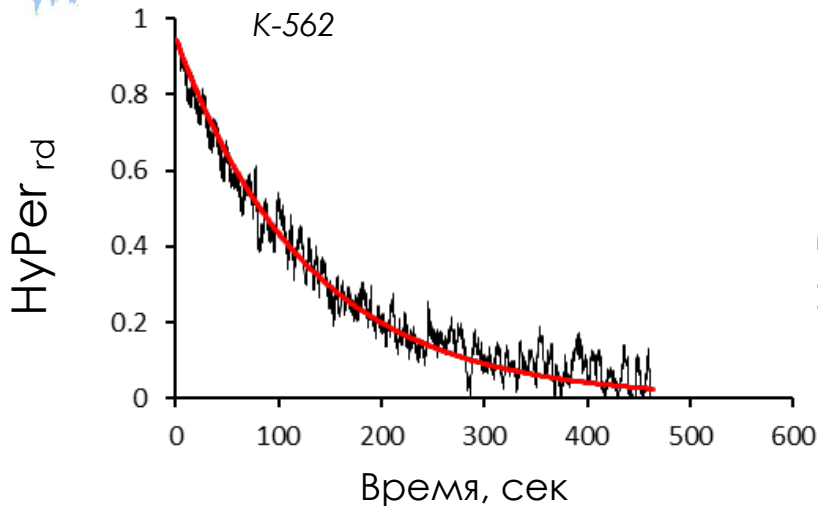
$HyPer_{rd} | t \rightarrow \infty = HyPer_{rd ss}$  - квази-стационарный уровень  $HyPer_{rd}$

$$HyPer_{rd ss} = \frac{k_{rd}}{k_{rd} + k_{ox}}$$

$$k_{ox} = k_{HyPer+H_2O_2} \times [H_2O_2] \quad k_{HyPer+H_2O_2} = 5 \times 10^5 M^{-1} s^{-1}$$



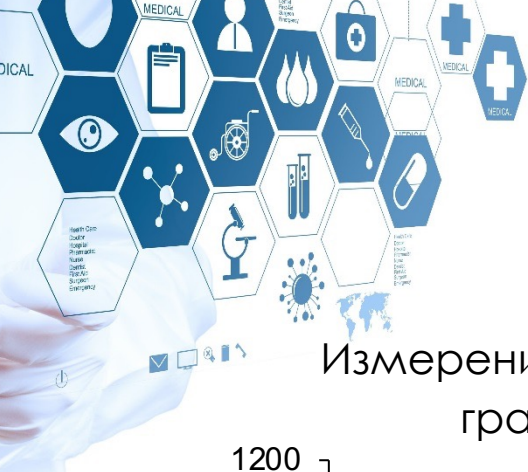
# Кинетика окисления HyPer – моноэкспоненциальная!



$$k_{ox} = k_{HyPer+H2O2} \times [H_2O_2]_{in}$$

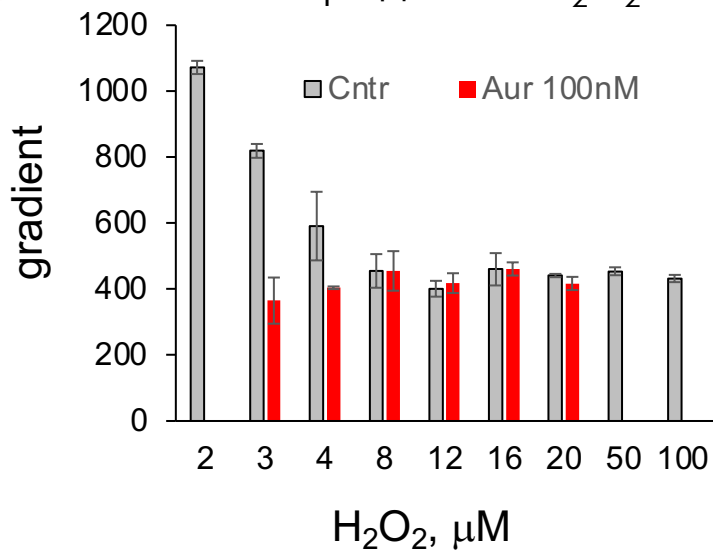
$$k_{HyPer+H2O2} = 5 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$$



