

ОСОБЕННОСТИ HyPer, КОТОРЫЕ НЕОБХОДИМО УЧИТЫВАТЬ ПРИ ПРОВЕДЕНИИ КОЛИЧЕСТВЕННЫХ ОЦЕНОК ВНУТРИКЛЕТОЧНОГО УРОВНЯ H₂O₂

Используя HyPer для оценки внутриклеточного или внутрикомпарментного содержания H₂O₂, необходимо помнить, что флуоресцентный сигнал биосенсора зависит от внутриклеточного показателя рН (Bilan, Belousov, 2016). Рекомендуется проводить контрольные эксперименты с редокс-неактивной версией биосенсора SupHyPer, которая отличается от HyPer всего одной аминокислотной заменой. Благодаря этой замене химерный белок теряет свою чувствительность к H₂O₂, но сохраняет все свои основные особенности, в том числе и рН-чувствительность.

Помимо этого, стоит учитывать, что параметр, оцениваемый с помощью описанных в обзоре методов (уровень H₂O₂), представляет собой усредненную по времени и пространству величину, характеризующую внутриклеточный или внутрикомпарментный редокс-гомеостаз в целом, но не дающую представления о локальных процессах генерации и элиминации пероксида в конкретные моменты времени.

Наконец, стоит иметь в виду, что серьезной проблемой при проведении количественных измерений уровня H₂O₂ с помощью HyPer является недостаточно точная оценка константы его взаимодействия с пероксидом, которая основана преимущественно на экспериментах с его белком-прародителем OxyR (Zheng et al., 1998; Lee et al., 2004). Дальнейшая работа по определению этого параметра необходима для проведения более аккуратных количественных тестов на внутриклеточное содержание H₂O₂ с использованием HyPer. Уточнение константы взаимодействия биосенсора с H₂O₂ может привести в будущем к коррекции уже полученных с помощью HyPer количественных оценок.

В заключении обзора хотелось бы обсудить еще один важный аспект — перспективы использования для количественных оценок уровня H₂O₂ новой модификации биосенсора, HyPer7, отличающейся высочайшей чувствительностью к H₂O₂ (Pak et al., 2020). Высокая константа скорости реакции HyPer7 с пероксидом (которая на два порядка превышает параметры первой версии HyPer) позволяет надеяться, что измерению будут доступны уровни H₂O₂, индуцируемые окислительными возмущениями не только экзогенной, но и эндогенной природы. Так, явление, которое до сих пор не охарактеризовано с точки зрения количественного определения уровня H₂O₂ — это

индукция физиологического окислительного стресса при стимуляции клеток ростовыми факторами. Использование HyPer7 может оказаться гораздо более эффективным при проведении подобных экспериментов, чем использование HyPer. Помимо высокой чувствительности к H₂O₂, флуоресцентный сигнал HyPer7 является рН-независимым, что обеспечит дополнительные преимущества при изучении этого явления. Мы надеемся, что в ближайшем будущем появятся работы, реализующие эту возможность.

ВЫВОДЫ

Использование генетически кодируемого биосенсора HyPer предоставляет широкие возможности для проведения количественных оценок внутриклеточной и внутрикомпарментной концентрации перекиси водорода в живых клетках. Определение содержания H₂O₂ может быть использовано для ранжирования диапазона физиологических и повреждающих концентраций H₂O₂ в клетках, оценки эффективности систем антиоксидантной защиты разного типа клеток и отдельных клеточных компарментов в норме и патологии, а также для идентификации молекулярных механизмов защиты клеток от окислительного стресса.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (в рамках проекта № 21-74-20178 был собран и систематизирован материал для первых четырех глав обзора; в рамках проекта № 23-74-01142 — для заключительных трех глав).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

В данной работе отсутствуют исследования человека или животных.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы сообщают об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Antunes F., Cadenas E.* 2000. Estimation of H₂O₂ gradients across biomembranes. *FEBS Lett.* V. 475. P. 121.
Belousov V. V., Fradkov A. F., Lukyanov K. A., Staroverov D. B., Shakhbazov K. S., Terskikh A. V., Lukyanov S. A. 2006. Genetically encoded fluorescent indicator