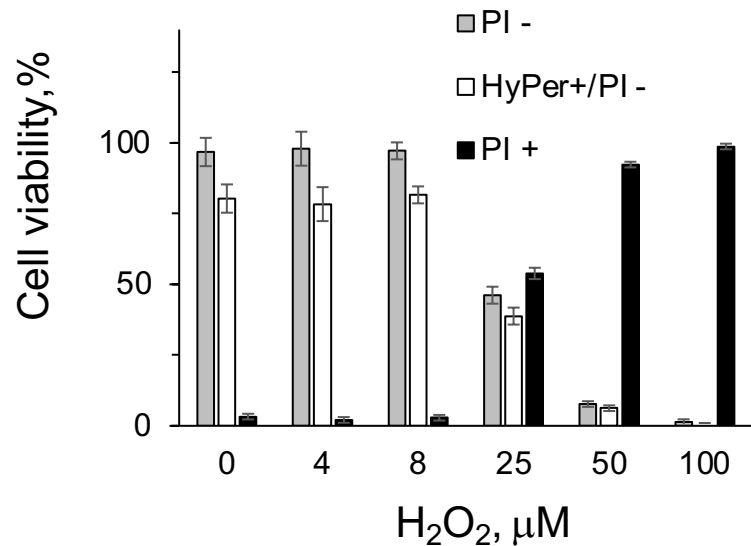


# Определение градиента $H_2O_2$ в условиях разной окислительной нагрузки

Измерение концентрации и градиента  $H_2O_2$



Оценка жизнеспособности клеток

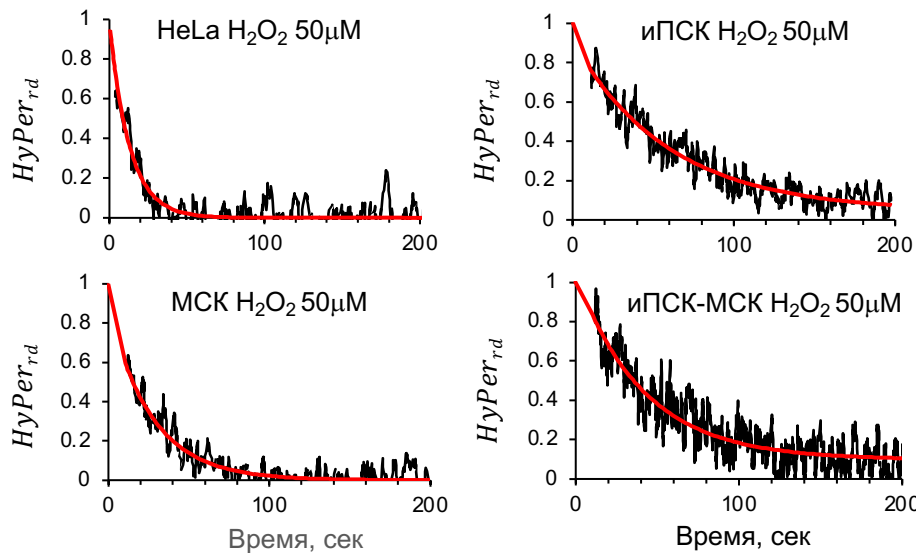


**$K-562$ ,  $[H_2O_2]_{ex} > 8\mu M$ : gradient =  $450 \pm 20$**

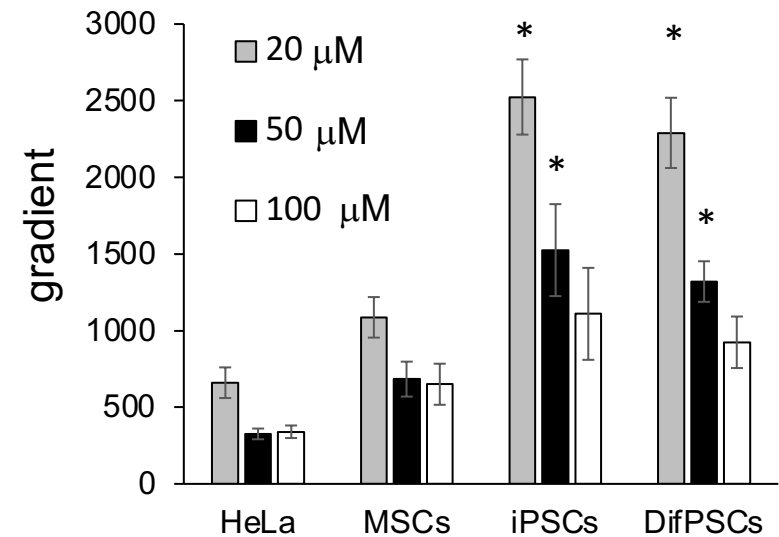


# Определение градиента $H_2O_2$ в клетках разного фенотипа в условиях внешнего окислительного стресса

Кинетика окисления HyPer в клетках разного фенотипа



Градиент  $H_2O_2$  в клетках разного фенотипа



**При репрограммировании МСК в плюрипотентное состояние эффективность антиоксидантной защиты увеличивается, в то время как дифференцировка иПСК не обязательно приводит к изменению антиоксидантной активности в клеточной цитоплазме.**



## Генетически кодируемые биосенсоры: cpGFP, Apple

Название	Аналит	Фл.белок	Сенсорный домен	$\lambda_{ex}$ , nm	$\lambda_{em}$ , nm
Peredox	NADH/NAD <sup>+</sup>	cpT-Sapphi	T-Rex	400/587	510/610
cpGFP-Tyr66pAzF	H <sub>2</sub> S	cpGFP	Modified chromophore: UAAs are introduced	490	520
hsGFP	H <sub>2</sub> S	cpsfGFP	Modified chromophore: UAAs are introduced	454	500
pnGFP	ONOO <sup>-</sup>	cpsfGFP	Modified chromophore: UAAs are introduced	484	508
NeonOxIrr	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	cpmNeonC	OxyR	508	520
HyPerRed	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	cpmApple	OxyR	575	605
rxRFP	general redox state	cpmApple	Redox sensitive peptides	576	600



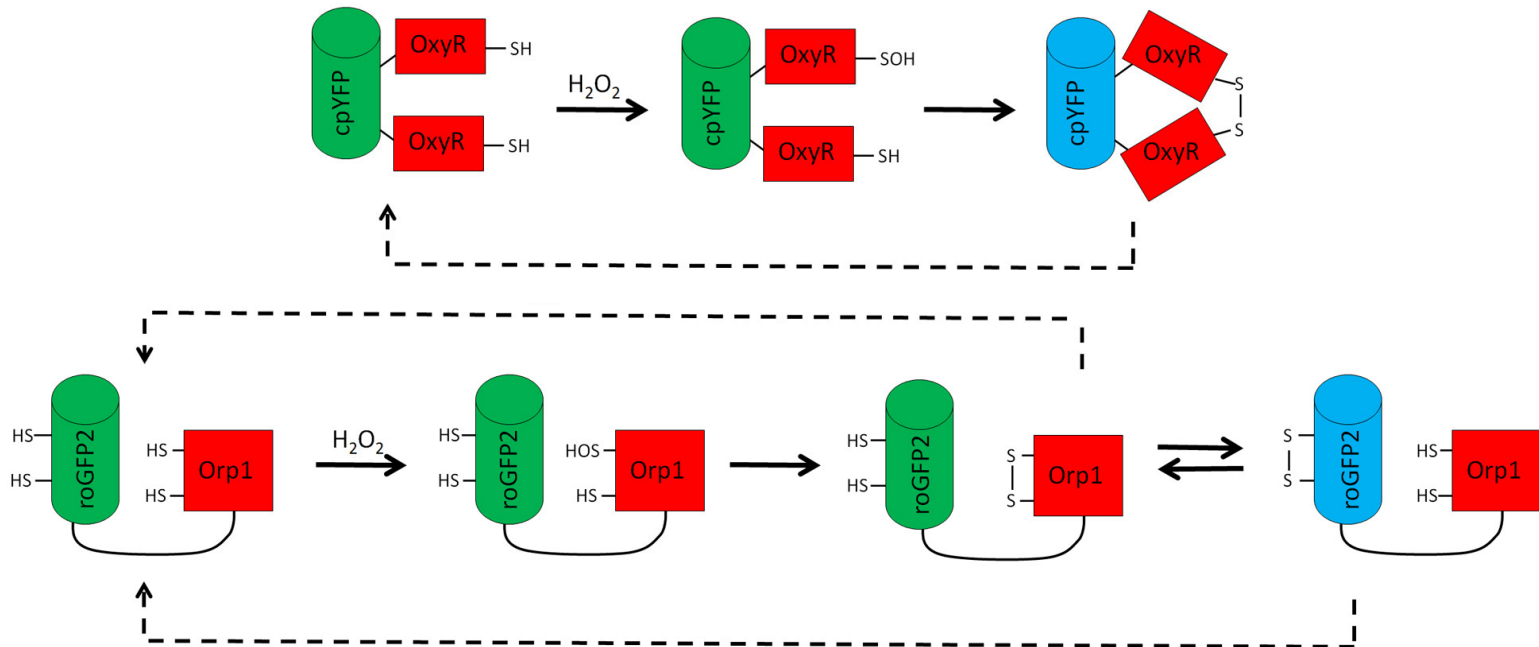
# Генетически кодируемые биосенсоры: cpYFP

Название	Аналит	Фл.белок	Сенсорный домен	λex, nm	λem, nm
TriPer	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	cpYFP	OxyR	405/488	NM
HyPer	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	cpYFP	OxyR	420/500	516
HyPer-2	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	cpYFP	OxyR	420/500	516
HyPer-3	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	cpYFP	OxyR	420/500	516
Frex	NADH	cpYFP	B-Rex	420/500	518
FrexH	NADH	cpYFP	B-Rex	420/500	518
RexYFP	NADH/NAD <sup>+</sup>	cpYFP	T-Rex	490	516
SoNar	NADH/NAD <sup>+</sup>	cpYFP	T-Rex	420/485	528
NAD <sup>+</sup> sensor	NAD <sup>+</sup>	cpVenus	DNA ligase	405/488	≈520
iNap1	NADPH	cpYFP	T-Rex	420/500	515
iNap2	NADPH	cpYFP	T-Rex	420/500	515
iNap3	NADPH	cpYFP	T-Rex	420/500	515
iNap4	NADPH	cpYFP	T-Rex	420/500	515
Qser	quinones	cpYFP	QsrR	427/496	515
MetSOx	S-MetO	cpYFP	MSRA and Trx1	425/505	510-516
MetROx	MetO	cpYFP	MSRB and Trx3	410/500	510-516
OHSer	ROOH	cpVenus	XcOhrR	519	526
COSer	CO	cpVenus	CooA	516	528



# Генетически кодируемые биосенсоры редокс-активных соединений

- Аналит ( $H_2O_2$ ,  $NAD^+/NADH$ ,  $GSH$ ,  $H_2S...$ )
- Флуоресцентный домен (cpGFP, cpYFP, cpApple, roGFP...)
- Сенсорный домен (природные белки-сенсоры бактерий, дрожжей и человека)
- Рациометрический или монофлуоресцентный сигнал
- Спектральный диапазон
- Кинетические характеристики





Спасибо за внимание!

rxYFP, roGFP, HyPer, SypHer, Grx1-roGFP2, Orp1-roGFP2,  
Peredox, Frex, RexYFP, OxyFRET, PerFRET ...