- for intracellular hydrogen peroxide. *Nat. Methods* V. 3. P. 281.
- Bilan D. S., Belousov V. V.* 2016. HyPer family probes: state of the art. *Antioxidants Redox Signal.* V. 24. P. 731.
- Bilan D. S., Pase L., Joosen L., Gorokhovatsky A. Y., Ermakova Y. G., Gadella T. W., Grabher C., Schultz C., Lukyanov S., Belousov V. V.* 2013. HyPer-3: a genetically encoded H₂O₂ probe with improved performance for ratiometric and fluorescence lifetime imaging. *ACS Chem. Biol.* V. 8. P. 535.
- Brito P. M., Antunes F.* 2014. Estimation of kinetic parameters related to biochemical interactions between hydrogen peroxide and signal transduction proteins. *Front. Chem.* V. 2. P. 82.
- Huang B. K., Sikes H. D.* 2014. Quantifying intracellular hydrogen peroxide perturbations in terms of concentration. *Redox Biol.* V. 2. P. 955.
- Huang B. K., Stein K. T., Sikes H. D.* 2016. Modulating and measuring intracellular H₂O₂ using genetically encoded tools to study its toxicity to human cells. *ACS Synth. Biol.* V. 5. P. 1389.
- Ivanova J., Guriev N., Pugovkina N., Lyublinskaya O.* 2023. Inhibition of thioredoxin reductase activity reduces the antioxidant defense capacity of human pluripotent stem cells under conditions of mild but not severe oxidative stress. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* V. 642. P. 137.
- Lee C., Lee S. M., Mukhopadhyay P., Kim S. J., Lee S. C., Ahn W. S., Yu M. H., Storz G., Ryu S. E.* 2004. Redox regulation of OxyR requires specific disulfide bond formation involving a rapid kinetic reaction path. *Nat. Struct. Mol. Biol.* V. 11. P. 1179.
- Lim J., Langford T., Huang B., Deen W., Sikes H.* 2016. A reaction-diffusion model of cytosolic hydrogen peroxide. *Free Radic. Biol. Med.* V. 90. P. 85.
- Lyublinskaya O. G., Antonov S. A., Gorokhovtsev S. G., Pugovkina N. A., Kornienko J. S., Ivanova J. S., Shatrova A. N., Aksenov N. D., Zenin V. V., Nikolsky N. N.* 2018. Flow cytometric HyPer-based assay for hydrogen peroxide. *Free Radic. Biol. Med.* V. 128 P. 40.
- Lyublinskaya O., Antunes F.* 2019. Measuring intracellular concentration of hydrogen peroxide with the use of genetically encoded H₂O₂ biosensor HyPer. *Redox Biol.* V. 24: 101200.
- Malinouski M., Zhou Y, Belousov V, Hatfield D, Gladyshev V.* 2011. Hydrogen peroxide probes directed to different cellular compartments. *PLoS One.* V. 6: e14564.
- Meyer A. J., Dick T. P.* 2010. Fluorescent protein-based redox probes. *Antioxid. Redox Signal.* V. 13. P. 621.
- Milkovic L., Zarkovic N., Saso L.* 2017. Controversy about pharmacological modulation of Nrf2 for cancer therapy. *Redox Biol.* V. 12. P. 727.
- Mishina N., Bogdanova Y., Ermakova Y., Panova A., Kotova D., Bilan D., Steinhorn B., Arnér E., Michel T., Belousov V.* 2019. Which antioxidant system shapes intracellular H₂O₂ gradients? *Antioxid. Redox Signal.* V. 31. P. 664.
- Mishina N., Markvicheva K., Bilan D., Matlashov M., Shirmanova M., Liebl D., Schultz C., Lukyanov S., Belousov V.* 2013. Visualization of intracellular hydrogen peroxide with HyPer, a genetically encoded fluorescent probe. *Methods Enzymol.* V. 526. P. 45.
- 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., et al.* 2020. Ultrasensitive genetically encoded indicator for hydrogen peroxide identifies roles for the oxidant in cell migration and mitochondrial function. *Cell Metab.* V. 31. P. 642.
- Sies H.* 2021. Oxidative eustress: on constant alert for redox homeostasis. *Redox Biol.* V. 41: 101867.
- Sies H., Berndt C., Jones D. P.* 2017. Oxidative stress. *Annu Rev. Biochem.* V. 86. P. 715.
- Sies H., Jones D. P.* 2020. Reactive oxygen species (ROS) as pleiotropic physiological signalling agents. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* V. 21. P. 363.
- Sporn M. B., Liby K. T.* 2012. NRF2 and cancer: the good, the bad and the importance of context. *Nat. Rev. Cancer.* V. 12. P. 564.
- Zenin V., Ivanova J., Pugovkina N., Shatrova A., Aksenov N., Tyuryaeva I., Kirpichnikova K., Kuneev I., Zhuravlev A., Osyayeva E., Lyublinskaya E., Gazizova I., Guriev N., Lyublinskaya O.* 2022. Resistance to H₂O₂-induced oxidative stress in human cells of different phenotypes. *Redox Biol.* V. 50: 102245.
- Zheng M., Åslund F., Storz G.* 1998. Activation of the OxyR transcription factor by reversible disulfide bond formation. *Science.* V. 279. P. 171
<https://doi.org/10.1007/s10561-022-10011-x>

GENETICALLY ENCODED BIOSENSOR HyPer AS A TOOL FOR QUANTIFICATION OF INTRACELLULAR HYDROGEN PEROXIDE CONCENTRATIONS

O. G. Lyublinskaya^{a, *}, Ju. S. Ivanova^a

^a *Institute of Cytology RAS, St. Petersburg, 194064, Tikhoretskii pr., 4*

^{*}*e-mail: o.lyublinskaya@mail.ru*

This mini-review systematizes information on methods for quantitative assessment of intracellular hydrogen peroxide concentration based on the use of a genetically encoded peroxide sensor HyPer. Two approaches are being considered: 1) calibration of the biosensor using exogenous hydrogen peroxide, based on assessing the rate of peroxide penetration into cells and intracellular peroxidase activity; 2) direct determination of the intracellular peroxide content, based on measuring the level of oxidation of the biosensor, the oxidation reaction constant and the reduction reaction constant of HyPer in the cells. The use of these methods makes it possible to solve a wide range of tasks in cellular redox biology — to determine the range of physiological and damaging concentrations of hydrogen peroxide in cells, to evaluate the effectiveness of the antioxidant defense system in various cellular compartments under conditions of oxidative stress, to determine the contribution of various enzymatic systems to the peroxidase activity of cells, and to characterize antioxidant defense systems in various biological contexts (in the process of cellular senescence, differentiation, reprogramming, during the development of pathologies). The described methods can be adapted for other genetically encoded hydrogen peroxide biosensors.

Keywords: hydrogen peroxide, antioxidant defense, peroxidase activity, genetically encoded biosensors, HyPer